



**UNICAMP**

**UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS**

**INSTITUTO DE QUÍMICA**

**DEPARTAMENTO DE QUÍMICA ANALÍTICA**

**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA**

**PROPRIEDADES CROMATOGRÁFICAS E  
ESTABILIDADE DE FASES ESTACIONÁRIAS  
PREPARADAS PELA IMOBILIZAÇÃO TÉRMICA DE  
POLISSILOXANOS SOBRE A SÍLICA.**

**Endler Marcel Borges de Souza**

**Tese de Doutorado**

**Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Carol Hollingworth Collins**

**Campinas - SP  
01 de Abril de 2011**

**FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA BIBLIOTECA DO  
INSTITUTO DE QUÍMICA DA UNICAMP**

So89p Souza, Endler Marcel Borges de.  
Propriedades cromatográficas e estabilidade de  
fases estacionárias preparadas pela imobilização  
térmica de polissiloxanos sobre a sílica / Endler  
Marcel Borges de Souza. -- Campinas, SP: [s.n.], 2011.

Orientadora: Profa. Dra. Carol Hollingworth  
Collins.

Doutorado - Universidade Estadual de Campinas,  
Instituto de Química.

1. Fases estacionárias reversas. 2. Cromatografia  
líquida de alta eficiência. 3. Polissiloxano.  
4. Atividade silanolílica. I. Collins, Carol  
Hollingworth. II. Universidade Estadual de Campinas.  
Instituto de Química. III. Título.

**Título em inglês:** Chromatographic and stability evaluations of stationary phases prepared by thermal immobilization of polysiloxanes onto silica surfaces

**Palavras-chaves em inglês:** Reversed stationary phases, High performance liquid chromatography, Polysiloxane, Silanol activity

**Área de concentração:** Química Analítica

**Titulação:** Doutor em Ciências

**Banca examinadora:** Profa. Dra. Carol Hollingworth Collins (orientadora), Prof. Dr. Guilherme Miola Titato (IQSC-USP), Prof. Dr. Álvaro José dos Santos Neto (IQSC-USP), Profa. Dra. Susanne Rath (IQ-UNICAMP), Profa. Dra. Carla Beatriz Grespan Bottoli (IQ-UNICAMP)

**Data de defesa:** 01/04/2011



***I would like to dedicate this dissertation: to my mother and grandmother, Cleire Maria and Therezinha de Jesus Borges, to my major professor Carol H. Collins, to my fiancée Mara de Cassia Custodio and to my daughter, Agatha, to be born in May. All that I am and all that I will ever be are due to their constant love and support.***





## ACKNOWLEDGMENTS

I would like to thank my major Professor, Dr. Carol H. Collins, for all of his guidance and support over the past 4 years. It was a pleasure to learn from such an experienced, knowledgeable person. In my high school yearbook she gave me a challenge: “Do not go where the path may lead, go instead where there is no path and leave a trail.” I hope that I have blazed that trail for future generations. I will never forget Professor Collins and every thing that she does for me!

I would be remiss if I did not thank my family. My extended family has provided a refuge filled with love for as long as I can remember. I could not have done any of this without your love and your constant prayers. My success is a testament to the strength of our family matriarch, Therezinha de Jesus Borges. As the song goes, “I know my grandmother prayed for me”. I will always be grateful to my mother, Cleire Maria Borges for creating my life and still nurturing it 28 years later with the same level of intensity.

Campinas has been learning and a growing experience for me and there were two things I didn't expect to find while I was here. The first was my daughter, and the second was a wife.

I could not have made it through this process without the friendship of Karen Goraibe. We worked through classes, battled through exams, persevered through orals, struggled through research, and now we have triumphed through the dissertation process. Thank you for everything you have done with and for me over the past 4 years. You have earned a place for your picture in my house now. I'd like to thank my friends from the Neigborg Laboratory (Prof Dr. Fabio Augusto's research group “Laboratório Louis Guillotin”) for the good moments and for the friendship: Leandro Wang Hantao, Raquel Gomes da Costa Silva, Carlos Henrique de Vasconcelos Fidelis, Ernesto Correa Ferreira, Stanislaw Bogusz Junior. I'd like

to thank also my colleagues: Daniele Oshita, Elias Severo da Silva Júnior, Mariza Campagnolli Chiaradia, Louise Lee da Silva Magalhães, Lucilia Vilela de Melo and Carla G.A Silva.

Thanks to my future wife, Mara de Cassia Custodio. We have been together for 2 years of this 4-year journey and we will now be together for the rest of our lives. Thank you for hanging in there with me through my mood swings during this stressfully process. I couldn't have met my deadlines without you. I am so blessed to have a woman like you in my life and I am grateful for the opportunity to learn and grow with you forever.

I acknowledge financial support and fellowships from the Brazilian Agencies FAPESP (Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo), CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico) and CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior). I tank Dr. Marcelo Ribani from TECPAR, Curitiba, Brazil for the donation of some of the basic solutes used in this work and Dr. Paulo César Pires Rosa from EMS, Hortolândia, Brazil, for the donation of the commercial stationary phases and some basic solutes used in this work.

This Doctoral dissertation is a contribution of the National Institute of Advanced Analytical Science and Technology (INCTAA).

## CURRICULUM VITAE

### **FORMAÇÃO ACADÊMICA**

**MESTRADO EM CIÊNCIAS** - Universidade de São Paulo, USP, Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto, FFCLRP, Ribeirão Preto, SP, Brasil. Título: Estudo fitoquímico de *Trichogonia menthaefolia* Gardner (Asteraceae-Eupatorieae). Período: 08/2004 a 10/2006. Orientação: Professora. Dr<sup>a</sup>. Dionéia Camilo Rodrigues de Oliveira. Bolsista: Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior

**BACHARELADO EM QUÍMICA** - Universidade Federal de São Carlos, UFSCar, São Carlos, SP, Brasil. Período: 02/2000 a 08/2004.

### **INDICADORES DE PRODUÇÃO CIENTÍFICA**

*TRABALHOS PUBLICADOS EM EVENTOS NACIONAIS: 13*

*TRABALHOS PUBLICADOS EM EVENTOS INTERNACIONAIS: 10*

### **ARTIGOS CIENTÍFICOS**

1. **Borges, E. M.**; Silva, C.G.A.; Collins, C.H.. Chromatographic evaluation of some stationary phases based on poly(methyloctylsiloxane) immobilized onto silica. *Microchemical Journal (Print)*, v. 96, p. 120-125, 2010
2. **Borges, E. M.**; Bottoli, C.B. G. ; Collins, C.H. Possibilidades e limitações no uso da temperatura em cromatografia líquida de fase reversa. *Química Nova (Impresso)*, v. 33, p. 200, 2010.

3. **Borges, E. M.;** Collins, C.H.; Chromatographic evaluation using basic solutes of the silanol activity of stationary phases based on poly(methyloctylsiloxane) immobilized onto silica J. Sep. Sci. 2011: Aceito
4. **Borges, E. M.;** Collins, C.H.; Characterization of several stationary phases prepared by thermal immobilization of poly(methyltetradecylsiloxane) onto silica surfaces. J. Chromatogr. A 2011. Recomendado para ser aceito pelos assessores após pequenas revisões
5. **Borges, E. M.;** Collins, C.H.; Evaluation of immobilized stationary phases. Part I: Effect of pH, temperature, buffer type and buffer concentration on chromatographic performance. J. Liq. Chromatogr. Relat. Technol., 2011. Submetido para publicação
6. **Borges, E. M.;** Collins, C.H.; Evaluation of some new immobilized stationary phases. Part II: Effect of pH, temperature, buffer type and buffer concentration on stability, J. Liq. Chromatogr. Relat. Technol., 2011, 2011. Submetido para publicação.
7. **Borges, E. M.;** Collins, C.H.; Selectivity of some basic solutes on a poly(methyltetradecylsiloxane) silica stationary phase J. Sep. Sci., 2011. Submetido para publicação
8. **Borges, E. M.;** de Oliveira, D.C.R.; Estudo fitoquímico de *Trichogonia menthaefolia* Gardner (Asteraceae-Eupatorieae) Química Nova., 2011 Submetido para publicação

## RESUMO

PROPRIEDADES CROMATOGRÁFICAS E ESTABILIDADE DE FASES ESTACIONÁRIAS PREPARADAS PELA IMOBILIZAÇÃO TÉRMICA DE POLISSILOXANOS SOBRE A SÍLICA. As propriedades cromatográficas e a estabilidade de fases estacionárias preparadas pela imobilização térmica do poli(metiloctilsiloxano) ou do poli(metiltetradecilsiloxano) sobre a sílica foram avaliadas. Para isso, foram empregados os testes de Engelhardt, Tanaka e SRM 870. O estudo dos mecanismos envolvidos na retenção de solutos básicos nestas fases estacionárias foi feita com um teste desenvolvido em nosso laboratório, que consiste em avaliar os fatores de retenção e a assimetria de solutos hidrofóbicas e hidrofílicas em fases móveis com diferentes valores de pH, preparadas com diferentes tipos e concentrações de tampão. A avaliação das fases estacionárias com os testes SRM 870 e de Tanaka mostram uma alta contribuição dos fenômenos de troca iônica para retenção dos solutos básicos e a comparação dos valores obtidos com o teste de Tanaka, segundo o modelo de Euerby, mostrou que estas fases estacionárias apresentam propriedades cromatográficas distintas da maioria das fases comerciais, embora alguma similaridade tenha sido observada com as fases estacionárias que também apresentam altas contribuições de fenômenos de troca iônica na retenção de solutos básicos. O novo teste desenvolvido mostrou que a retenção de solutos básicos acontece devido a interações sinérgicas dos silanóis residuais com os polisiloxanos imobilizados na forma de gotas sobre a sílica. Devido a estas interações, o pH da fase móvel, o tipo e a concentração de tampão afetam intensamente os fatores de retenção e a assimetria de solutos básicos. Algumas das fases estacionárias apresentaram boa seletividade e picos simétricos para solutos básicos em fases móveis neutras, onde os solutos estão protonados e os silanóis residuais estão desprotonados. Os testes de estabilidade demonstraram que algumas das fases estacionárias são altamente estáveis em fases móveis neutras em temperatura ambiente e em fases móveis ácidas, mesmo a altas temperaturas. No entanto, estas se mostraram instáveis em fases móveis alcalinas mesmo em temperatura ambiente, conforme esperado para fases estacionárias preparadas pela imobilização de polissiloxanos sobre a sílica.



## ABSTRACT

CHROMATOGRAPHIC PROPERTIES AND STABILITY OF STATIONARY PHASES PREPARED BY THERMAL IMMOBILIZATION OF POLYSILOXANES ONTO SILICA. This work has evaluated the chromatographic properties and the stability of stationary phases prepared by with poly(methyloctylsiloxane) or poly(methyltetradecylsiloxane) thermally immobilized onto a silica surface. The stationary phases were chromatographically evaluated using the Engelhardt, SRM 870 and Tanaka tests. The retention mechanisms involved during the separation of basic solutes with these stationary phases were evaluated using a test developed in our laboratory that evaluates the effect of the mobile phases with different pH, and type and concentration of buffer on the retention factors and asymmetry of several basic solutes (with hydrophobic or hydrophilic characteristics). Evaluations with the SRM 870 and Tanaka tests showed that there is a high contribution of ion-exchange interactions at neutral pH. Classifications using the Euerby's procedure indicate that the stationary phases developed in this work are different from most commercial ones, although some similarity was found with the phases that have high ion-exchange interactions. Also, the retention of basic solutes occurs due to synergetic interactions between the free silanols with the immobilized polysiloxanes, which are in the form of plugs on the silica surface. Due to these interactions the pH of the mobile phase, and the type and concentration of buffer have a strong effect on the retention factors and asymmetry factors of basic solutes. The stationary phases present good selectivity at near neutral pH, where both the basic solutes and free silanols are protonated, suggesting the use of intermediate pH for basic solute analyses. Stability tests show that the stationary phases have high stability in neutral mobile phases at room temperature and also in acidic mobile phases, even at high temperatures. However, these phases have low stability in alkaline mobile phases, even at room temperature, which was expected for polysiloxanes immobilized onto silica.





## SUMÁRIO

<i>ACKNOWLEDGMENTS</i> .....	<i>vii</i>
<i>CURRICULUM VITAE</i> .....	<i>ix</i>
<i>RESUMO</i> .....	<i>xi</i>
<i>ABSTRACT</i> .....	<i>xiii</i>
<i>SUMÁRIO</i> .....	<i>xv</i>
<b>Capítulo 1: Apresentação do trabalho</b> .....	<b>1</b>
<b>Referências</b> .....	<b>5</b>
<b>Capítulo 2: Revisão bibliográfica</b> .....	<b>7</b>
<b>Descrição dos parâmetros cromatográficos utilizados nas avaliações.</b> .....	<b>8</b>
<b>Fases estacionárias e seletividade cromatográfica</b> .....	<b>19</b>
<b>Estabilidade das fases estacionárias</b> .....	<b>38</b>
<b>Testes cromatográficos</b> .....	<b>50</b>
Teste de Tanaka .....	50
Teste de Engelhardt .....	58
Teste SRM 870 .....	59
Visão geral sobre os testes cromatográficos .....	62
<b>Referências</b> .....	<b>65</b>
<b>Capítulo 3: Chromatographic evaluation of some stationary phases based on poly(methyloctylsiloxane) immobilized onto silica</b> .....	<b>69</b>
<b>Abstract</b> .....	<b>69</b>
<b>Introduction</b> .....	<b>70</b>
<b>Materials and methods</b> .....	<b>72</b>
Chemicals and reagents .....	72
Preparation of the stationary phases .....	74
Mobile phase preparation .....	75
Liquid chromatography .....	75
Tanaka test procedure .....	76
Hierarchical cluster analysis (HCA) and statistics .....	77
<b>Results and discussion</b> .....	<b>78</b>
Evaluation of PMOS phases with the Tanaka test .....	78
Classifications using HCA .....	79

The applicability of the stationary phase based on PMOS thermally immobilized on silica .....	80
<b>Conclusions</b> .....	82
<b>References</b> .....	83
<b>Capítulo 4: Chromatographic evaluation using basic solutes of the silanol activity of stationary phases based on poly(methyloctylsiloxane) immobilized onto silica</b> .....	85
<b>Abstract</b> .....	85
<b>Introduction</b> .....	86
<b>Experimental</b> .....	89
Chemicals and reagents .....	89
Preparation of the stationary phases.....	90
Commercial stationary phases .....	91
Mobile phase preparation.....	91
Physical characterization of the stationary phases.....	91
Percent carbon.....	91
Solid-state <sup>29</sup> Si CP-MAS NMR spectroscopy.....	92
Chromatographic evaluations .....	92
Chromatographic evaluation using a neutral mobile phase.....	93
Chromatographic evaluation using an acidic mobile phase.....	93
Effect of mobile phase pH and buffer type on retentions and asymmetry factors.....	93
Effect of buffer concentration.....	93
Software.....	94
<b>Results and Discussion</b> .....	94
Physical characterization of the stationary phases.....	94
Chromatographic evaluations .....	95
Chromatographic evaluation using a neutral mobile phase.....	95
Chromatographic evaluation using an acidic mobile phase.....	96
Effect of mobile phase pH and buffer type on retentions and asymmetry factors.....	97
Effect of buffer concentration.....	101
The applicability of some PMOS-SiO <sub>2</sub> stationary phases .....	102
<b>Conclusion</b> .....	106
<b>References</b> .....	106
<b>Capítulo 5: Evaluation of immobilized stationary phases. Part I: Effect of pH, temperature, buffer type and buffer concentration on chromatographic performance</b> .....	109
<b>Abstract</b> .....	109
<b>Introduction</b> .....	110

<b>Experimental</b> .....	<b>111</b>
Chemicals and reagents.....	111
Preparation of the stationary phases.....	113
Percent carbon .....	113
Mobile phase preparation.....	114
Chromatographic evaluations .....	114
Software.....	115
<b>Results and discussion</b> .....	<b>115</b>
Effect of mobile phase pH and buffer type on retention factors and asymmetry factors.....	115
Effect of buffer concentration.....	120
Effect of temperature. ....	122
<b>Conclusions</b> .....	<b>123</b>
<b>References</b> .....	<b>124</b>
<b>Capítulo 6: Evaluation of immobilized stationary phases. Part II: Effect of pH, temperature, buffer type and buffer concentration on stability</b> .....	<b>127</b>
<b>Abstract</b> .....	<b>127</b>
<b>Introduction</b> .....	<b>128</b>
<b>Experimental</b> .....	<b>129</b>
Chemicals and reagents.....	129
Preparation of the stationary phases.....	130
Mobile phase preparation.....	130
Stability evaluations.....	130
Software.....	132
<b>Results and discussion</b> .....	<b>132</b>
Effect of highly alkaline mobile phases at ambient temperature. ....	132
Effects of pH and temperature with phosphate buffers. ....	134
Effects of ammonia and triethylamine buffer concentrations, pH and temperature. ....	136
Effects of carbonate and borate buffers.....	138
Stability at low pH.....	140
<b>Conclusions</b> .....	<b>140</b>
<b>References</b> .....	<b>142</b>

<b>Capítulo 7: Characterization of several stationary phases prepared by thermal immobilization of poly(methyltetradecylsiloxane) onto silica surfaces.....</b>	<b>143</b>
<b>Abstract.....</b>	<b>143</b>
<b>Introduction.....</b>	<b>144</b>
<b>Experimental.....</b>	<b>146</b>
<b>Chemicals and reagents.....</b>	<b>146</b>
<b>Preparation of the stationary phases.....</b>	<b>147</b>
<b>Physical characterization of the stationary phases.....</b>	<b>149</b>
<i>Percent carbon.....</i>	149
<i>Solid-state <sup>29</sup>Si CP-MAS NMR spectroscopy.....</i>	149
<i>Surface area and porosity—BET/BJH.....</i>	149
<b>Mobile phase preparation.....</b>	<b>150</b>
<b>Chromatographic Evaluations.....</b>	<b>150</b>
<i>Engelhardt test [4].....</i>	151
<i>SRM 870 test [6,25].....</i>	151
<i>Tanaka test [9].....</i>	152
<b>Effect of mobile phase pH and buffer type on retentions and asymmetry factors.....</b>	<b>153</b>
<b>Effect of buffer concentration.....</b>	<b>153</b>
<b>Stability evaluations.....</b>	<b>153</b>
<i>Acidic mobile phase.....</i>	154
<i>Basic mobile phase.....</i>	154
<b>The applicability of some PMTDS-SiO<sub>2</sub> stationary phases.....</b>	<b>154</b>
<b>Data analysis.....</b>	<b>155</b>
<b>Results and discussion.....</b>	<b>155</b>
<b>Physical characterizations of the stationary phase.....</b>	<b>155</b>
<b>Chromatographic evaluations.....</b>	<b>157</b>
<i>Engelhardt test.....</i>	157
<i>SRM 870 test.....</i>	158
<i>Tanaka test.....</i>	159
<b>Classifications using HCA.....</b>	<b>160</b>
<i>Classifications using HCA and literature data for the SRM 870 test.....</i>	160
<i>Classifications using HCA and literature data for the Tanaka test.....</i>	163
<i>Comparison between the classifications obtained using the SRM 870 test and Tanaka test.....</i>	166
<b>Effect of mobile phase pH and buffer type on retention and asymmetry factor. .</b>	<b>166</b>
<b>Effect of buffer concentration.....</b>	<b>169</b>
<b>Stability Evaluation.....</b>	<b>170</b>
<i>Acidic mobile phase.....</i>	170
<i>Basic mobile phase.....</i>	173

<b>The applicability of some PMTDS-SiO<sub>2</sub> stationary phases .....</b>	<b>175</b>
<b><i>Conclusion</i> .....</b>	<b>179</b>
<b><i>References</i> .....</b>	<b>179</b>
<b><i>Capítulo 8: Conclusões e propostas futuras. ....</i></b>	<b>183</b>
<b><i>Conclusões dos capítulos</i> .....</b>	<b>183</b>
<b><i>Conclusões gerais e propostas futuras.....</i></b>	<b>188</b>
<b><i>Referências</i> .....</b>	<b>190</b>



## Capítulo 1: Apresentação do trabalho

Esta tese de doutorado, intitulada “**Propriedades cromatográficas e estabilidade de fases estacionárias preparadas pela imobilização térmica de polissiloxanos sobre a sílica**”, será apresentada no formato alternativo, conforme Inf.-CPG 01/2008, no qual cinco dos seus oito capítulos correspondem a artigos científicos submetidos ou publicados, oriundos do trabalho desenvolvido.

Em vista disso, a tese está estruturada da seguinte forma:

**Capítulo 1:** Apresentação do trabalho, seus objetivos e a justificativa de seu desenvolvimento.

**Capítulo 2:** Revisão objetiva da literatura pertinente aos temas abordados neste trabalho.

**Capítulo 3:** Artigo intitulado “**Chromatographic evaluation of some stationary phases based on poly(methyloctylsiloxane) immobilized onto sílica**”, que descreve a avaliação das fases estacionárias preparadas pela imobilização térmica do poli(metiloctilsiloxano) sobre a superfície da sílica (PMOS-SiO<sub>2</sub>) com o teste de Tanaka, comparando-se os valores obtidos com os da literatura.

**Capítulo 4:** Artigo intitulado “**Chromatographic evaluation using basic solutes of the silanol activity of stationary phases based on poly(methyloctylsiloxane) immobilized onto silica**”, no qual as fases estacionárias, preparadas no capítulo anterior, tiveram sua eficiência cromatográfica avaliada, inicialmente, frente a dois antidepressivos tricíclicos em fase móvel ácida e neutra, confirmando as conclusões obtidas no artigo do capítulo anterior. Posteriormente, foi feita a comparação das propriedades cromatográficas com uma fase PMOS-SiO<sub>2</sub> com percentagem intermediária de carbono (17,5%) e com duas fases comerciais (Nova-Pak C8 e Symmetry C8), avaliando-se os fatores de retenção e assimetria de diversas bases hidrofóbicas e hidrofílicas em fases móveis com valores de pH variando de 6 a 11,5 preparadas



com diversos tipos de tampão (fosfato, tricina, tris, citrato, etc.). Neste caso, a avaliação cromatográfica também envolveu o uso de fases móveis a pH 7 com duas concentrações de tampão fosfato (20 e 100 mmol/L).

**Capítulo 5:** Artigo intitulado “**Evaluation of immobilized stationary phases. Part I: Effect of pH, temperature, buffer type and buffer concentration on chromatographic performance**”, que apresenta a avaliação cromatográfica de quatro fases estacionárias PMOS-SiO<sub>2</sub> com diferentes percentagens de carbono com diversos compostos básicos hidrofílicos e hidrofóbicos, utilizando-se fases móveis com valores de pH variando de 6 a 11,5, preparadas com diversos tipos de tampão. Uma das fases estacionárias PMOS-SiO<sub>2</sub> com percentagem intermediária de carbono foi avaliada com fases móveis a pH 7 com três concentrações de tampão fosfato (10, 50 e 100 mmol/L) e em fase móvel preparada com tampão fosfato 20 mmol/L a pH 7 a três temperaturas (23, 40 e 60 °C).

**Capítulo 6:** Artigo intitulado “**Evaluation of immobilized stationary phases. Part II: Effect of pH, temperature, buffer type and buffer concentration on stability**”. Este capítulo avaliou como os parâmetros estudados no Capítulo 5 (efeito do pH da fase móvel, temperatura, tipo e concentração de tampão) afetam a estabilidade das fases estacionárias PMOS-SiO<sub>2</sub>.

**Capítulo 7:** Artigo intitulado “**Characterization of several stationary phases prepared by thermal immobilization of poly(methyltetradecylsiloxane) onto silica surfaces**”. Neste capítulo, as fases estacionárias preparadas pela imobilização térmica do poli(metiltetradecilsiloxano) (PMTDS-SiO<sub>2</sub>) foram avaliadas com alguns testes clássicos, tais como os de Engelhardt, SRM 870 e de Tanaka, e comparadas com valores da literatura quando submetidas aos testes SRM 870 e de Tanaka. Para entender as propriedades cromatográficas das fases estacionárias PMTDS-SiO<sub>2</sub>, uma fase estacionária com uma quantidade intermediária de carbono foi avaliada com diversos solutos básicos em uma faixa de pH de 6 a 11,5 usando diversos tipos de tampões, e com fases móveis a pH 7 com várias concentrações de tampão fosfato (10, 50 e 100 mmol/L), como foi feito

para as fases estacionárias PMOS-SiO<sub>2</sub> nos capítulos 4 e 5. Adicionalmente, a estabilidade desta fase estacionária foi avaliada em meio ácido e alcalino.

### **Capítulo 8:** Conclusões e propostas futuras

A proposta geral deste trabalho, visa o preparo de fases estacionárias pela imobilização térmica de alguns polissiloxanos sobre a superfície da sílica e baseia-se no desenvolvimento de novas fases estacionárias, com ênfase em dois quesitos principais: a seletividade e a estabilidade.

Para isto os objetivos foram:

1. Imobilizar polissiloxanos sobre a superfície da sílica utilizando diferentes temperaturas, tempos de imobilização e porcentagens de poli(metiloctilsiloxano) (poli(metiloctilsiloxano)/sílica, m/m) para obter fases estacionárias com diferentes porcentagens de carbono.
2. Caracterizar as fases estacionárias com testes descritos na literatura como os testes de Engelhardt [1-3], SRM 870 [4-6] e Tanaka [7-8]
3. Comparar as fases estacionárias desenvolvidas com fases estacionárias comerciais. A comparação foi feita utilizando análise hierárquica de dados (do inglês Hierarchical Cluster Analysis, HCA) comparando os valores obtidos com os testes de Tanaka e SRM 870 com os valores da literatura, como é mostrado nos capítulos 3 e 7. As comparações também foram feitas pelas comparações de testes que avaliaram o efeito do pH da fase móvel, do tipo e da concentração de tampão sobre os fatores de retenção e assimetria de solutos básicos com uma fase preparada pela imobilização do poli(metiloctilsiloxano) sobre a superfície da sílica com duas fases estacionárias comerciais, como é mostrado no capítulo 4.
4. Avaliar o efeito do pH, do tipo e da concentração de tampão sobre os fatores de retenção e assimetria de solutos básicos, como foi mostrado nos capítulos 4, 5 e 7.
5. Avaliar o efeito do pH, do tipo e da concentração de tampão sobre a estabilidade das fases estacionárias, como foi mostrado nos capítulos 6 e 7.

As fases estacionárias desenvolvidas neste trabalho foram avaliadas no modo reverso e os solutos alvos deste trabalho foram compostos farmacêuticos básicos, uma vez que a indústria farmacêutica é uma das principais usuárias da técnica de RP-HPLC e os solutos básicos são a classe de compostos que oferece os maiores desafios na área de separações por RP-HPLC, devido a problemas como: altos fatores de assimetria, retenção excessiva, baixa eficiência e seletividade, que são normalmente atribuídos a fenômenos de troca iônica entre os solutos básicos e os silanóis livres na superfície da fase estacionária.

Fases estacionárias que possuem altas quantidades de silanóis livres são classificadas como “inapropriadas” para serem utilizadas na análise de solutos básicos, uma vez que, quanto maior a quantidade de silanóis residuais livres mais interações de troca iônica irão ocorrer. No entanto, as fases estacionárias preparadas por reações de entrecruzamento de polímeros sobre a superfície da zircônia, que são comercializadas pela ZirChrom (estas fases estacionárias serão descritas no capítulo 2) possuem altas propriedades de troca iônica e muitos grupos capazes de fazer interações de troca iônica desprotegidas e ainda fornecem picos simétricos, alta eficiência e seletividade na análise de compostos básicos [9]. Desta forma, já se era sabido que a imobilização de polissiloxanos (e polímeros em geral) sobre a superfície da sílica ocorre na forma de gotas [10] deixando uma grande quantidade de silanóis residuais desprotegidos na superfície da fase estacionária, o principal objetivo deste trabalho foi avaliar se as fases estacionárias preparadas pela imobilização de polissiloxanos sobre a sílica são apropriadas para análise de compostos básicos. Para tanto utilizou-se testes-padrões descritos na literatura (testes de Engelhardt, SRM 870 e Tanaka) para avaliar as fases estacionárias. Variáveis que influenciam na ionização dos silanóis e dos solutos, e nas interações que podem ocorrer entre os solutos e os silanóis como: pH da fase móvel; o tipo e concentração de tampão e a temperatura também foram avaliadas para entender como estas influenciam a retenção e assimetria de solutos básico com estas fases estacionárias e quais as condições são mais apropriadas para serem utilizadas na análise de solutos básicos.

É conhecimento comum que a sílica se dissolve em meio alcalino quando se utiliza tampões carbonato e fosfato, enquanto as ligações Si-C são hidrolisadas em meio ácido causando degradação da fase estacionária. Sendo assim, foram avaliadas as estabilidades de algumas fases estacionárias em meio ácido, neutro e alcalino utilizando tampões inorgânicos (fosfato, carbonato e borato), orgânicos (tros, tricina e trietilamina) e amônia para observar em que condições estas fases estacionárias seriam mais estáveis e apropriadas para serem empregadas na análise de solutos básicos.

## Referências

1. H. Engelhardt, M. Jungheim, *Chromatographia* 29 (1990) 59-68.
2. H. Engelhardt, M. Arangio, T. Lobert, , *LC–GC Int.* 10 (1997) 803-812.
3. S.J. Schmitz, H. Zwanziger, H. Engelhardt, *J. Chromatogr.* 544 (1991) 381-391.
4. L. Sander, S.A. Wise, *J. Sep. Sci.* 26 (2003) 283-294.
5. National Institute of Standards and Technology, SRM 870, Column Performance Test Mixture, Gaithersburg, MD, 2002.
6. <http://www.usp.org/USPNF/columnsDB.html> acessado em 2 de fevereiro de 2010.
7. K. Kimata, K. Iwaguchi, S. Onishi, K. Jinno, R. Eksteen, K. Hosoya, M. Arki, N. Tanaka, *J. Chromatogr. Sci.* 27 (1989) 721-728.
8. <http://www.acdlabs.com/resources/freeware/> Acessada em 22 de Setembro de 2010.
9. D.V. McCalley, *J. Chromatogr. A* 1217 (2010) 858–880.
10. K. E. Collins, M.L.M.M. Granja, R. G. Pereira Filho, T.A. Anazawa, I.C.S.F. Jardim, *Chromatographia* 45 (1997) 99-103.



## **Capítulo 2: Revisão bibliográfica**

A cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC, do inglês *high performance liquid chromatography*) tem uma ampla aceitação como técnica analítica, sendo bastante utilizada em muitas áreas, tais como: ciências da vida, alimentos, petroquímica, agroquímica, polímeros sintéticos, química ambiental, farmacêutica, controle de qualidade, etc. Atualmente, o desenvolvimento ainda continua e a disponibilidade de fases estacionárias e equipamentos de alta tecnologia são fatores primordiais para o crescente interesse em pesquisas e aplicações de HPLC. O modo mais usado desta técnica é o modo reverso (RP-HPLC, do inglês: *reversed phase high performance liquid chromatography*) devido às suas inúmeras vantagens, tais como: uso de fases móveis de menor custo e menor toxicidade; rápido equilíbrio da coluna após a mudança de fase móvel; possibilidade da condução de separações no modo de eluição por gradiente, resultando em maior rapidez e melhor separação nas análises; boa repetibilidade dos tempos de retenção; amplo campo de aplicação, devido à possibilidade de separação de compostos de diferentes polaridades, massas molares e funcionalidades; dentre outras [1,2].

A coluna cromatográfica recheada com a fase estacionária é responsável pela separação dos analitos e muitos estudos são conduzidos para se obter novas fases estacionárias, cuja principal ênfase está voltada para dois quesitos principais: a seletividade e a estabilidade. Melhores seletividades são importantes para que se obtenha melhores separações entre os solutos. Maior estabilidade da fase estacionária em condições adversas, como fases móveis a valores extremos de pH ( $2 \leq \text{pH} \leq 10$ ) e temperaturas maiores que 60 °C, permitem maior flexibilidade no desenvolvimento dos métodos e maior vida útil das fase estacionária.

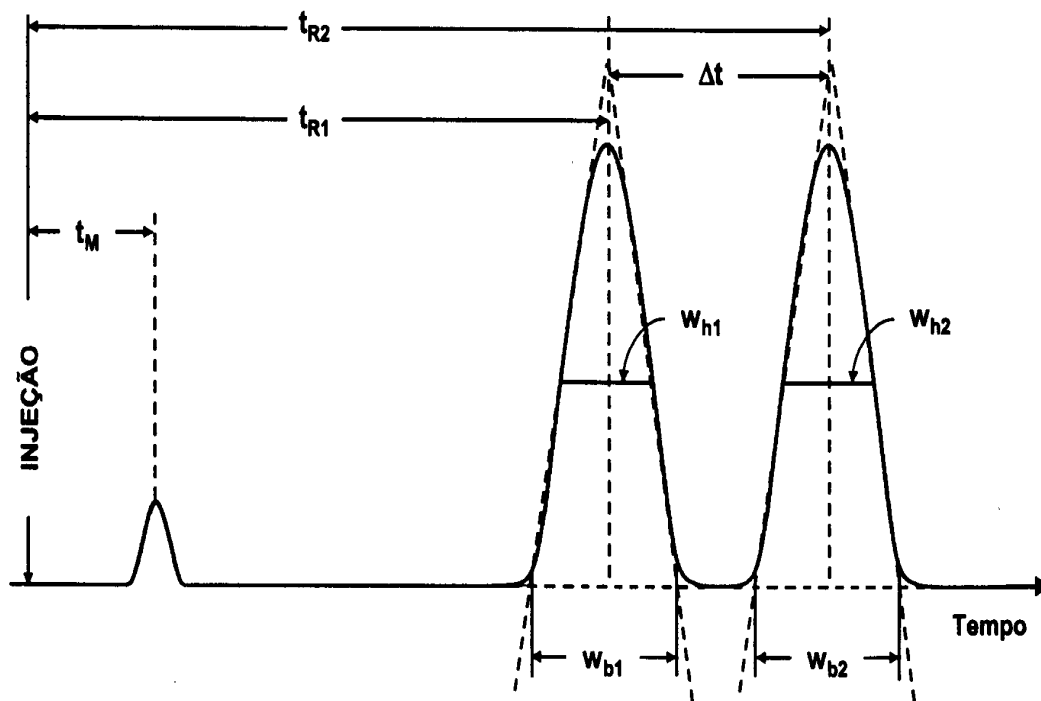
Esta revisão bibliográfica se dedica a descrever de uma maneira geral as propriedades cromatográficas das fases estacionárias, tendo por foco os solutos básicos, uma vez que, os solutos básicos são uma classe de compostos que são largamente analisados por RP-HPLC e apresentam problemas como: altos fatores

de assimetria, retenção excessiva, baixa eficiência e seletividade que são normalmente atribuídos a fenômenos de troca iônica entre os solutos básicos e os silanóis livres na superfície da fase estacionária, os quais definem as propriedades cromatográficas das mesmas.

Esta revisão foi elaborada para responder algumas questões que não são claras para alguns usuários da técnica de RP-HPLC como: Qual é a influência do pH, do tipo e da concentração de tampão sobre a retenção e seletividade de solutos básicos? Qual é a influência do pH, do tipo e da concentração de tampão sobre a seletividade de solutos básicos? Qual é o pH ( $\text{pH}_w^s$ ) de uma fase móvel após a adição de modificador orgânico? Dentre os testes de Engelhardt [3-5], SRM 870 [6-8] e Tanaka [9-8] que são os testes mais utilizados na literatura [11], que informações eles podem trazer a respeito de uma fase estacionária? Se uma fase estacionária X apresenta melhor eficiência e fator de assimetria que uma fase estacionária Y para a amitriptilina em fase móvel 80:20 (v/v) metanol:tampão fosfato (pH 7; 20 mmol), isto garante que a fase estacionária X é mais apropriada que a fase estacionária Y para analisar antidepressivos em fase móvel 50:50 (v/v) metanol:tampão acetato (pH 4,5; 20 mmol/L)? Como selecionar uma fase estacionária ortogonal ou paralela a uma fase estacionária utilizada anteriormente?

## **Descrição dos parâmetros cromatográficos utilizados nas avaliações.**

As colunas cromatográficas recheadas com as fases estacionárias são avaliadas através de parâmetros cromatográficos, que são calculados a partir de medidas obtidas nos cromatogramas. A Figura 2.1 mostra um cromatograma típico com as principais medidas obtidas, no qual:



**Figura 2.1:** Cromatograma com as medidas relacionadas à determinação de parâmetros cromatográficos (Figura adaptada da referência 12) .  
no qual:

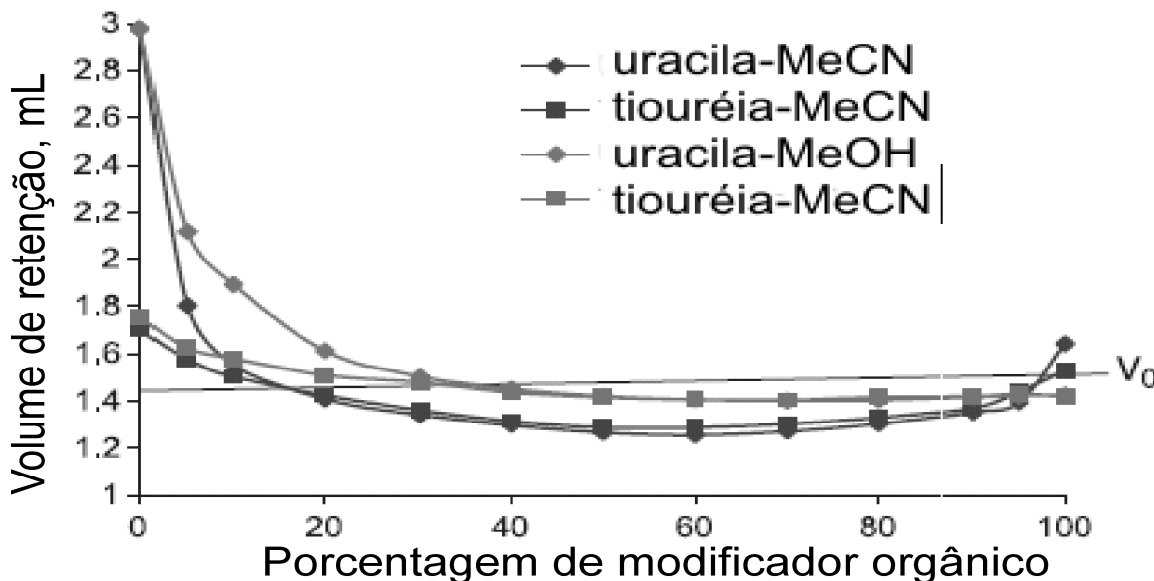
$w_b$  é a largura do pico na linha de base;

$w_h$  é a largura do pico à meia altura;

$t_M$  é o tempo de retenção de um composto não retido pela fase estacionária, isto é, o tempo gasto pela fase móvel, na qual a amostra injetada se encontra diluída, para percorrer a coluna cromatográfica e conexões até a cela do detector. O  $t_M$  é medido pelo tempo de retenção de um soluto não retido. Os solutos que são considerados não retidos em RP-HPLC e, normalmente utilizados para tal fim, são a uracila e tiouréia. No entanto, estes solutos não são totalmente não retidos em RP-HPLC e apresentam diferentes tempos de retenção em função da porcentagem e do tipo de modificador orgânico como é mostrado na Figura 2.2.

$t_R$  é o tempo de retenção do composto, isto é, o tempo que o composto leva para percorrer o sistema cromatográfico desde o momento de sua injeção até o registro do máximo de seu pico.





**Figura 2.2:** Variação do volume de retenção ( $V_M$ ) da uracila e da tiouréia em função do tipo e da quantidade de modificador orgânico. Coluna: Restek Allure-C18 150 × 4,6 mm.  $V_M = t_M \times F$ , onde  $F$  é a vazão da fase móvel (Figura adaptada da referência 15).

O tempo que um composto fica retido na fase estacionária, tempo de retenção ajustado ( $t'_R$ ), é obtido pela diferença entre o tempo total gasto pelo composto no sistema cromatográfico ( $t_R$ ) e o tempo em que ele se encontra na fase móvel ( $t_M$ ),  $t'_R = t_R - t_M$ .

O **fator de retenção** ( $k$ ), que está relacionado com a retenção de um soluto, é determinado pela razão entre os tempos em que o soluto fica retido na fase estacionária ( $t'_R$ ) e percorrendo a coluna na fase móvel ( $t_M$ ), como mostra a

**Eq. 1**

$$\text{Eq. 1} \quad k = \frac{t_R - t_M}{t_M} = \frac{t'_R}{t_M}$$

O valor de  $k$ , idealmente, deve estar entre 1 e 10, sendo que valores abaixo de 2 significam pouca interação do soluto com a fase estacionária e acima de 10 forte interação e alto tempo de análise [10].

O **fator de separação** ( $\alpha$ ), que é calculado pela razão entre os respectivos fatores de retenção, está relacionado aos tempos de retenção ajustados, segundo a **Eq. 2**.

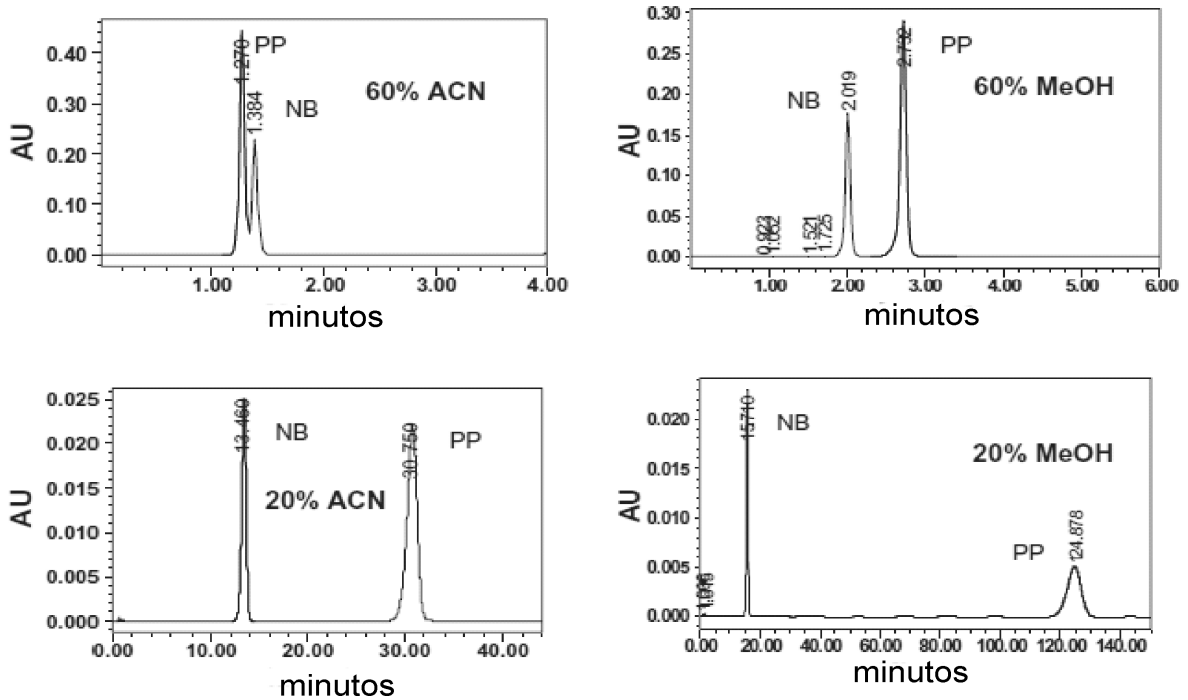
Eq. 2

$$\alpha = \frac{k_2}{k_1} = \frac{t'_{R2}}{t'_{R1}}$$

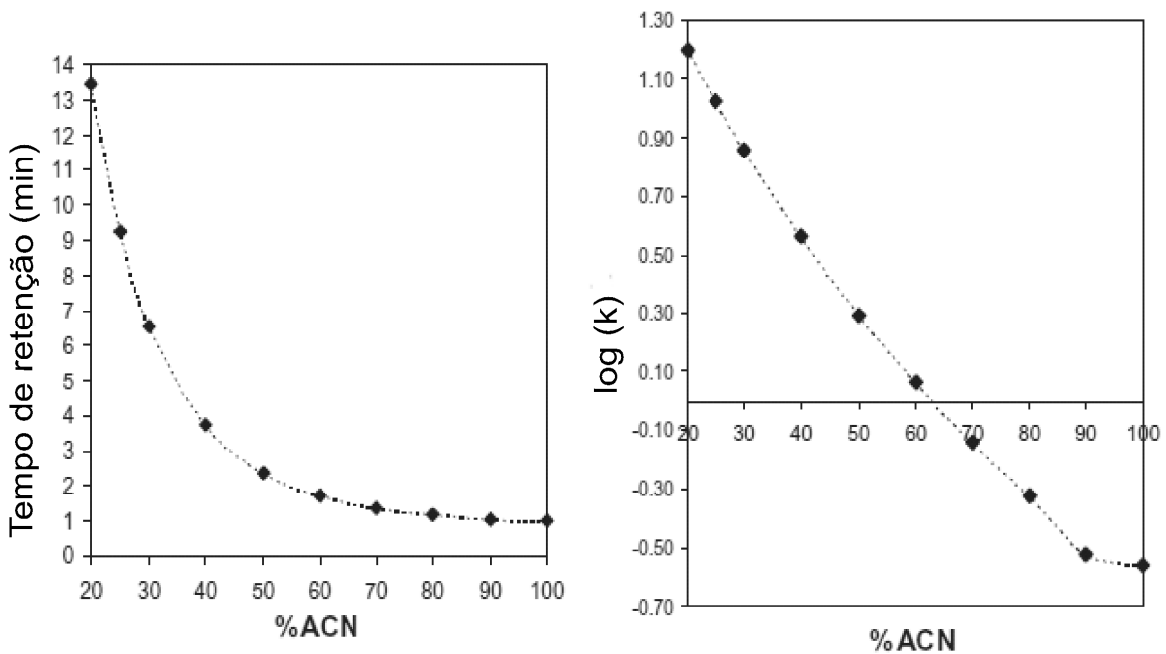
Em RP-HPLC, a seletividade de compostos neutros pode ser ajustada pela quantidade e tipo de modificador orgânico na fase móvel, como mostra o exemplo da Tabela 2.1, onde o nitrobenzeno e o propilparabeno são pouco retidos em fases móveis com concentrações de modificador orgânico superiores a 60%. A redução da percentagem de modificador orgânico na fase móvel resulta em maiores tempos de retenção e de fatores de retenção, bem como maior seletividade, à custa do aumento do tempo de análise. No entanto esta separação é mais seletiva com metanol e uma seletividade aceitável aliada a um pequeno tempo de retenção podem ser obtidas com 60% de metanol na fase móvel enquanto a seletividade obtida com uma fase móvel com 60% de acetonitrila é pobre, como ilustra a Figura 2.3

**Tabela 2.1:** Tempo de retenção ( $t_R$ ), fator de retenção ( $k$ ) e seletividade ( $\alpha$ ) do nitrobenzeno (NB) e do propilparabeno (PP) em função da percentagem e do tipo de modificador orgânico. Coluna: Symmetry C18, 3  $\mu$ m, 75  $\times$  4,6 mm, Waters. Vazão: 1mL/min. Temperatura 40 °C. (Tabela adaptado da referência 13)

<b>%ACN</b>	<b><math>t_R</math>(NB), min</b>	<b><math>k</math>(NB)</b>	<b><math>t_R</math>(PP), min</b>	<b><math>k</math>(PP)</b>	<b><math>\alpha</math> (PP/NB)</b>
100	1,02	0,28	1,02	0,28	1
90	1,04	0,3	1,04	0,3	1
80	1,18	0,48	1,12	0,39	0,83
70	1,38	0,73	1,27	0,59	0,81
60	1,73	1,16	1,57	0,96	0,83
50	2,37	1,96	2,29	1,86	0,95
40	3,73	3,66	3,73	3,66	1
30	6,55	7,19	8,62	9,78	1,36
25	9,25	10,56	15,35	18,19	1,72
20	13,46	15,83	30,75	37,44	2,37
<b>%MeOH</b>	<b><math>t_R</math>(NB),min</b>	<b><math>k</math>(NB)</b>	<b><math>t_R</math>(PP), min</b>	<b><math>k</math>(PP)</b>	<b><math>\alpha</math> (PP/NB)</b>
100	1,02	0,28	1,02	0,28	1
90	1,08	0,35	1,08	0,35	1
80	1,25	0,56	1,25	0,56	1
70	1,5	0,88	1,68	1,1	1,26
60	2,02	1,53	2,73	2,41	1,58
50	3,05	2,81	5,65	6,06	2,16
40	5,07	5,34	14,36	16,95	3,18
30	8,91	10,14	41	50,25	4,96
25	11,78	13,73	74	91,5	6,67



**Figura 2.3:** Cromatogramas de algumas das separações do nitrobenzeno e do propilparabeno descritas na Tabela 2.1 (adaptado da referência 13).



**Figura 2.4:** Variação do tempo de retenção e do fator de retenção do nitrobenzeno em função dos fatores de retenção da Tabela 2.1 (Figura adaptado da referência 13)

Outras observações que podem ser feita a respeito dos exemplos da Tabela 2.1 e da Figura 2.3 são: a acetonitrila é um eluente mais forte que o

metanol e menores quantidades de acetonitrila podem ser usadas para atingir a mesma força eluotrópica obtida com metanol; o tempo de retenção decresce exponencialmente em função da percentagem de modificador orgânico utilizado ou, em outras palavras, o fator de retenção decresce logaritmicamente em função da percentagem de metanol na fase móvel, como é ilustrado na Figura 2.4

A **eficiência** apresentada pela coluna é medida em termos do número de pratos, N. Um prato é equivalente a uma etapa de equilíbrio do soluto entre a fase estacionária e a fase móvel e é calculado pela Eq. 3:

$$\text{Eq. 3} \quad N = 16 \left( \frac{t_R}{W_b} \right)^2 = 5,545 \left( \frac{t_R}{W_h} \right)^2$$

Quanto maior o comprimento da coluna maior a eficiência. Para efeitos de comparação entre colunas, em RP-HPLC, a eficiência é expressa em termos de número de pratos por metro (N/m), calculado através da divisão do número de pratos da coluna pelo seu comprimento em metros, ou pela **altura do prato, H**, que é a razão entre o comprimento da coluna (L), expressa em metros, e o número de pratos (N) calculada pela **Eq. 4**.

$$\text{Eq. 4} \quad H = \frac{L}{N}$$

A eficiência de uma coluna também pode ser expressa por meio da equação de van Deemter (**Eq. 5**), em função da altura de prato (H) e da velocidade linear ( $\mu$ ) da fase móvel, expressa pela (**Eq. 6**).

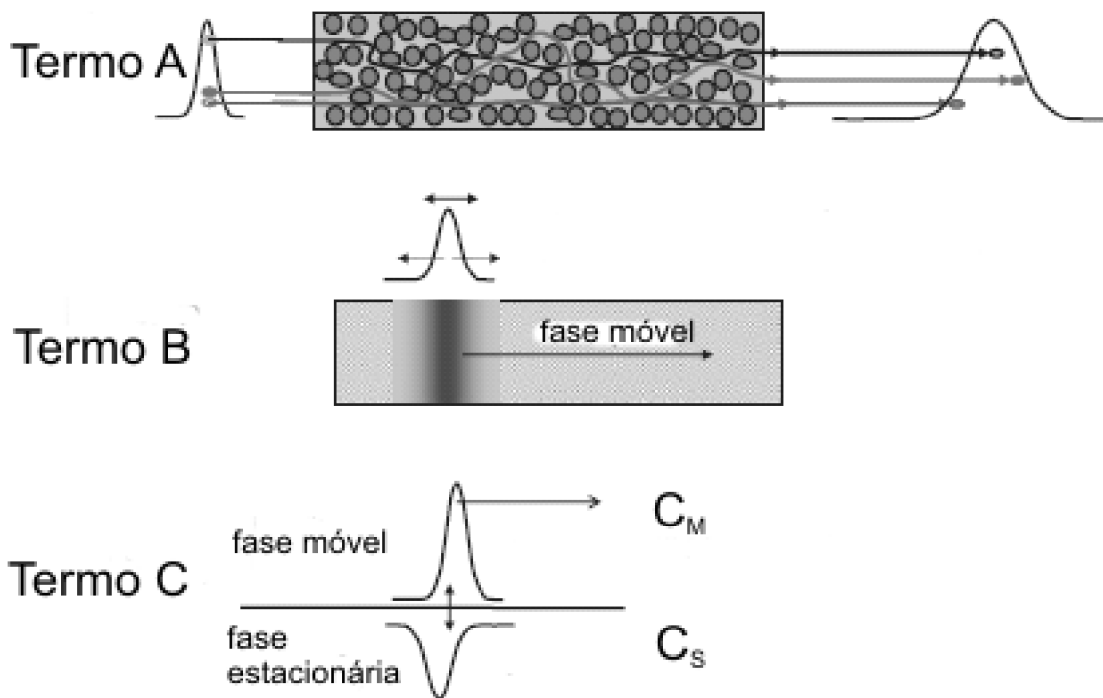
$$\text{Eq. 5} \quad H = A + \frac{B}{\mu} + C\mu$$

$$\text{Eq. 6} \quad \mu = \frac{L}{t_M}$$

Os termos A, B e C da equação de van Deemter (**Eq. 5**) são ilustrados na Figura 2.5. O termo A, difusão turbilhonar, refere-se ao alargamento dos picos, devido aos diferentes caminhos percorridos pelas moléculas do soluto. Este termo pode ser minimizado usando colunas bem recheadas e partículas com tamanho uniforme.

O termo B, difusão longitudinal, está relacionado com a difusão molecular do soluto na fase móvel e pode ser minimizado empregando-se altas velocidades lineares da fase móvel. Este termo é mais importante em cromatografia gasosa do que em RP-HPLC, já que o coeficiente de difusão dos solutos nos líquidos é muito menor que nos gases.

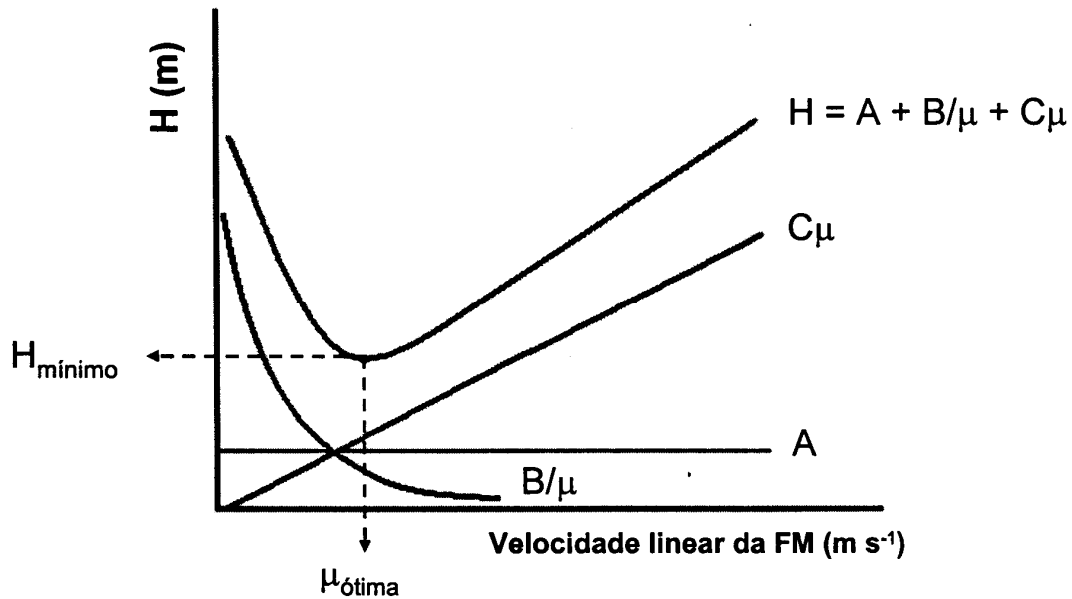
O termo C equivale à transferência de massa e corresponde ao alargamento da banda devido à dificuldade de transferência de massa do soluto entre a fase móvel e a fase estacionária. O termo C está subdividido em  $C_M$  e  $C_S$ , onde  $C_M$  é a transferência de massa na fase móvel e  $C_S$ , a transferência de massa na fase estacionária. Para minimizar o termo C, o ideal é que a espessura da fase estacionária que recobre o suporte seja a menor possível.



**Figura 2.5:** Ilustração dos termos A, B e C da equação de van Deemter (Eq. 5). (Figura adaptada da referência 13)

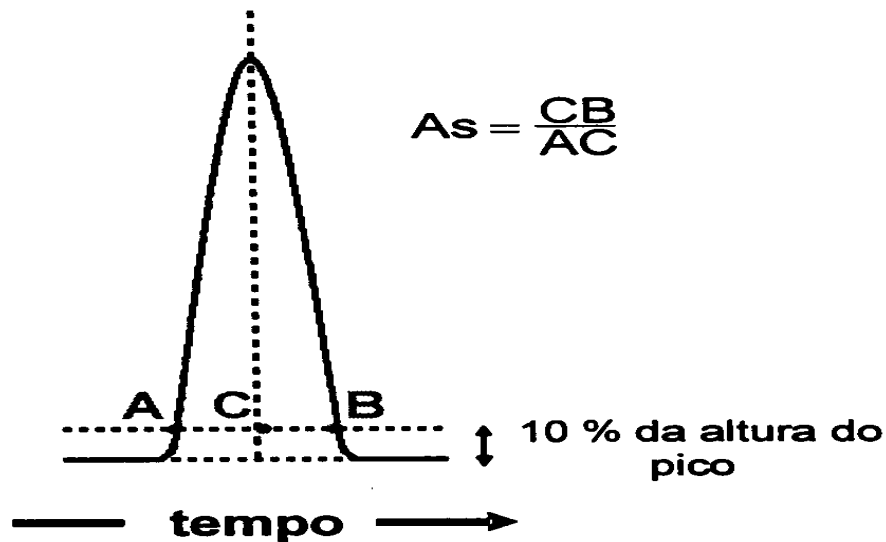
O gráfico de  $H$  vs  $\mu$  fornece uma curva como a da Figura 2.6 que é conhecida como a curva de van Deemter. A curva de van Deemter mostra que existe uma vazão ótima, que está diretamente relacionada com a velocidade linear ótima ( $\mu_{ótima}$ ), na qual  $H$  terá um valor mínimo e corresponde ao valor máximo de

eficiência da coluna. Na prática, esta é a maneira de selecionar a vazão ótima de uma corrida cromatográfica.



**Figura 2.6:** Curva da equação de Van Deemter (Figura adaptada da referência 14).

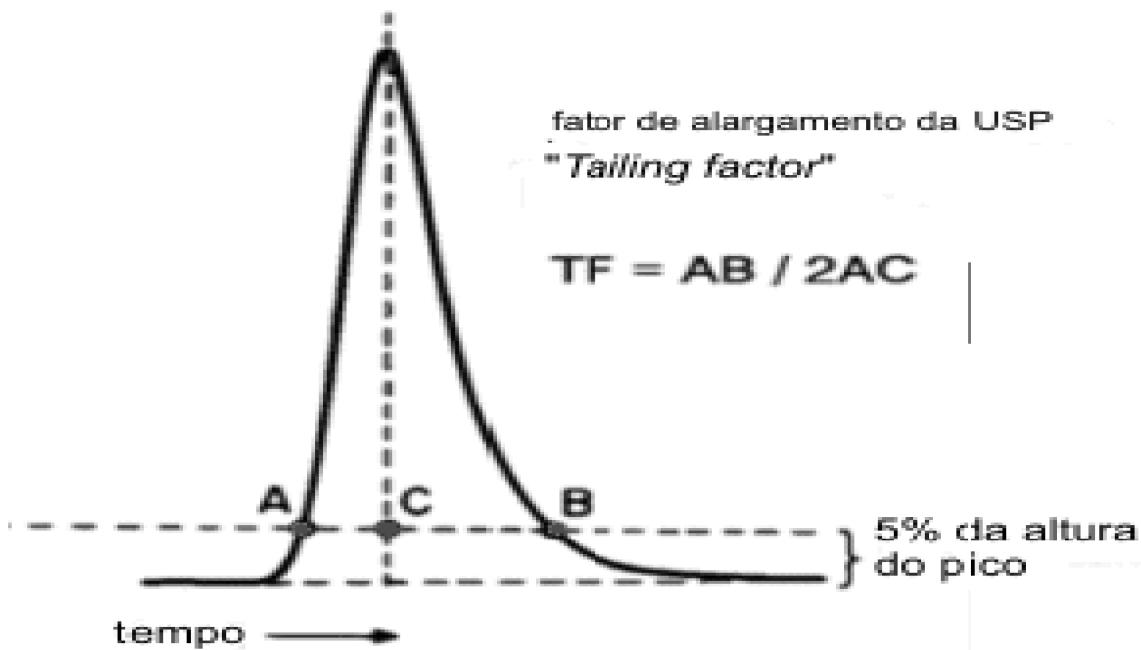
A simetria dos picos é avaliada pelo **fator de assimetria dos picos ( $A_s$ )**, a 10 % da altura do pico, como mostra a Figura 2.7.



**Figura 2.7:** Medida e cálculo do fator de assimetria do pico. (Figura adaptada da referência 14).

A farmacopéia norte americana (“United States Pharmacopeia”, *USP*) recomenda que a assimetria seja medida como mostra a Figura 2.8. O fator de

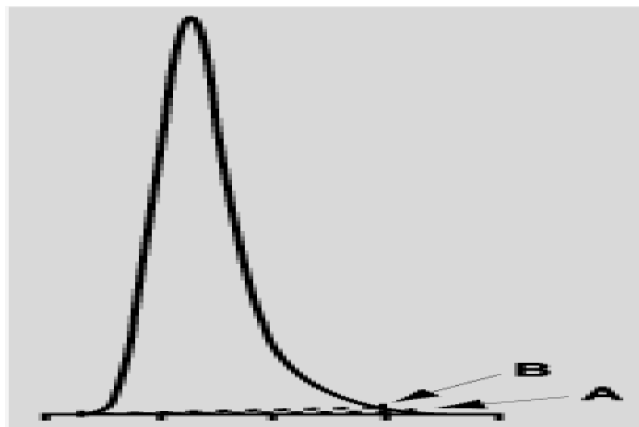
assimetria segundo a USP é conhecido como fator de alargamento do pico (do inglês *USP tailing factor, Tf*).



**Figura 2.8:** Medida e cálculo do fator de alargamento do pico, segundo a USP. (Figura adaptada da referência 16).

A assimetria (medida como  $A_s$  ou  $T_f$ ) dificulta a identificação do final do pico pelo sistema de aquisição de dados, causando erros na determinação da área dos picos, como é mostrado na Figura 2.9, onde a determinação do final do pico em B faz com que a área medida seja 3% menor do que quando o final do pico é determinado em A.

A expressão para o cálculo do número de pratos só é válida para picos simétricos. Isso faz com que a medida de simetria seja um parâmetro cromatográfico de relevância. Normalmente a assimetria ocorre mediante a interações secundárias dos solutos básicos com os silanóis residuais na fase estacionária como será discutido mais a frente neste texto.



**Figura 2.9:** Ilustração de como a assimetria dos picos ocasiona erros na determinação da área do pico (Figura adaptada da referência 17).

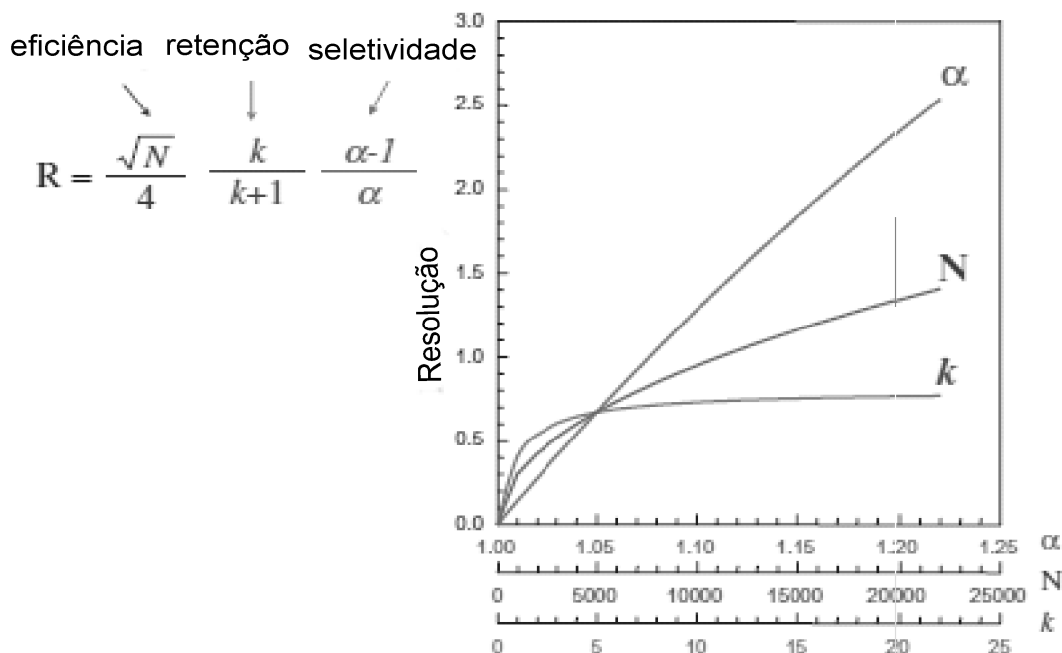
A **resolução ( $R_s$ )** é o parâmetro que avalia a separação entre dois picos adjacentes e é calculada a partir da diferença entre os tempos de retenção divididos pela média das larguras de suas respectivas bases ( $w_b$ ), como mostra a **Eq. 7**

$$\text{Eq. 7} \quad R_s = 2 \left( \frac{t_{R2} - t_{R1}}{w_{b1} + w_{b2}} \right) = 1,177 \left( \frac{t_{R2} - t_{R1}}{w_{h1} + w_{h2}} \right)$$

O principal objetivo em cromatografia é obter a separação dos picos, portanto, a **resolução** é o fator mais importante a ser estudado e, sendo que a **resolução** é uma função da eficiência, do fator de retenção e da seletividade, a **Eq. 7** pode ser rearranjada na forma da **Eq. 8** com a aproximação que  $w_{b1} = w_{b2}$ . A **Figura 2.10** ilustra como a resolução varia em função da eficiência, do fator de retenção e da seletividade

$$\text{Eq. 8} \quad R_s = \left( \frac{\sqrt{N_2}}{4} \right) \left( \frac{k_2}{k_2 + 1} \right) \left( \frac{\alpha - 1}{\alpha} \right)$$



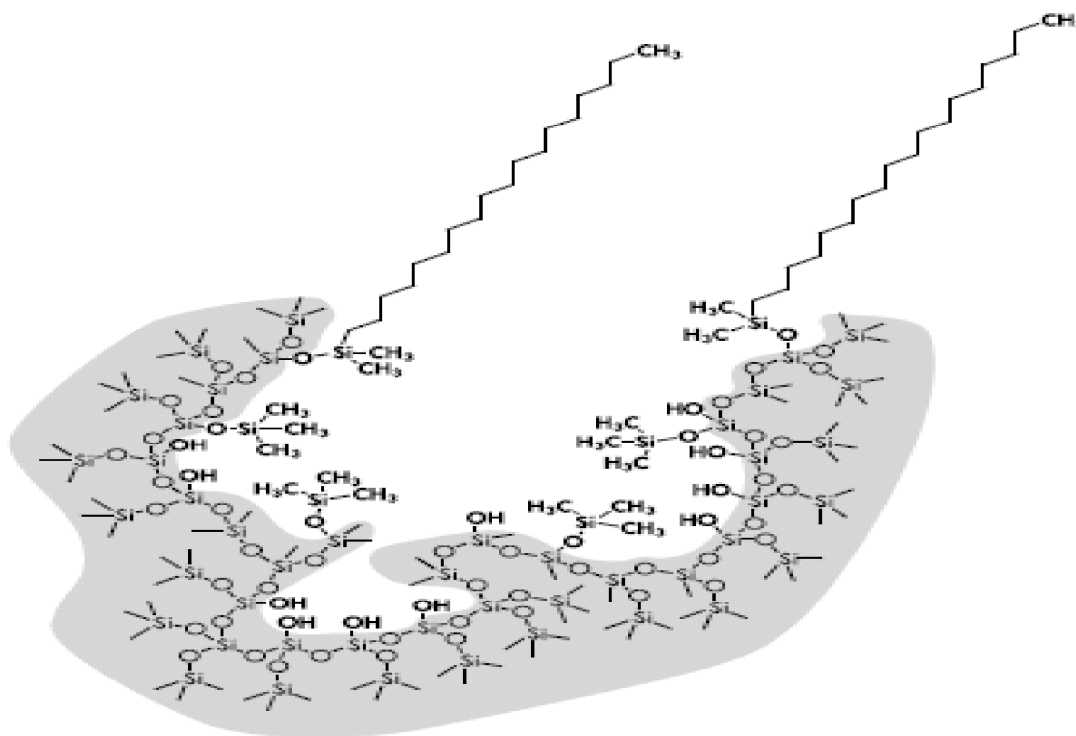


**Figura 2.10:** Efeito da retenção, da eficiência e da seletividade sobre a resolução (adaptado da referencia [10])

De acordo com a **Eq. 8** e a **Figura 2.10**, o aumento do fator de retenção resultara em melhores resoluções apenas quando os solutos forem pouco retidos (fatores de retenção menores que 1) e fatores de retenção maiores que 10 aproximam o termo da equação ( $k/k+1$ ) a unidade. A resolução aumenta proporcionalmente a raiz quadrada da eficiência e fases estacionárias que apresentam maior eficiência para os solutos-alvo devem ser utilizadas. Dobrar o comprimento da coluna não é uma alternativa plausível, pois ao se dobrar o comprimento da coluna, o tempo de análise dobra e a resolução aumenta em apenas  $\sqrt{2}$  ou 41%. Já um aumento na seletividade de 1,05 para 1,10 faz com que a resolução aumente em duas vezes. Como mostrado nos exemplos da Figura 2.3 e Tabela 2.1 a seletividade pode ser alterada pela percentagem de modificador orgânico na fase móvel, pelo tipo de modificador orgânico utilizado e pelo uso de uma fase estacionária com maior seletividade para os solutos que se deseja separar. Alguns outros fatores afetam a seletividade de compostos básicos devido às propriedades químicas da sílica as quais serão discutidos na próxima seção.


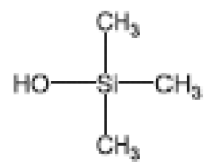

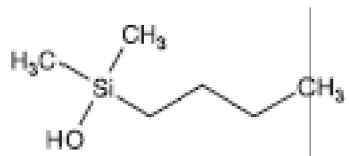

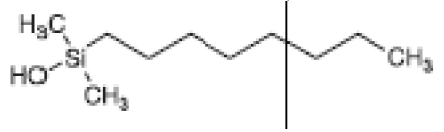

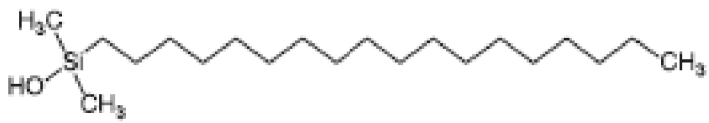
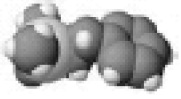
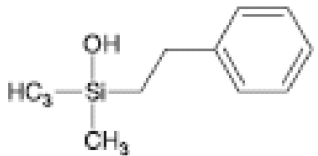
## Fases estacionárias e seletividade cromatográfica.


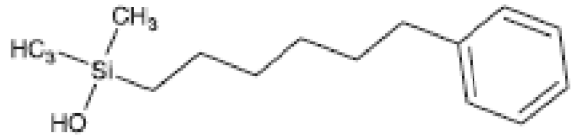

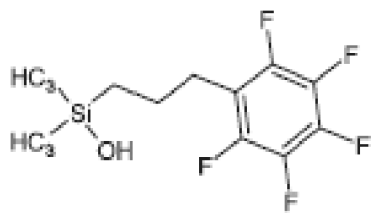
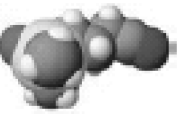
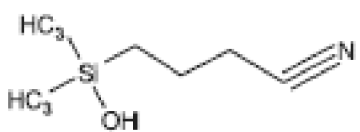

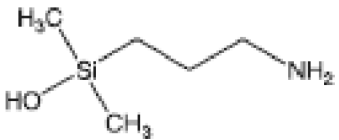

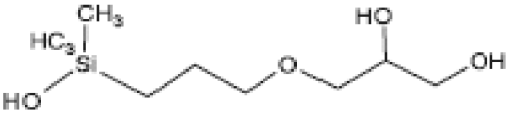
A maioria das fases estacionárias preparadas para serem utilizadas em RP-HPLC resultaram da reação química entre um ligante químico, que geralmente é um silano com grupo apolar volumoso, com os silanóis na superfície da sílica, com subsequente reação entre um ligante químico com grupos hidrofóbicos menores para reagir com os silanóis que não reagiriam na primeira etapa, denominada processo de capeamento, como mostra a Figura 2.11. Entretanto, mesmo após a reação de capeamento, restam muitos silanóis livres na superfície da sílica (Figura 2.11). A Tabela 2.2. mostra alguns exemplos de ligantes utilizados para preparar fases estacionárias.



**Figura 2.11:** Ilustração da superfície de uma fase quimicamente ligada do tipo C18 ou ODS (adaptando da referência 15)

**Tabela 2.2:** Parâmetros estruturais e geométricos de alguns ligantes químicos utilizados no preparo de fases estacionárias (adaptado da referência 15).

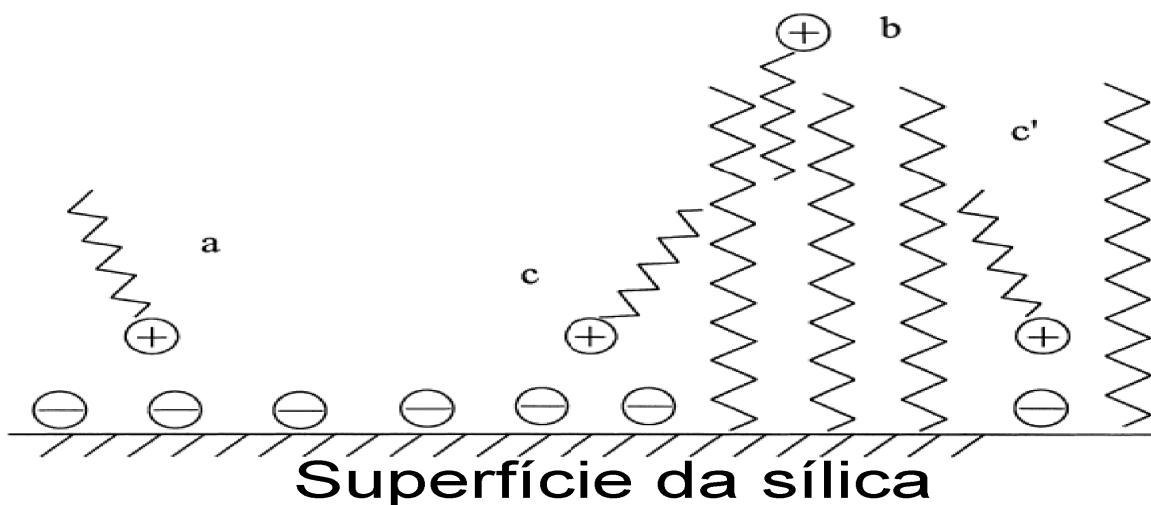
<i>Estrutura</i>	<i>Fórmula estrutural</i>	<i>nome</i>	<i>Volume<sup>a</sup> (Å<sup>3</sup>/molécula)</i>	<i>Comprimento (Å)</i>
		<b>C1</b>	<b>150</b>	<b>3,7</b>
		<b>C4</b>	<b>259</b>	<b>7,5</b>
		<b>C8</b>	<b>365</b>	<b>13</b>
		<b>C18</b>	<b>630</b>	<b>24</b>
		<b>Etil- fenil</b>	<b>303</b>	<b>9,2</b>

		<b>Hexil-fenil</b>	<b>408</b>	<b>14</b>
		<b>Propil-fenil</b>	<b>363</b>	<b>10,6</b>
		<b>Ciano-propil</b>	<b>248</b>	<b>7,8</b>
		<b>Amino-propil</b>	<b>238</b>	<b>7</b>
		<b>Diol</b>	<b>314</b>	<b>11,5</b>

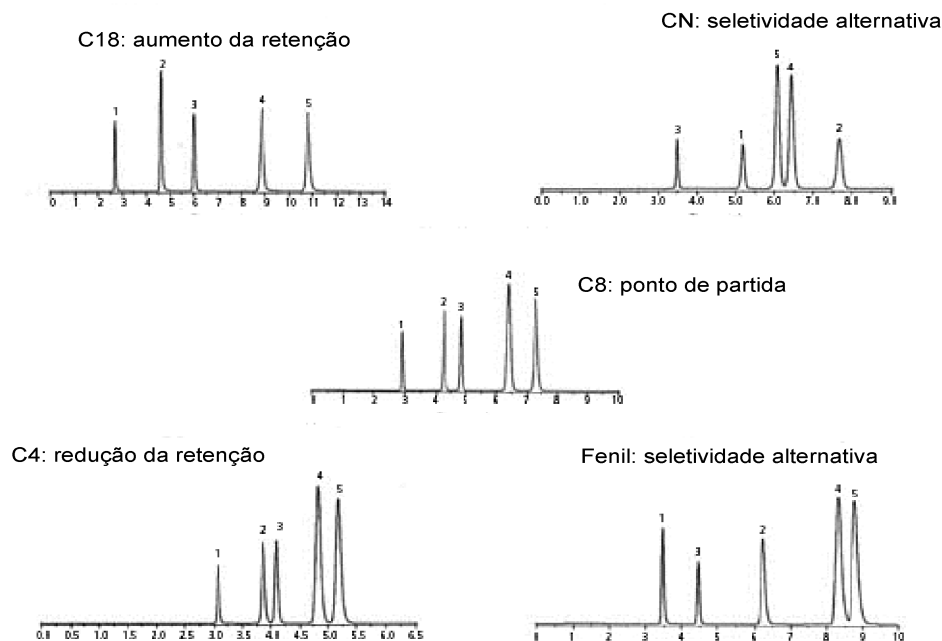
<sup>a</sup> Volume molar calculado com o programa ACD versão 9.3.

<sup>b</sup> Comprimento do ligante calculado pelo programa ACD, assumindo que o mesmo se encontra na posição trans

Em RP-HPLC os solutos neutros são retidos por interações hidrofóbicas dos solutos com as cadeias hidrofóbicas ligadas covalentemente a superfície da sílica. No entanto, quando os solutos a serem separados são básicos, ocorrem interações destes com os silanóis residuais presentes na superfície da sílica. A Figura 2.12 mostra um exemplo destas interações, onde os solutos podem ser retidos tanto interações iônicas puramente iônicas (com os silanóis residuais ionizados), como é mostrado na Figura 2.12a, como serem retidos por interações puramente hidrofóbicas com as cadeias hidrofóbicas covalentemente ligadas à sílica, como é mostrado na Figura 2.12b. Também ocorrem interações com sítios, que combinam interações hidrofóbicas e iônicas de maneira sinérgica, formando sítios altamente retentivos, como é mostrado na Figura 2.12c e c'. Desta forma, diferentes seletividades podem ser obtidas quando diferentes tipos de ligantes reagem com a superfície do mesmo tipo de sílica, como é mostrado na Figura 2.13, onde o uso de uma fase estacionária do tipo C18, ao invés de uma fase C8, resulta no aumento da retenção. O uso de uma fase C4 resulta na diminuição da retenção e, ainda, o uso de fases fenil ou ciano resultam em seletividades distintas das seletividades obtidas com as fases estacionárias C4, C8 e C18. Por outro lado, o que realmente define as propriedades de uma fase estacionária é o tipo de sílica utilizado em seu preparo.



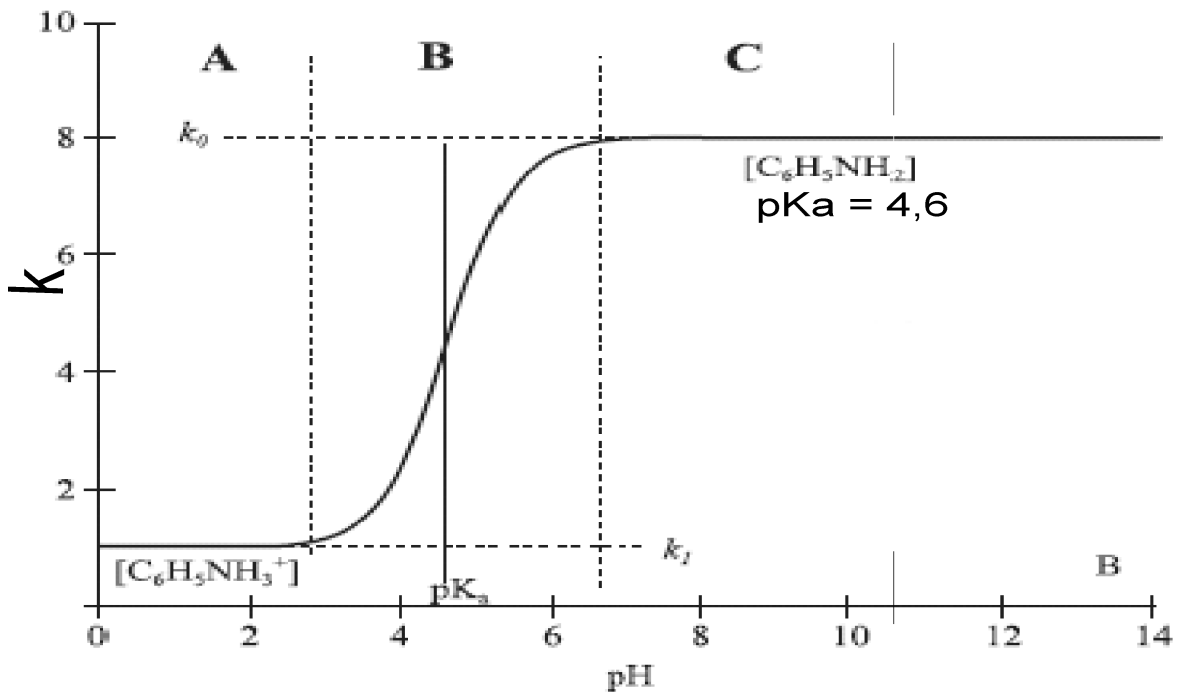
**Figura 2.12:** Interações de solutos básicos com a superfície da sílica: a) interações iônicas; b) interações hidrofóbicas; c e c') interações hidrofóbicas e iônicas (adaptado da referência 19)



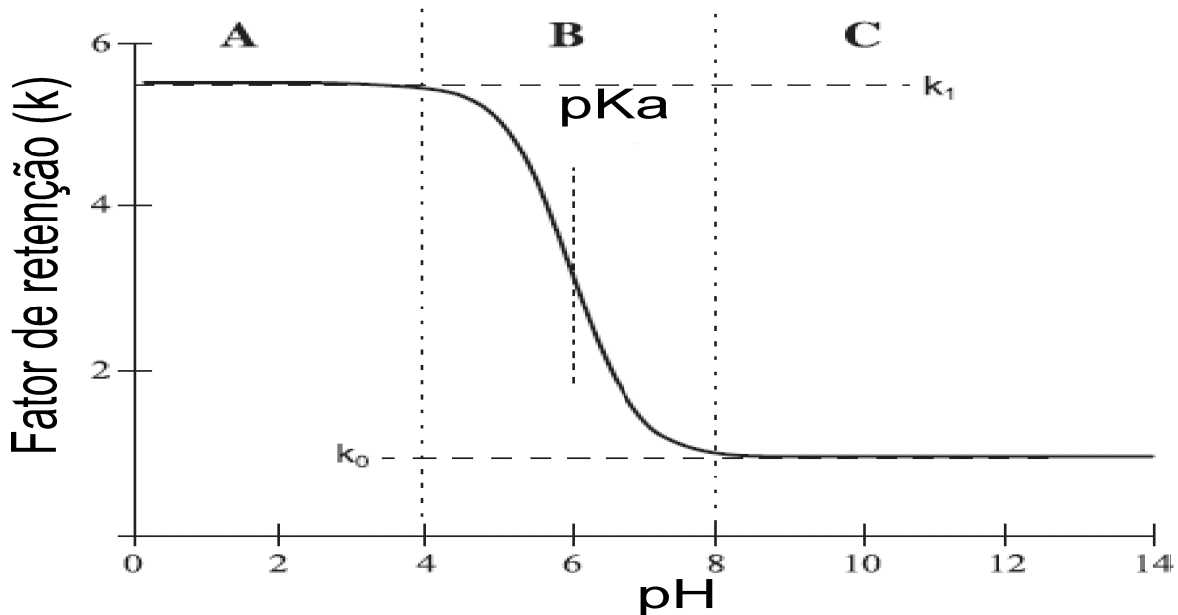
**Figura 2.13:** Diferentes seletividades obtidas para uma mistura de compostos básicos com fases estacionárias preparadas com diferentes tipos de ligantes químicos sobre a mesma sílica. Colunas: 250 x 4,6 mm, dp 5  $\mu$ m, todas da ACE. Fase móvel: metanol:tampão fosfato (pH 6; 25 mmol/L) 80:20 (v/v). Vazão: 1.5 mL/min. Identificação dos solutos: 1 = norefedrina; 2 = nortriptilina; 3 = tolueno; 4 = amitriptilina; 5 imipramina. (Figura adaptada da referência 20)

A seletividade de compostos neutros pode ser alterada pela percentagem e pelo tipo de modificador orgânico, como nos exemplos da Tabela 2.1 e Figura 2.3. No entanto, quando os solutos a serem separados são bases, a seletividade da separação pode ser alterada pelo pH da fase móvel, uma vez que o grau de ionização dos solutos e dos silanóis residuais dependem do pH da fase móvel. Normalmente, a retenção de bases fracas ( $pK < 5$ ) segue um comportamento semelhante ao ilustrado na Figura 2.14. Na região A, o pH da fase móvel é duas unidades menor que o  $pK_a$  do soluto-teste e o mesmo se encontra 100% na sua forma iônica. Por isso este é pouco retido por interações hidrofóbicas. Na região ao redor de B, o pH da fase móvel está entre uma unidade a mais e uma unidade a menos que o  $pK_a$  do soluto e pequenas variações no pH resultam em grandes variações na retenção devido a grandes variações no grau de ionização do soluto. Na região C, o pH da fase móvel é duas unidades maior que o  $pK_a$  do soluto, que se encontra como base livre, fazendo com que a retenção atinja seu valor máximo

uma vez que o soluto não ionizado será mais retido por interações hidrofóbicas do que em sua forma iônica.



**Figura 2.14:** Variação da retenção de uma base fraca em função do pH da fase móvel. (adaptado da referência 15).



**Figura 2.15:** Variação da retenção de um soluto ácido em função do pH da fase móvel. (adaptado da referência 15).

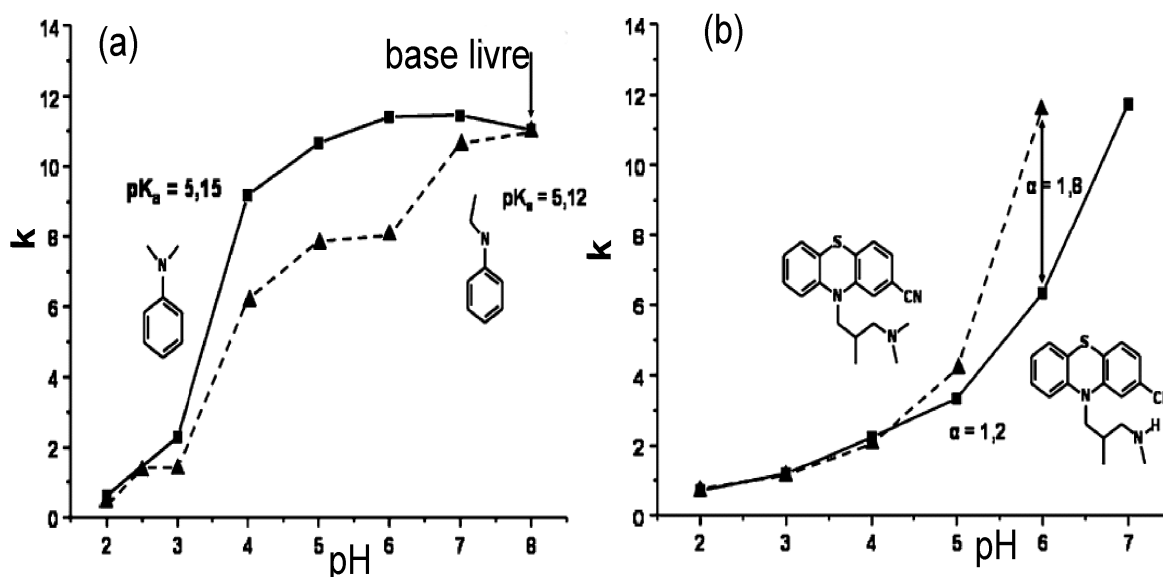
A seletividade de compostos ácidos segue um comportamento semelhante a das bases fracas, como é mostrado na Figura 2.15. Na região A, o pH da fase

móvel é duas unidades menor que o pKa do soluto ácido e este se encontra 100% protonado. Sua retenção atinge seu valor máximo. Já ao redor de B, o pH da fase móvel é uma unidade maior ou menor que o pKa do soluto e pequenas variações no pH da fase móvel resultam em grandes variações no valor do fator de retenção. Na região C, o pH da fase móvel é duas unidades maior que o pKa do soluto e nestes valores de pH o soluto está 100% desprotonado e, por isso, fica pouco retido por interações hidrofóbicas. Conseqüentemente, a retenção atinge seu valor mínimo.

No exemplo da Figura 2.14 o soluto-teste é a anilina, que é uma base fraca com pKa 4.6, que realiza poucas interações de troca iônica com os silanóis residuais na fase estacionária. Neste caso a retenção é governada apenas pelo grau de ionização do soluto, a exemplo do que ocorre com os solutos ácidos que dificilmente interagem com os silanóis residuais. Mas quando os solutos a serem separados tem pKa > 5 estes podem realizar interações de troca iônica com os silanóis residuais da fase estacionária, além do fato da sua seletividade também ser governada pelo grau de ionização dos silanóis na superfície da fase estacionária (Figura 2.16) [19]. Na Figura 2.16a a N,N-dimetilanilina e N-etilanilina, que possuem hidrofobicidade semelhante, coeluem em pH 2 e são pouco separadas em pH 3, uma vez que nesta faixa de pH os solutos e os silanóis residuais se encontram 100% protonados e suas interações hidrofóbicas e iônicas são suprimidas. Os compostos começaram a ser bem separados em pH 5 e 6, onde os solutos e os silanóis residuais estão parcialmente ionizados e a separação ocorre devido as interações dos solutos com os silanóis residuais. No entanto, em pH 8, os solutos se encontram na forma de bases livres e a separação não ocorre devido a supressão das interações com os silanóis residuais, sendo que a semelhança da hidrofobicidade dos solutos não permite que os mesmos sejam separados apenas por interação hidrofóbicas. A Figura 2.16b mostra que na separação dos solutos desmetilciamemazina e clamemazina, que diferem em suas estruturas apenas por um grupo metil, a separação dos dois solutos não é possível em pH < 5, pois, nesta faixa de pH, os solutos e os silanóis residuais se encontram 100% protonados e as interações hidrofóbicas e iônicas



são suprimidas, enquanto que, em  $\text{pH} \geq 6$ , os solutos se encontram 100% ionizados e os silanóis residuais se encontram parcialmente ionizados. Nesta situação a separação destes compostos é possível devido a interações dos solutos com os silanóis residuais. Neste exemplo, a retenção dos solutos aumentou com o aumento do pH da fase móvel. Na faixa de pH estudada (2 a 7) a desmetilclamemazina e a clamemazina estão 100% ionizados sendo que o aumento da retenção foi devido ao aumento das interações dos solutos com os silanóis residuais.



**Figura 2.16:** Influência do pH da fase móvel sobre a seletividade de compostos básicos: (a) N,N-dimetilanilina (ambos os solutos,  $\text{pK}_a$  5,15), N-etilanilina ( $\text{pK}$  5,12) (b) N-desmetilclamemazina; clamemazina;  $\text{pK} > 9$  Coluna: Symmetry SH 18. Fase móvel: acetonitrila:tampão fosfato 20 mmol/L: água 35:35:30 (v/v/v). (Figura adaptado da referência 21).

Por sua vez a quantidade e o tipo de modificador orgânico utilizado na fase móvel, a exemplo do que ocorre com os solutos neutros, pode ser utilizada para alterar a seletividade das separações. No entanto, estes efeitos são mais intensos para compostos básicos, porque o pH real da fase móvel ( $\text{pH}_w^s$ ) é diferente do pH da fase aquosa ( $\text{pH}_s^s$ ) após a adição de modificador orgânico [22-24].

O pH da fase móvel após a adição de modificador orgânico varia em função do tipo de tampão (fosfato, carbonato, borato, tris, citrato, etc), do tipo de modificador orgânico (acetonitrila, metanol) e da quantidade de modificador

orgânico (20%, 30%, 80%, etc.). Na Tabela 2.3 segue um exemplo de como estes fatores podem alterar o pH final da fase móvel ( $\text{pH}_w^s$ ). Nesta tabela, fases móveis preparadas com tampões fosfato, borato, citrato, formato e acetato tiveram seu pH aumentando após a adição de modificador orgânico, enquanto fases móveis preparadas com tampões amônia, tris e piperazina tiveram seu pH reduzido após a adição de modificador orgânico. A comparação dos resultados obtidos com metanol e acetonitrila na Tabela 2.3 mostram que a adição de metanol causa maiores variação no pH final da fase móvel ( $\text{pH}_w^s$ ) do que a adição de quantidades iguais de acetonitrila. Por sua vez, a adição de modificador orgânico também altera o pKa dos solutos, como é mostrado na Tabela 2.4, onde a adição de quantidades iguais de metanol causam uma maior variação no pKa dos solutos do que a adição de acetonitrila.

**Tabela 2.3:** Variação do pH em função do tipo de tampão, da percentagem de modificador orgânico e do tipo de modificador orgânico. Todos os valores foram mesurados a 20 °C. (valores retirados das referências 22-24 ).

% de metanol na fase móvel	<i>pH</i>					
	0%	20%	40%	50%	60%	80%
H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub> -H <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> <sup>-</sup>	2,11	2,63	3,09	3,35	3,68	4,3
H <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> <sup>-</sup> -HPO <sub>4</sub> <sup>2-</sup>	7,2	7,55	8,04	8,36	8,75	9,58
H <sub>3</sub> Cit-H <sub>2</sub> Cit <sup>-</sup>	3,13	3,44	3,84	4,07	4,3	4,77
H <sub>2</sub> Cit <sup>-</sup> -Cit <sup>2-</sup>	4,76	5,12	5,53	5,8	6,1	6,64
HCit <sup>2-</sup> -Cit <sup>3-</sup>	6,4	6,83	7,39	7,66	7,96	8,6
HAc-Ac <sup>-</sup>	4,76	5,05	5,43	5,66	5,92	6,46
NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> -NH <sub>3</sub>	9,24	9,11	8,97	8,89	8,82	8,63
<b>% de acetonitrila na fase móvel</b>	<b>0%</b>	<b>20%</b>	<b>40%</b>	<b>50%</b>	<b>60%</b>	<b>80%</b>
H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub> -H <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> <sup>-</sup>	2,11	2,28	2,55		2,54	
H <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> <sup>-</sup> -HPO <sub>4</sub> <sup>2-</sup>	7,2	7,48	7,66		8,01	
H <sub>3</sub> Cit-H <sub>2</sub> Cit <sup>-</sup>	3,13	3,15	3,43		3,64	
H <sub>2</sub> Cit <sup>-</sup> -Cit <sup>2-</sup>	4,76	4,32	4,65		5,01	
HCit <sup>2-</sup> -Cit <sup>3-</sup>	6,4	6,55	6,84		7,28	
HAc-Ac <sup>-</sup>	4,76	5,39	5,8		6,47	
NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> -NH <sub>3</sub>	9,24	9,79	9,39		9,25	
H <sub>2</sub> CO <sub>2</sub> -HCO <sub>2</sub> <sup>-</sup>	3,72	3,96	4,4		4,87	
Piperazina(pKa1)	5,37	5,26	5,19		5,06	
Piperazina(pKa2)	9,76	9,62	9,53		9,42	
Tris	8,08	7,94	7,85		7,72	
Borato	9,23	9,85	10,43		11,00	
HCO <sub>3</sub> <sup>-</sup> -CO <sub>3</sub> <sup>2-</sup>	10,35	10,82	11,31		11,62	

**Tabela 2.4:** Variação do pKa de diversos solutos básicos em função da quantidade e do tipo de modificador orgânico utilizado. Todos os valores medidos a 25 °C. (Valores retirados das referências 25 e 26)

<i>acetoneitrila</i>	<b>70%</b>	<b><math>\Delta pK_a</math></b>	<b>60%</b>	<b><math>\Delta pK</math></b>	<b>40%</b>	<b><math>\Delta pK</math></b>	<b>30%</b>	<b><math>\Delta pK</math></b>	<b>20%</b>	<b><math>\Delta pK</math></b>	<b>0%</b>	<i>literatura</i>
nortriptilina	9,25	-0,94	9,43	-0,76	9,72	-0,47	9,84	-0,35	9,96	-0,23	10,19	10,0–10,11
difenidramina	8,24	-0,92	8,48	-0,68	8,78	-0,38	8,89	-0,27	9	-0,16	9,16	9,00–9,40
quinina	7,94	-0,54	8,11	-0,37	8,33	-0,15	8,38	-0,1	8,44	-0,04	8,48	8,39–8,52
codeína			7,56	-0,64	7,8	-0,4	7,9	-0,3	8,06	-0,14	8,2	7,83–8,21
procainamida	8,45	-0,87	8,68	-0,64	8,93	-0,39	9,05	-0,27	9,15	-0,17	9,32	9,20–9,40
benzilamina	8,86	-0,59	9,01	-0,44	9,15	-0,3	9,23	-0,22	9,33	-0,12	9,45	9,33–9,73
protriptilina	9,73	-0,98	9,88	-0,83	10,21	-0,5	10,31	-0,4	10,43	-0,28	10,71	10,7
amitriptilina	8,27	-1,05	8,53	-0,79	8,92	-0,4	9,09	-0,23	9,27	-0,05	9,32	9,40–9,45
<b><i>metanol</i></b>			<b>60%</b>	<b><math>\Delta pK</math></b>	<b>40%</b>	<b><math>\Delta pK</math></b>			<b>20%</b>	<b><math>\Delta pK</math></b>	<b>0%</b>	<i>literatura</i>
nortriptilina			9,72	-0,61	9,87	-0,46			10,11	-0,22	10,33	10-10,11
difenidramina			8,69	-0,56	8,92	-0,33			9,16	-0,09	9,25	9-9,4
quinina			8,34	-0,22	8,47	-0,09			8,59	-0,03	8,56	8,39-8,52
codeína			7,54	-0,71	7,84	-0,41			8,09	-0,16	8,25	7,83-8,21
procainamida			8,99	-0,43	9,16	-0,26			9,34	-0,08	9,42	9,2-9,42
benzilamina			8,78	-0,77	9,11	-0,44			9,38	-0,17	9,55	9,33-9,73

**Tabela 2.5:** Variação dos fatores de retenção em função do tipo de tampão utilizado e do pH<sub>w</sub><sup>s</sup>. Coluna: XTerra® MS-C18 de 150 x 4,6 mm. Fase móvel: acetoneitrila:tampão aquoso 35:75 (v/v) FM1 = H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>-KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> pH<sub>w</sub><sup>s</sup> 2,50; FM2 = HAC-NaAc, pH<sub>w</sub><sup>s</sup> 4,88; FM3 = Piperazina pH<sub>w</sub><sup>s</sup> 4,88; FM4 KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>-K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> pH<sub>w</sub><sup>s</sup> 8,47; tris pH<sub>w</sub><sup>s</sup> 8,47; FM6 = n-Butilamina pH<sub>w</sub><sup>s</sup> 11,30. Temperatura: 20 °C. Identificação dos solutos: 1= ácido fenilsuccínico 2 = ketoprofeno; 3 = suprofenos; 4 = fenbufeno; 5 = Propranolol; 6 = oxprenolol; 7 = atenolol; 8 = pindolol; 9 = acebutolol; 10 = metoprolol; 11 = quinina; 12 = quinidina; 13 = cinchonina; 14 = cinchonidina. (Valores retirados da referência 27)

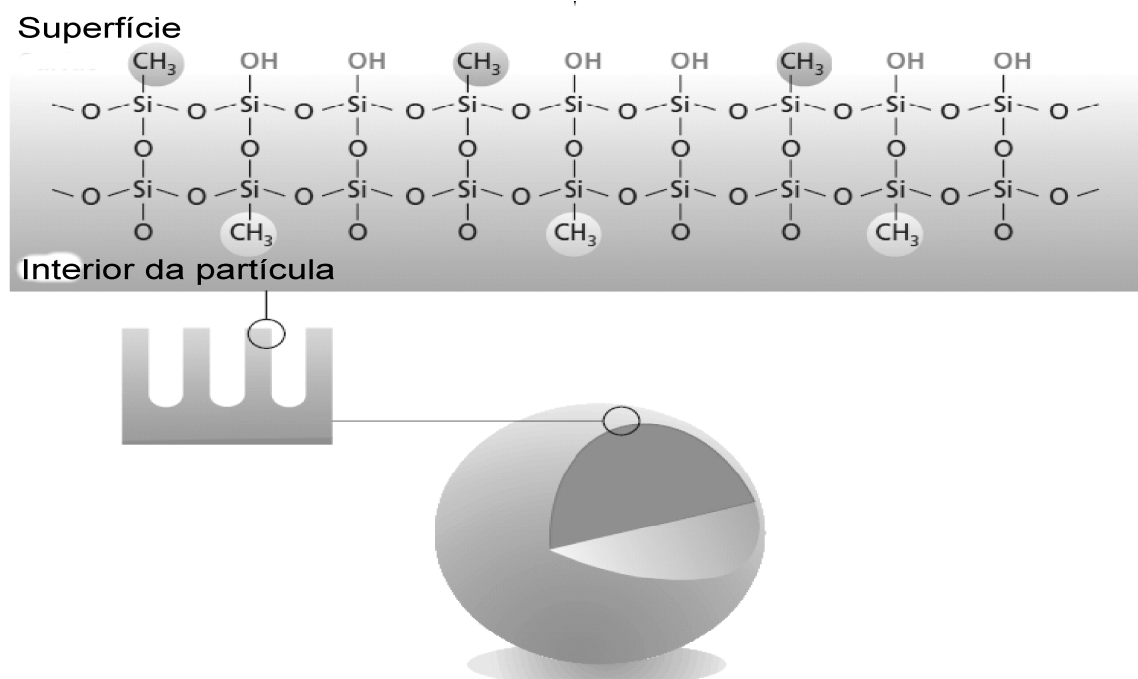
<i>solutos</i>	<b>1</b>	<b>2</b>	<b>3</b>	<b>4</b>	<b>5</b>	<b>6</b>	<b>7</b>	<b>8</b>	<b>9</b>	<b>10</b>	<b>11</b>	<b>12</b>	<b>13</b>	<b>14</b>
FM1	1,48	15,57	12,15	10,18	2,78	1,54	0,19	0,65	0,66	0,85	0,33	0,33	0,26	0,27
FM2	0,54	11,83	7,07	15,93	3,31	1,78	0,14	0,71	0,71	0,93	1,43	1,53	1,12	1,03
FM3	0,4	10,55	6,2	16,62	3,48	1,86	0,14	0,74	0,72	0,97	1,54	1,6	1,14	1,05
FM4	-0,02	0,92	0,66	–	6,19	2,69	0,14	0,92	0,82	1,39	7,81	7,9	6,03	5,47
FM5	-0,19	0,42	0,35	–	–	–	0,58	2,49	2,31	3,52	14,14	15,26	12,83	10,52
FM6	-0,11	0,25	0,17	–	6,04	11,5	0,92	4,48	3,37	6,2	15,75	17,6	12,05	10,01

Gagliardi et al. [27] estudaram como apenas o tipo de tampão utilizado altera a seletividade, avaliando os fatores de retenção para 4 solutos ácidos e 10 solutos básicos, com fases móveis preparadas com diferentes tampões, entretanto valores iguais de  $\text{pH}_w^s$ , como é mostrado na Tabela 2.5. A  $\text{pH}_w^s$  4,88 tampões acetato e piperazina forneceram fatores de retenção muito próximos, provavelmente porque neste valor de  $\text{pH}_w^s$  os solutos e os silanóis residuais estão protonados e suas interações secundárias estão reduzidas. No entanto, a  $\text{pH}_w^s$  8,47, onde os solutos estão parcialmente ionizados e os silanóis residuais estão desprotonados (ou ionizados), os fatores de retenção obtidos com tampão fosfato são maiores que os obtidos com tampão tris. Os fatores de retenção obtidos a  $\text{pH}_w^s$  11,3 com tampão n-butilamina são próximos dos valores obtidos com tampão fosfato a  $\text{pH}_w^s$  8,47, mostrando que a retenção de bases fortes também é governada por diferentes interações dos silanóis residuais com o tampão utilizado. Adicionalmente, o exemplo da Tabela 2.5 realça os exemplos das Figura 2.14, Figura 2.15 e Figura 2.16, onde o aumento do pH faz aumentar a retenção dos solutos básicos e diminuir a retenção dos solutos ácidos. Os solutos básicos utilizados no exemplo da Tabela 2.5 tem  $\text{pK}_{a_w}^w$  e  $\text{pK}_{a_w}^s > 9$ . O aumento dos fatores de retenção quando  $\text{pH}_w^s$  aumenta de 2,50 para 4,88 se deve a interações secundárias dos solutos com os silanóis residuais, uma vez que os solutos básicos estão 100% protonados em  $\text{pH}_w^s$  2,5-4,88.

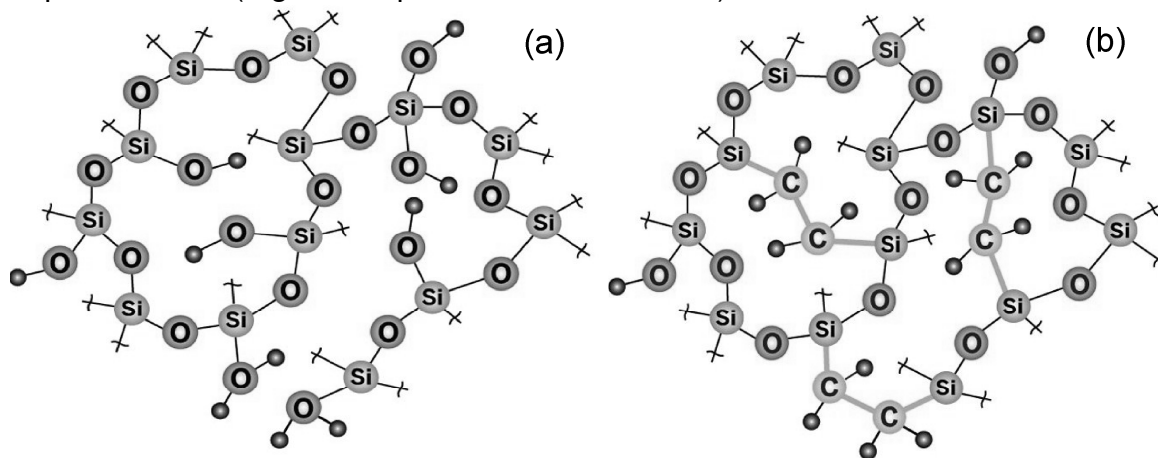
Interações secundárias são consideradas indesejáveis em RP-HPLC, sendo que levam a resultados insatisfatórios na análise de compostos básicos, como elevada assimetria, baixa eficiência, retenção excessiva dos solutos e pouca seletividade. Por outro lado, interações secundárias dos solutos com os silanóis residuais possam levar a uma maior seletividade, como no exemplo da Figura 2.16. Até o presente momento, todas as pesquisas voltadas para o desenvolvimento de novas fases estacionárias foram dirigidas à eliminação dos silanóis residuais e das interações secundárias.

Diversas tentativas foram feitas no intuito de diminuir a quantidade de silanóis residuais na superfície da sílica [1,28] entretanto, as únicas alternativas

que se mostraram úteis para eliminar os silanóis residuais na superfície da sílica foram as preparações de suportes cromatográficos através de processos híbridos. Os suportes híbridos comercializados pela Waters com os nomes XTerra™ e XBridge™ possuem ligações  $-\text{Si}-\text{CH}_3$  e  $-\text{Si}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{Si}-$ , respectivamente, em suas estruturas ao invés de simples ligações  $-\text{Si}-\text{O}-\text{Si}-$  e  $\text{Si}-\text{OH}$  [29,30]. A estrutura dos suportes híbridos XTerra™ e XBridge™ estão mostradas na **Figura 2.17** e **Figura 2.18**, respectivamente.



**Figura 2.17:** Ilustração de uma partícula de sílica híbrida XTerra™, na parte de baixo da figura segue um exemplo de uma partícula de sílica híbrida XTerra™, e na parte de cima da figura segue um exemplo de como é a superfície desta deste suporte híbrido (Figura adaptada da referência 29).



**Figura 2.18** (a) Estrutura da sílica (b) estrutura da sílica híbrida **XBridge™** (Figura adaptado da referência 31).

As fases estacionárias XTerra™ tem menos silanóis residuais que qualquer outra fase estacionária a base de sílica não-híbrida, sendo que alguns dos silanóis foram substituídos por grupos metil. Porém, a pequena quantidade de silanóis residuais que este suporte apresenta é capaz de interagir com solutos básicos como mostrado na Tabela 2.5, onde o fator de retenção de solutos com  $pK_{a_w}^w$  e  $pK_{a_w}^s > 9$  variou quando o  $pH_w^s$  da fase móvel aumentou de 2.50 para 4.88. No entanto, estas fases estacionárias fornecem ótimos formatos de pico (fatores de assimetria entre 0,95 e 1,11) para solutos básicos ( $pK_a > 9$ ) em fases móveis acetonitrila:tampão aquoso e metanol:tampão aquoso com valores de pH de 2,5, 7,0 e 9,5 [29]. A exemplo das fases estacionárias XTerra™, as fases estacionárias XBridge™ também fornecem ótimos formatos de pico para solutos básicos além de possuírem quantidades inexpressivas de silanóis residuais, uma vez que o processo de preparação destas fases estacionárias substitui alguns dos silanóis por pontes de etano.

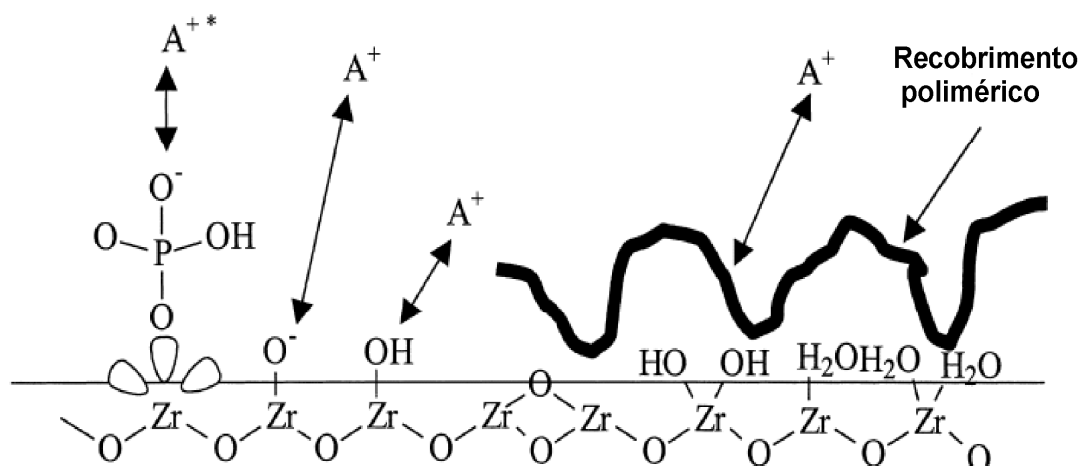
Davies et al. [32] estudaram as variação nos fatores de retenção de solutos básicos com as fases XTerra e XBridge, observando que o aumento do  $pH_w^s$  da fase móvel de 2.5 para 7 não ocasionou nenhuma variação nos fatores de retenção dos solutos básicos com a fase estacionária XBridge enquanto o aumento do  $pH_w^s$  da fase móvel de 2.5 para 7 ocasionou o aumento dos fatores de retenção com a fase estacionária XTerra RP18, como é mostrado na Tabela 2.6, verificando-se que as interações entre os solutos básicos e os silanóis residuais na fase estacionária XBridge são desprezíveis.

Como mencionado anteriormente, interações secundárias dos solutos básicos com sítios na superfície do suporte cromatográfico são indesejáveis e, em muitos casos, estas interações comprometem as separações. Algumas alternativas para suprimir interações secundárias podem ser usadas, tais como: (a) aumentar o pH da fase móvel a valores superiores em duas unidades ao  $pK_a$  dos solutos para garantir que os solutos e os silanóis residuais estejam 100% desprotonados suprimindo interações secundárias e aumentando as interações hidrofóbicas dos solutos com a fase estacionária ou (b) diminuir o pH da fase

móvel a valores entre 0,9 e 2,5 para garantir que os solutos e os silanóis residuais fiquem protonados e as interações secundárias sejam suprimidas e (c) utilizar fases estacionárias com uma pequena quantidade de silanóis residuais, tais como as fases estacionárias XTerra™ e XBridge™. No entanto, desde o ano de 2003, a ZirChrom comercializa fases estacionárias preparadas por reações de intercruzamento de polímeros sobre a superfície do óxido de zircônio, as quais apresentam grande quantidade de grupos capazes de fazer interações secundárias com solutos básicos, como é mostrado na Figura 2.19 [33-37]. Estas fases estacionárias, apesar de realizarem fortes interações de troca iônica com solutos básicos, tanto em meio neutro como ácido, fornecem picos simétricos e alta eficiência na análise de solutos básicos.

**Tabela 2.6:** Variação do fator de retenção, da eficiência e do fator de assimetria em função do  $\text{pH}_w^s$  da fase móvel de solutos básicos analisados com as fases estacionárias XBridge e XTerra RP 18. (valores retirados da referência 30)

	$\text{pH}_w^s = 2,5$			$\text{pH}_w^s = 7$			$\text{pH}_w^s = 10$		
	k	$N \times 10^3$	As	k	$N \times 10^3$	As	k	$N \times 10^3$	As
<b>XBridge</b>									
Amitriptilina	1,7	8,1	1,6	1,7	10,2	2,1	30,1	11	1,7
Benzilamina	0,7	7,58	1,3	0,7	8,59	2	ND	<350	ND
Nortriptilina	1,2	8,46	1,5	1,1	9,76	1,9	8,9	6,1	1,6
Propranolol	1,1	8,03	1,3	1,1	8,44	2,4	8,7	9,93	1,3
<b>XTerra RP18</b>									
Amitriptilina	2,5	10,2	1,1	4,9	10,1	1,2	45,9	11,2	1,1
Benzilamina	0,3	9,18	1,2	0,3	8,44	1,4	1,8	320	1,3
Nortriptilina	2,3	9,63	1,1	3	8,88	1,2	14,8	6,76	1,3
Propranolol	0,6	8,12	1,2	1,2	7,5	1,3	6,5	7,55	1,3



**Figura 2.19:** Superfície de uma fase estacionária preparada pelo recobrimento polimérico do óxido de zircônio e as diversas interações que um soluto catiônico

(A<sup>+</sup> base protonada) pode realizar com os diversos “sites” presentes nesta fase estacionária. (Figura adaptada da referência 19).

As fases estacionárias preparadas sobre o óxido de zircônio possuem área superficial de apenas 11,2 m<sup>2</sup>/g devido ao diâmetro de poro da zircônia ser de 300 Å, enquanto que fases estacionárias preparadas a partir da sílica ou sílica híbrida possuem área superficial entre 200 e 400 m<sup>2</sup>/g e diâmetro de poro entre 80 e 130 Å. A primeira vista parece que as fases ZirChrom são pouco retentivas devido a sua pequena área superficial. No entanto, estas fases estacionárias são mais retentivas para compostos básicos que as fases a base de sílica ou sílica híbrida devido a formação de sítios que combinam interações hidrofóbicas e de troca iônica (este tipo e mecanismo de retenção [19] é mostrado na Figura 2.19). A retenção de solutos básicos nas fases estacionárias ZirChrom acontecem principalmente nestes sítios, fazendo com que a retenção seja maior que aquela observada quando somente interações de troca iônica ou meramente hidrofóbicas acontecem [19, 33-37]. Um exemplo disto segue na Tabela 2.7 onde é mostrado que a fase ZirChrom PDB é mais retentiva para as p-alquilaminas que a zircônia sem recobrimento polimérico.

**Tabela 2.7:** Fatores de retenção de p-alquilanilinas em uma fase estacionária ZirChrom-PDB e na zircônia sem recobrimento polimérico. Colunas: ZirChrom PDB e zircônia sem recobrimento polimérico de 50 x 4,6 mm. Fase móvel: metanol:fosfato de amônio (pH 6; 25 mmol/L) 55:45 (v/v). Vazão: 1,0 mL/min. Temperatura: 35 °C. (Valores retirados da referência 18)

<i>solutos</i>	<i>ZirChrom-PDB</i>	<i>Zircônia sem recobrimento polimérico</i>
p-Metilbenzilamina	5,87	3,69
p-Etilbenzilamina	7,82	3,2
p-Propilbenzilamina	11,83	2,97
p-Butilbenzilamina	19,29	2,81
p-Metilbenzilamina	33,11	2,67

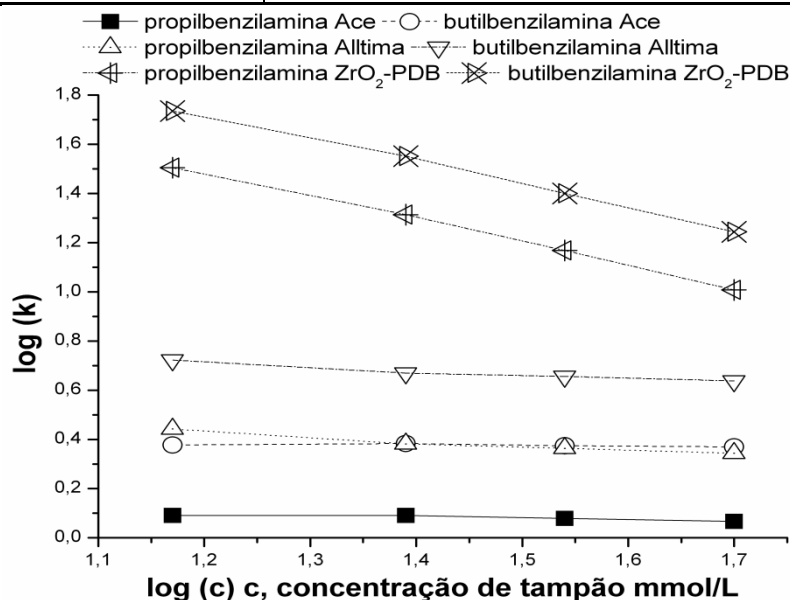
Normalmente a concentração de tampão na fase móvel tem um efeito desprezível em RP-HPLC, mas no caso das fases estacionárias ZirChrom, que retém solutos básicos por interações sinérgicas de sítios que combinam interações hidrofóbicas e de troca iônica, a concentração de tampão altera de maneira significativa o fator de retenção de p-alquilbenzilaminas. Enquanto as variações nos fatores de retenção destes solutos em função da concentração de tampão na



fase móvel são desprezível para as fases estacionárias Ace e Alltima, como é mostrado no exemplo da Tabela 2.8 e da Figura 2.20

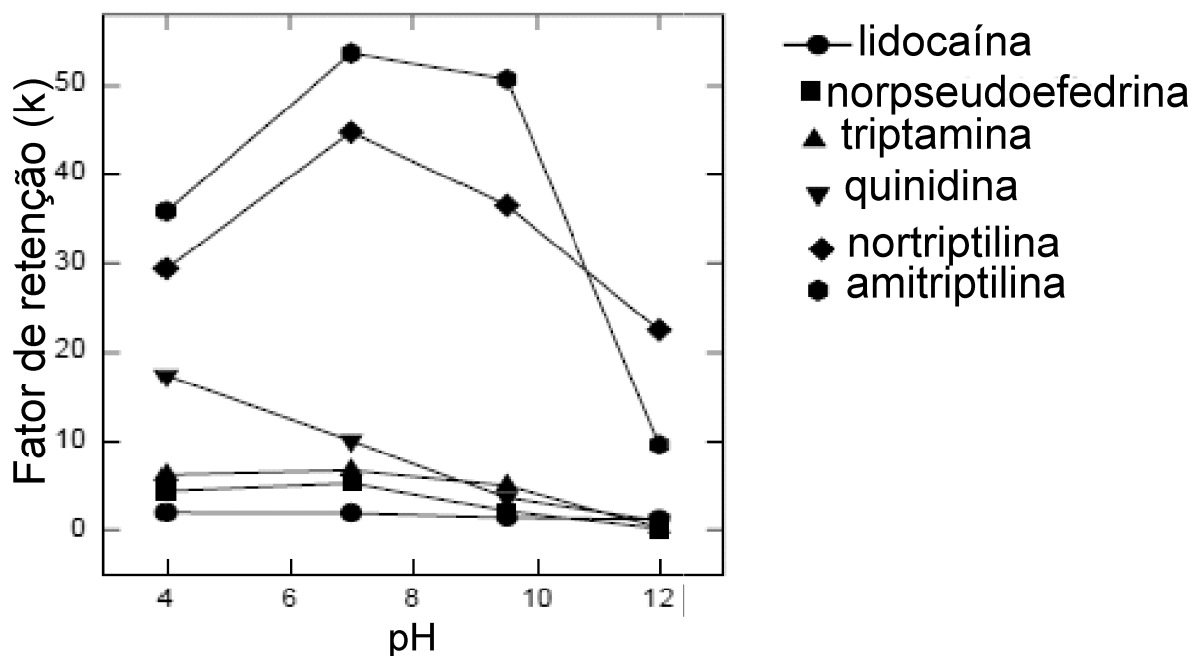
**Tabela 2.8:** Variação do fator de retenção ( $\log(k)$ ) em função da concentração de tampão na fase móvel. Colunas: ZirChrom PDB, 50 x 4,6 mm, Ace e Alltima. 150 x 4,5 mm. Fase móvel: metanol:fosfato de amônio pH 6 55:45 (v/v). Vazão 1,0 mL/min. Temperatura: 35 °C.  $r$  = coeficiente de correlação. DP = desvio padrão (valores retirados da referência 19)

coluna/ concentração (mmol/L)	15	25	35	50	$r$	DP
<b>Ace</b>						
p-Propilbenzilamina	0,09	0,09	0,08	0,07	0,90	0,01
p-Butilbenzilamina	0,38	0,38	0,38	0,37	0,59	0,01
p-Pentilbenzilamina	0,65	0,66	0,66	0,66	0,80	0,00
p-Hexilbenzilamina	0,99	1,00	0,99	0,99	0,72	0,01
<b>Alltima</b>						
p-Propilbenzilamina	0,44	0,38	0,36	0,34	0,98	0,01
p-Butilbenzilamina	0,72	0,67	0,66	0,64	0,98	0,01
p-Pentilbenzilamina	0,99	0,94	0,93	0,92	0,95	0,01
p-Hexilbenzilamina	1,36	1,30	1,29	1,27	0,95	0,01
<b>ZrO-PDB</b>						
<b>ZirChrom PDB</b>	0,97	0,79	0,64	0,48	1,00	0,01
p-Metilbenzilamina	1,11	0,92	0,77	0,61	1,00	0,01
p-Etilbenzilamina	1,29	1,09	0,95	0,79	1,00	0,01
p-Propilbenzilamina	1,50	1,31	1,17	1,01	1,00	0,01
p-Butilbenzilamina	1,74	1,55	1,40	1,24	1,00	0,02



**Figura 2.20:** Variação da retenção ( $\log(k)$ ) em função da concentração de tampão ( $\log(c)$ ) para a propilbenzilamina e butilbenzilamina com as fases estacionárias ZirChrom PDB, Ace e Alltima. Condições iguais as da Tabela 2.8. (Gráfico feito com os valores da Tabela 2.8)

Na fase estacionária XBridge, que apresenta uma quantidade desprezível de silanóis residuais, a variação do fator de retenção em função do pH da fase móvel segue um comportamento quase ideal, como descrito na Figura 2.14. Por outro lado, a retenção de compostos básicos em uma fase ZirChrom-PDB segue um comportamento dominado pelo grau de ionização dos sítios capazes de fazer interações de troca iônica dos solutos, como é mostrado na Figura 2.21, onde em  $\text{pH} < 12$ , a nortriptilina elui depois da amitriptilina (a amitriptilina possui uma metila a mais que nortriptilina em seu nitrogênio básico), o que representa um comportamento diferente do esperado para modo reverso de eluição. A retenção atinge seu valor máximo em  $\text{pH} 7$  onde os fenômenos de troca iônica são mais intensos. O aumento do  $\text{pH}$  da fase móvel diminui os fenômenos de troca iônica, fazendo com que a retenção dos solutos básicos diminua, sendo que em  $\text{pH} 12$  a amitriptilina elui após a nortriptilina.



**Figura 2.21:** Efeito do pH da fase móvel sobre a retenção de compostos básicos em uma fase estacionária ZirChrom PDB. Coluna: ZirChrom PDB, 50 x 4,6 mm. Fase móvel: acetonitrila:tampão fosfato de amônio ( $\text{pH} 7$ ; 20 mmol/L) 30:70 (v/v). Vazão: 0,8 mL/min. Temperatura: 40 °C. (adaptado da referência 33)

No caso da fase estacionária ZirChrom PDB, o tipo do cátion utilizado altera a seletividade e os fatores de retenção. No exemplo da Tabela 2.9, os fatores de

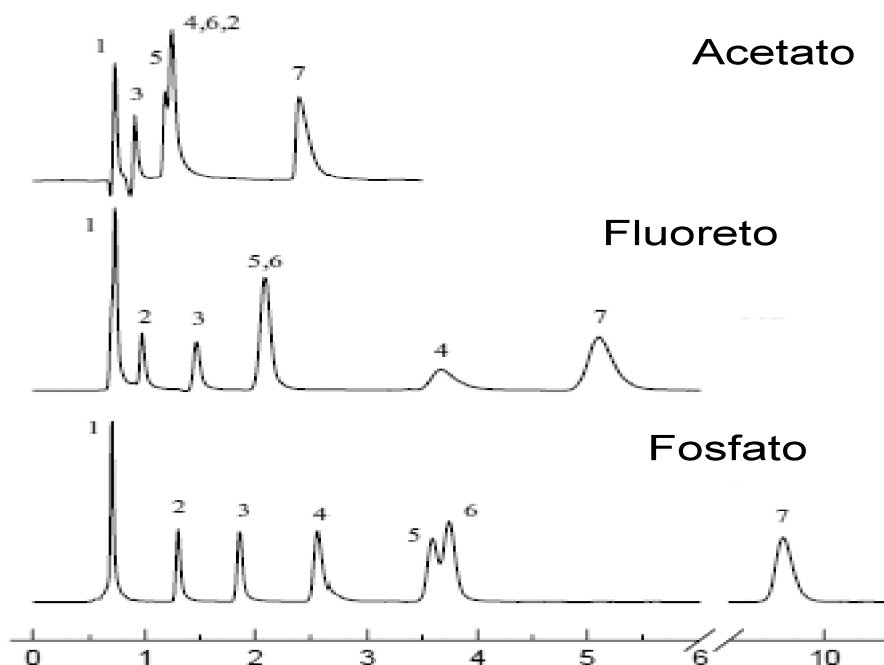
retenção aumentam a medida que a dureza das bases de Lewis diminui. Para  $K^+$ ,  $Na^+$  e  $NH_4^+$ , o fator de retenção dos solutos varia proporcionalmente ao esperado para a ordem de dureza destas bases de Lewis ( $Na^+ > NH_4^+ > K^+$ ) com exceção da quinidina, que é mais retida com  $NH_4^+$  do que com  $K^+$ . O uso de trietilamina, que é uma base de Lewis muito mais mole, resulta em uma seletividade totalmente diferente da observada com estes cátions, fatores de retenção excessivos e baixos valores de eficiência. Em contra partida o uso de ânions, que são bases de Lewis mais duras, ocasionam o aumento da retenção dos solutos básicos, como é mostrado no exemplo da Tabela 2.10. Observa-se que o uso de fosfato ao invés de acetato ou fluoreto resulta em maiores fatores de retenção e maior eficiência, além de alterar a seletividade da separação, como também pode ser visto na Figura 2.22, onde a separação de uma série de compostos básicos não pode ser obtida utilizando acetato como tampão. No entanto, quando se usa fluoreto, a separação dos solutos é possível, porém uma baixa eficiência é obtida. Por outro lado, quando se utiliza fosfato, a retenção, seletividade e a eficiência aumentam, fazendo com que os solutos sejam separados.

**Tabela 2.9:** Variação da retenção e da seletividade em função do tipo do cátion utilizado com tampão fosfato. Coluna: ZirChrom PDB, 50 x 4,6 mm. Fase móvel: acetonitrila:tampão fosfato (pH 7; 20 mmol/L). Vazão: 0,8 mL/min. Temperatura: 40 °C. Valores entre parênteses representam a ordem de eluição dos solutos. (Tabela adaptada da referência 36).

<b>Soluto</b>	<b>k</b>				<b>N</b>			
	$Na^+$	$K^+$	$NH_4^+$	$TEA^+$	$Na^+$	$K^+$	$NH_4^+$	$TEA^+$
<b>Cátion</b>								
Lidocaína	0.88(1)	0.95(1)	0.98(1)	0.92(1)	3800	3900	4000	3900
Norpseudo efedrina	2.84(2)	2.99(2)	2.99(2)	64.0(5)	1300	1600	2200	500
Quinidina	3.83(3)	4.90(4)	5.03(4)	7.70(2)	1900	2700	2900	2300
Triptamina	3.86(4)	4.08(3)	3.71(3)	150(6)	2700	3300	3800	1800
Amitriptilina	18.5(5)	22.4(5)	18.8(5)	33.6(3)	3300	3400	3400	3600
Nortriptilina	24.2(6)	29.7(6)	23.8(6)	94.6(4)	3000	3400	3900	2000

**Tabela 2.10:** Variação da retenção e da seletividade em função do tipo de anião utilizado com tampão amônio. Coluna: ZirChrom PDB, 50 x 4,6 mm. Fase móvel: acetonitrila:tampão amônio (pH 7; 20 mmol/L). Vazão: 0,8 mL/min. Temperatura: 40 °C. Valores entre parênteses representam a ordem de eluição dos solutos. (Tabela adaptada da referência 36).

<b>Soluto</b>	<b>k</b>			<b>N</b>		
	<i>Acetato</i>	<i>Fluoreto</i>	<i>Fosfato</i>	<i>Acetato</i>	<i>Fluoreto</i>	<i>Fosfato</i>
<b>Aniões</b>						
Lidocaina	0.87(1)	1.13(1)	1.29(1)	2400	1450	2600
Norpseudoefedrina	2.61(3)	6.85(3)	5.23(2)	200	660	1200
Quinidina	1.69(2)	3.76(2)	5.76(3)	500	900	1600
Triptamina	2.66(4)	8.39(4)	6.43(4)	400	550	700
Amitriptilina	8.98(5)	18.98(5)	29.75(5)	450	850	1200
Nortriptilina	13.97(6)	32.70(6)	39.49(6)	300	800	1000



**Figura 2.22:** Separações de solutos básicos em uma coluna ZirChrom PDB. Variação da retenção e da seletividade em função do tipo de tipo de cátion utilizado com tampão amônio. Coluna: ZirChrom PDB, 50 x 4,6 mm. Fase móvel: acetonitrila:tampão amônio (pH 7; 20 mmol/L). Vazão: 0,8 mL/min. Temperatura: 40 °C. Identificação dos solutos: 1 = teofilina; 2 = albuterol 3 = efedrina; 4. norefedrina 5 = clorfeniramina; 6 = difenhidramina; 7 = prometazina. (Figura adaptada da referência 33).

Existem alternativas para analisar solutos básicos com suportes que minimizam interações secundárias dos solutos, como as fases estacionárias XTerra e XBridge. Fases estacionárias que possuem uma grande quantidade de sítios capazes de fazer interações de troca iônica também são uma alternativa

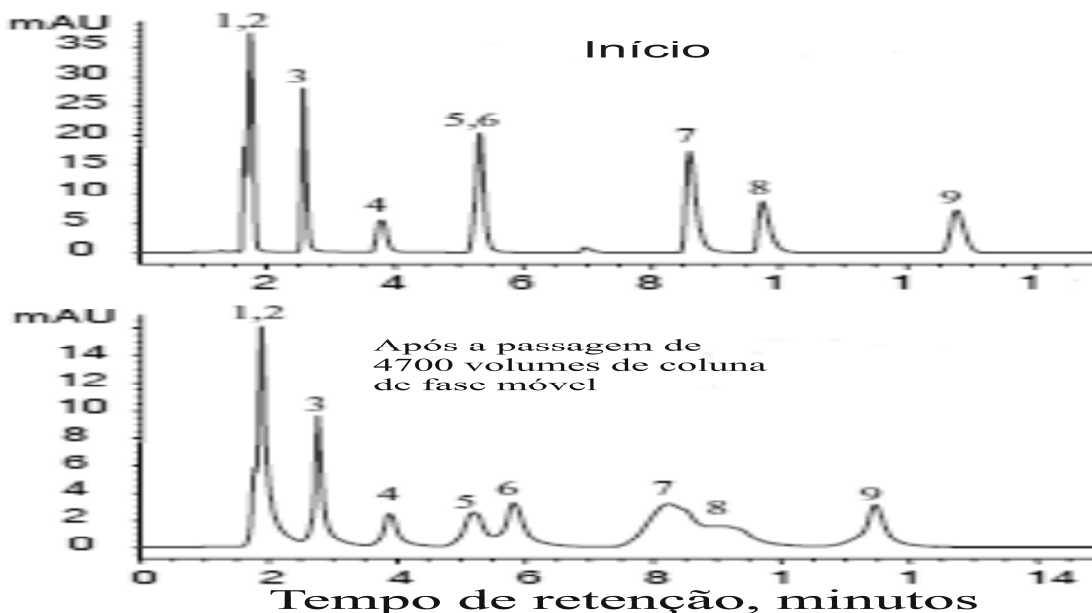
viável, tais como as fases ZirChrom. Por sua vez, a maior peculiaridade das interações secundárias dos solutos com os sítios capazes de fazer interações de troca iônica é que estas interações são multiplicativas e a retenção de solutos básicos é maior em uma fase estacionária preparada pelo recobrimento do óxido de zircônio com polibutadieno (PDB) do que na zircônia sem o recobrimento polimérico [19]. Por exemplo, se a retenção ocorre apenas por fenômenos de troca iônica os solutos básicos deveriam ser mais retidos na zircônia sem o recobrimento polimérico do que na zircônia com recobrimento polimérico, enquanto o que realmente acontece é que os solutos básicos são mais retidos na zircônia com recobrimento polimérico, não por causa das interações hidrofóbicas dos solutos com o polímero entrecruzado na superfície da zircônia mas sim por causa das interações sinérgicas dos sítios capazes de fazer interações de troca iônica e interações hidrofóbicas com o polímero entrecruzado na superfície da zircônia, como mostra a Figura 2.19.

## **Estabilidade das fases estacionárias**

Como discutido anteriormente, as separações de compostos básicos e ácidos podem necessitar de fases móveis ácidas ou alcalinas, No entanto, os mesmos silanóis que interagem com solutos básicos são os responsáveis pela instabilidade da sílica em meio alcalino, uma vez que os hidróxidos na fase móvel atacam os silanóis residuais, ocasionando a dissolução da sílica e causando a degradação da fase estacionária.

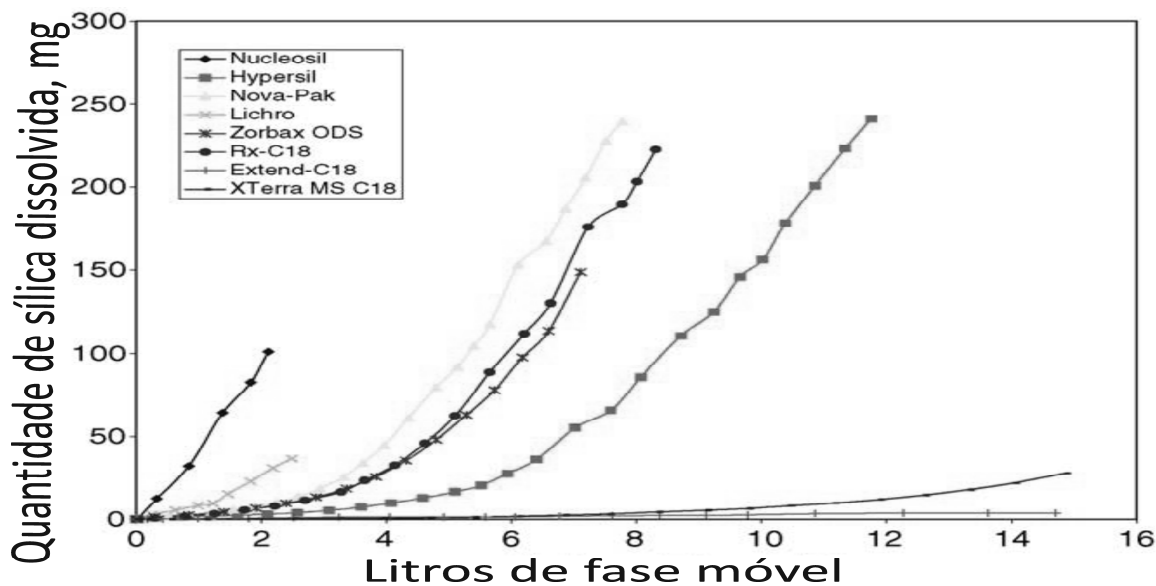
A primeira tentativa feita no intuito de aumentar a estabilidade da sílica em meio alcalino foi aumentar o recobrimento da sílica, porém, não é possível reagir 100% dos silanóis da sílica, mesmo após sucessíveis reações de capeamento, devido ao impedimento estérico. Mesmo fases estacionárias com um alto grau de derivatização dos silanóis residuais são instáveis em meio alcalino. Por exemplo, a fase estacionária Luna C18 (2), que tem um alto grau de derivatização de seu silanóis com grupos alquila, se degrada rapidamente em meio alcalino, como é mostrado na Figura 2.23, que indica a degradação da fase estacionária através da

passagem de fase móvel, representada em volumes de coluna ( $V_c$ ).  $V_c$  representa o volume de fase móvel suficiente para encher a coluna e é medido pelo volume de retenção de um soluto não retido ( $V_c = t_M \times \text{vazão da fase móvel}$ ). Mesmo o alto grau de recobrimento dos silanóis desta fase não foi suficiente para proteger a sílica e a degradação da fase estacionária ocorre rapidamente devido a dissolução da sílica após a passagem 4700 volumes de coluna [33].

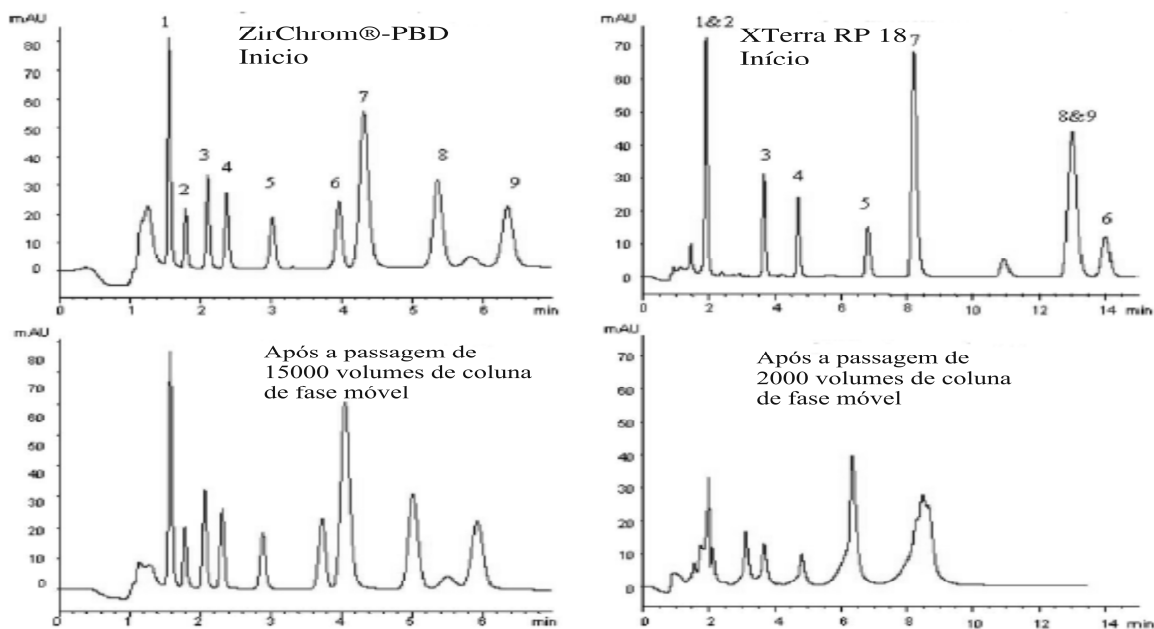


**Figura 2.23:** Teste de estabilidade da fase estacionária Phenomenex Luna C18 (2) (19% de carbono): Fase móvel: 45:55 (v/v) acetonitrila-fosfato de potássio a pH10.0. Vazão: 1,0 mL/min. Temperatura: 30 °C. Solutos: (1) labetalol; (2) atenolol; (3) acebutolol; (4) metoprolol; (5) oxprenolol; (6) quinidina; (7) lidocaina; (8) alprenolol; (9) propranolol. (Figura adaptada da referência 33).

Por sua vez as fases estacionárias preparadas por processos híbridos são muito mais estáveis, como é mostrado na Figura 2.24, onde a fase estacionária Xterra se mostrou mais estável que qualquer outra fase estacionária a base de sílica. A zircônia é um material extremamente estável em uma faixa de pH de 1 a 14 e é ainda mais estável que as fases estacionárias Xterra, como é mostrado na Figura 2.25 [33,36].

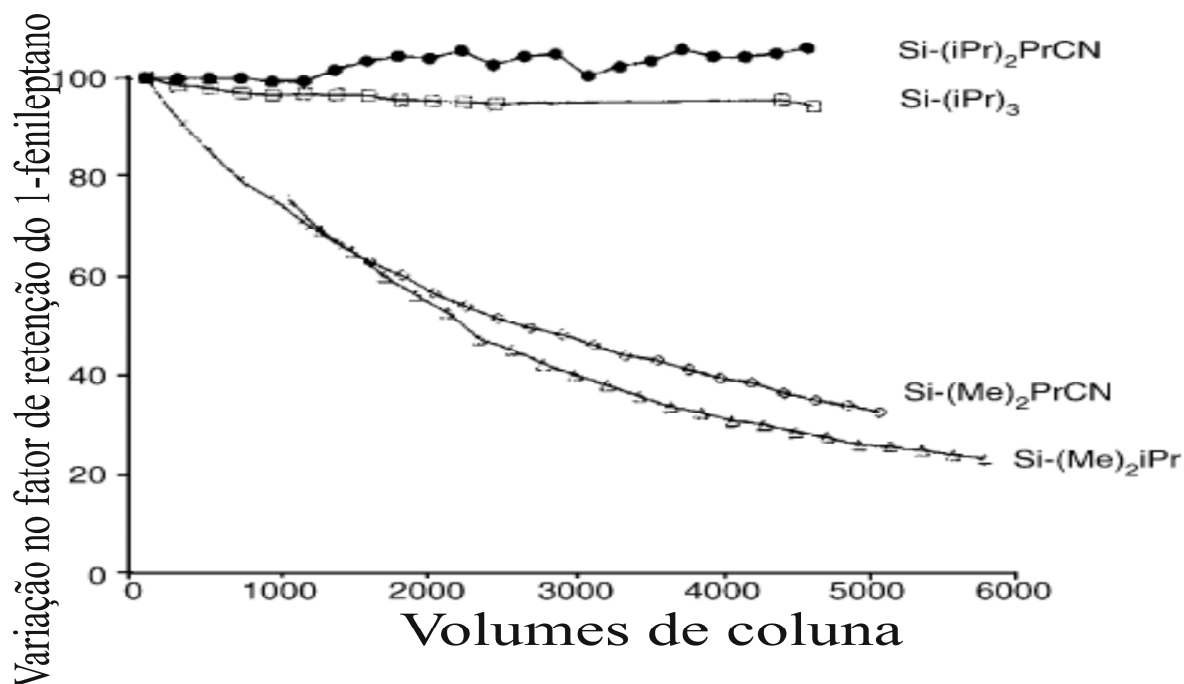


**Figura 2.24:** Comparação da estabilidade química de fases estacionárias preparadas com sílica e com sílica híbrida (XTerra), mostrando a dissolução da sílica (mg) em função da passagem da fase móvel (L). Colunas 150 x 4,6 mm, exceto Nova-Pak, 15 cm x 3,9 mm. Fase móvel 50:50 (v/v) metanol-carbonato (pH 10; 100 mmol/L). Vazão: 1,0 mL/min, exceto Nova-Pak 0,72 mL/min. Temperatura ambiente (Figura adaptada da referência 38).



**Figura 2.25:** Estabilidade das colunas ZirChrom®-PBD vs. Waters XTerra RP 18. Para ZirChrom®-PBD, fase móvel: 28:72 (v/v) acetonitrila-tampão fosfato (pH 12; 20 mmol/L). Para XTerra RP,18 fase móvel, 35:65 (v/v) acetonitrila-tampão fosfato (pH 12; 20 mmol/L). Ambas as colunas. Vazão: 1,0 mL/min. Temperatura: 40 °C. Detecção 254 nm. Solutos: (1) labetalol; (2) atenolol; (3) acebutolol; (4) metoprolol; (5) oxprenolol; (6) quinidina; (7) lidocaína; (8) alprenolol; (9) propranolol. (Figura adaptada da referência 33).

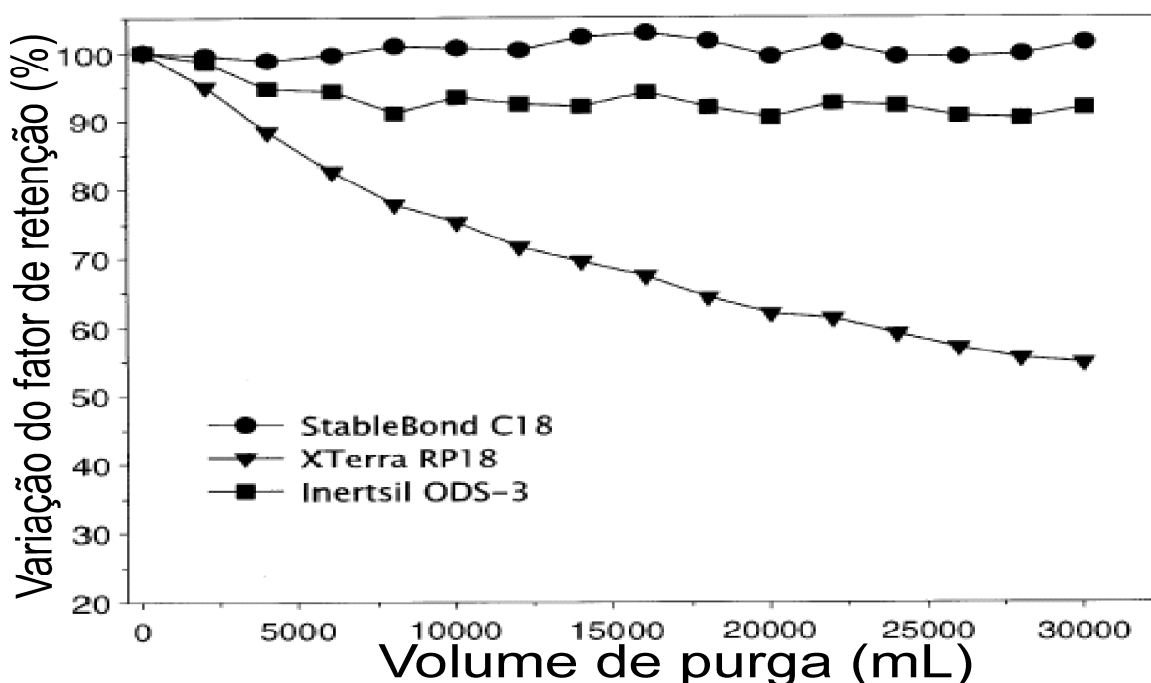
Se a sílica se dissolve em meio alcalino, por outro lado a sílica é extremamente estável em meio ácido (na ausência de fluoreto). Porém, em meio ácido as ligações Si-C que prendem os ligantes a superfície da sílica são hidrolisadas. Ligantes com cadeia mais curta, tais como os utilizados nas reações de capeamento, grupos C4, fenil, perfluorfenil e cianopropil são mais susceptíveis a hidrólise que ligantes com cadeias mais longas tais como feniletil, C8 e C18. No exemplo dos tipos de ligantes mais utilizados na preparação de fases estacionárias (Tabela 2.2), todos os ligantes apresentados são ligantes do tipo dimetil ((CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>SiRCl). A substituição dos grupos laterais por grupos mais volumosos como isopropil e tercbutil aumentam a estabilidade dos ligantes frente a hidrólise em meio ácido, como é mostrado na Figura 2.26, onde as fases estacionárias preparadas com grupos laterais mais volumosos (triiisopropil e diisopropilcianopropil) não sofrem nenhuma perda de retenção ao longo do teste enquanto que as fases estacionárias preparadas com grupos laterais menos volumosos (dimetilisopropil, dimetilcianopropil) perdem retenção continuamente ao longo do teste [38].



**Figura 2.26:** Variação percentual no fator de retenção do 1-fenileptano em fases estacionárias dimetilisopropil, dimetilcianopropil, triisopropil e dipropilisocianopropil. Fase móvel: 50:50 (v/v) acetonitrila–TFA 0,1%. Vazão: 1,0 ml/min. Temperatura: 50 °C. (Figura adaptada da referência 43)



Na Figura 2.27 segue um exemplo da estabilidade em meio ácido de uma fase estacionária com uma alta percentagem de carbono (InertsilODS-3 da GL Science), uma estéricamente protegida (StableBond da Agilent Technologies) e uma com sílica híbrida (XTerra da Waters). Neste exemplo, a fase estacionária estéricamente protegida com grupos laterais volumoso é mais estável que a fase com grupos pequenos em sua cadeia lateral (InertsilODS-3). A fase estacionária mais instável é a fase XTerra onde as mesmas ligações  $\text{CH}_3\text{-Si}$  na estrutura deste suporte, que conferem alta estabilidade em meio alcalino, são as responsáveis pela instabilidade do mesmo em meio ácido [37].



**Figura 2.27:** Estabilidade em meio ácido. Colunas 150 x 3,9. Fase móvel: metanol: ácido trifluorácetico. Vazão: 3,0 mL/min. Temperatura: 80 °C. (Figura adaptada da referência 37)

Se as fases estacionárias híbridas XTerra são instáveis em meio ácido devido à hidrólise das ligações  $\text{-Si-CH}_3$  em sua superfície, a pequena quantidade de silanóis residuais que este suporte cromatográfico apresenta permite que o mesmo seja dissolvido em meio alcalino [33,39]. As partículas híbridas do tipo XBridge são extremamente estáveis tanto em meio ácido quanto em meio alcalino, uma vez que este suporte cromatográfico apresenta uma quantidade desprezível

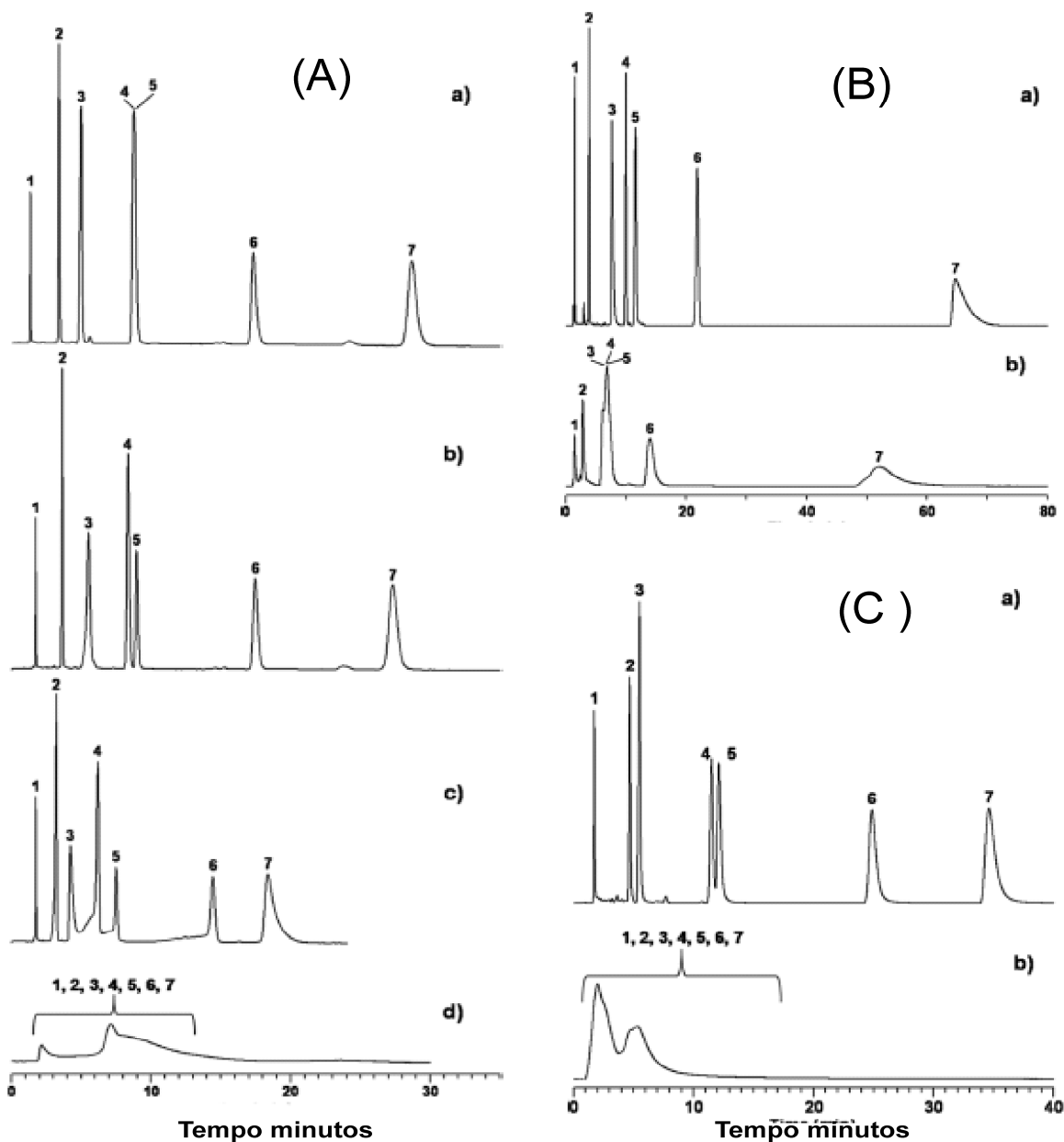
de silanóis residuais e as ligações  $-\text{Si}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{Si}-$  presentes neste material são mais resistentes a hidrólise ácida [41].

Teutenberg et al. [41] estudaram as estabilidades das fases estacionárias Zorbax SB C-18, Nucleodur Gravity C-18, Gemini C18, Gemini NX C18, PLRP-S, pHidelity C18, Blaze 200 C-18, Pathfinder MR, Zorbax StableBond, Ascentis C-18, XBridge C-18, YMC Pack Pro C-18 and ZirChrom PBD com um teste que consiste em purgar as colunas sucessivamente com fase móvel neutra (metanol:água 10:90 (v/v)), ácida (metanol:tampão fosfato (pH 2,2; 20 mmol/L) 10:90 (v/v)) e alcalina (metanol:tampão fosfato (pH 12; 20 mmol/L) 10:90 (v/v)). Cada fase estacionária foi submetida a cinco ciclos de purga com cada uma das fases móveis. Cada ciclo consistia em purgar a fase estacionária com fase móvel por cinco horas a 150 °C, e, ao final de cada cinco horas as fase estacionárias eram re-equilibradas em fase móvel metanol:tampão fosfato (pH 7; 20 mmol/L) 65:35 (v/v) a 23 °C e avaliadas com a mistura teste de Neue [41]. O resultado deste teste é mostrado na Figura 2.28, onde a fase estacionária Gemini NX, a base de sílica híbrida, só se degradou com o teste alcalino, enquanto a fase estacionária análoga a base de sílica Gemini C18 e a fase estacionária Zorbax StableBond, preparada com silanos bidentados, se degradaram rapidamente com o teste não tamponado. Adicionalmente, a fase estacionária XBridge, a base de sílica híbrida, e ZirChrom PDB a base de zircônia também se mostraram estáveis em condições extremas, como é mostrado na Figura 2.29.

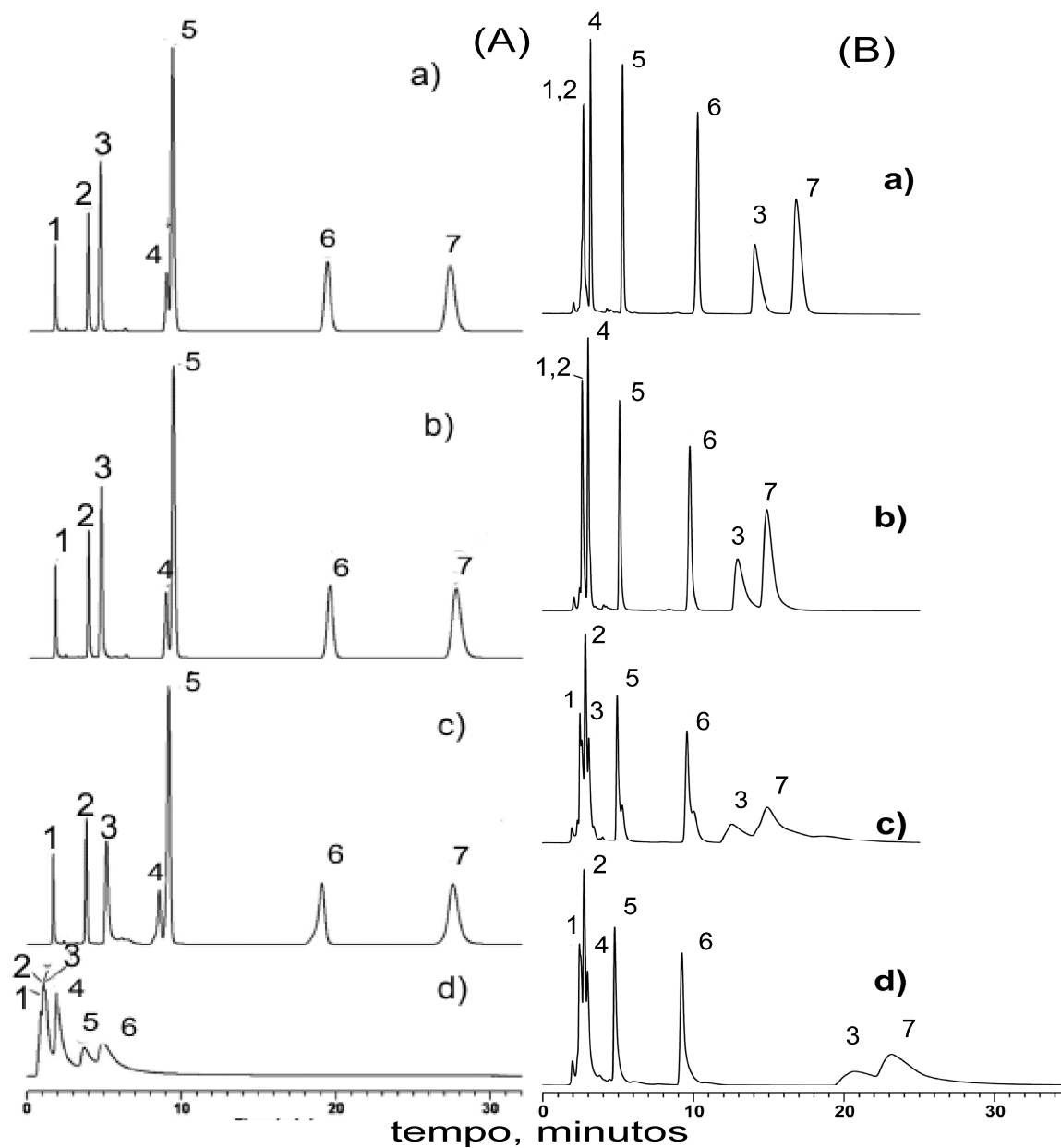
Neste ponto é necessário salientar que certos fatores influenciam na dissolução da sílica e que mesmo fases estacionárias preparadas com sílica podem ser utilizadas em meio alcalino em certas condições, dependendo do tipo de tampão utilizado. Na Tabela 2.3, foi mostrado que fases móveis preparadas com tampões orgânicos tem menor  $\text{pH}_w^s$  do que fase móveis preparadas com tampões inorgânicos (fosfato, carbonato e borato) e, por esta razão, fases móveis preparadas com tampões orgânicos são menos agressivas do que fases móveis preparadas com tampões inorgânicos. Por exemplo, uma fase móvel metanol:tampão fosfato a pH 7 20:80 (v/v) causa uma maior degradação da fase estacionária que uma fase móvel metanol:tampão tris a pH 7 20:80 (v/v), onde pH

7 se refere ao pH da fase aquosa antes da adição de metanol ( $\text{pH}_w^w$ ). O pH da fase móvel preparada com tampão fosfato após a adição de metanol ( $\text{pH}_w^s$ ) é maior que o  $\text{pH}_w^s$  da fase móvel preparada com tampão tris, como é mostrado na Figura 2.30, onde o uso de fase móvel com tampão fosfato a  $\text{pH}_w^w$  7 degrada rapidamente a fase estacionária enquanto que o uso de fases móveis com o mesmo valor de  $\text{pH}_w^w$  mas preparadas com tampões orgânicos degradam menos a fase estacionária [43].

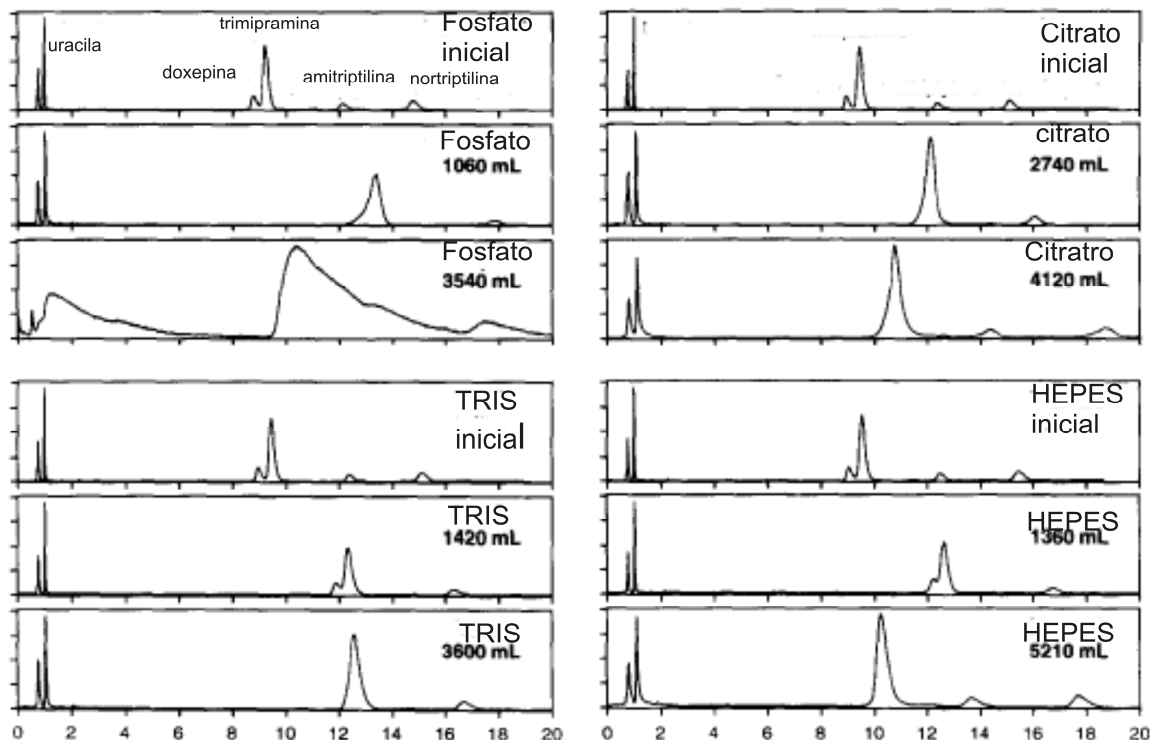
Outro fator importante quanto a degradação da fase estacionária é a temperatura. Em temperaturas maiores ou iguais a 60 °C, a sílica se torna mais solúvel na fase móvel, mesmo em meio neutro, como é mostrado na Figura 2.31. A concentração de tampão também influencia na dissolução da sílica e, como mostrado na Figura 2.32. É interessante observar que uso de fases móveis com tampão fosfato nas concentrações 50 ou 250 mmol/L dissolvem praticamente as mesmas quantidades de sílica ao final do teste. O teste feito com tampão tris 50 mmol/L não dissolve a sílica, enquanto o teste feito com tris 250 mmol/l dissolve continuamente a sílica. Este exemplo também reitera as observações feitas na Figura 2.30 que os tampões orgânicos degradam menos a fase estacionária que tampões inorgânicos, como também é mostrado na Figura 2.32. O uso de tampão tris 50 mmol/L não causa nenhuma dissolução da fase estacionária enquanto que o uso de tampão fosfato 50 mmol/L dissolve vigorosamente a fase estacionária.



**Figura 2.28:** Avaliação da estabilidade em condições extremamente agressivas das fases estacionárias (A) Gemini NX e (B) Gemini C18. (C) Zorbax StableBond (a) Cromatograma obtido após o primeiro ciclo com fase móvel neutra (b) Cromatograma obtido após o quinto ciclo com fase móvel neutra. (c) Cromatograma obtido após o quinto ciclo com fase móvel ácida. (d) Cromatograma obtido após o quinto ciclo com fase móvel alcalina. Os testes de estabilidade e a avaliação cromatográfica foram feitos a uma vazão de 1,0 mL/min. As colunas têm as mesmas dimensões, 150 x 4,6 mm. Solutos: (1) = di-hidroxiacetona; (2) = propilparabeno; (3) = propranolol; (4) = dipropilftalato; (5) = naftaleno; (6) = acenafeno; (7) = amitriptilina. (Figura adaptada da referência 38).

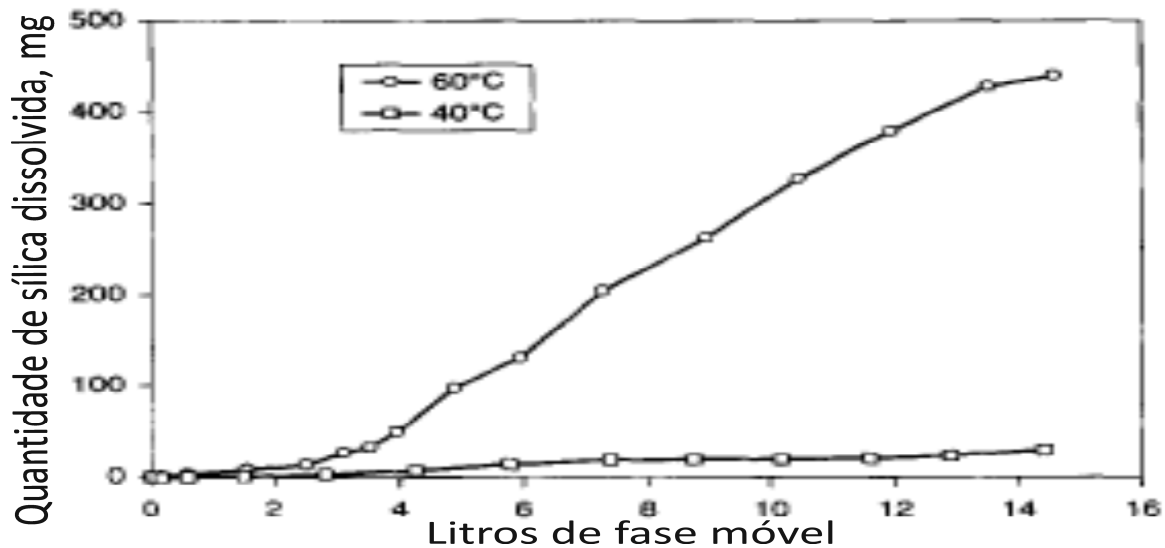


**Figura 2.29:** Avaliação da estabilidade em condições extremamente agressivas das fases estacionárias (A) XBridge e (B) ZirChrom-PDB. (a) Cromatograma obtido após o primeiro ciclo com fase móvel neutra (b) Cromatograma obtido após o quinto ciclo com fase móvel neutra. (c) Cromatograma obtido após o quinto ciclo com fase móvel ácida. (d) Cromatograma obtido após o quinto ciclo com fase móvel alcalina. Os testes de estabilidade e a avaliação cromatográfica foram feitos a uma vazão de 1,0 mL/min para a coluna XBridge e 0,7 mL/min para a coluna ZirChrom-PDB. As colunas têm as mesmas dimensões, 150 x 4,6 mm. Solutos: (1) = di-hidroxiacetona; (2) = propilparabeno; (3) = propranolol; (4) = dipropilftalato; (5) = naftaleno; (6) = acenafteno; (7) = amitriptilina. (Figura adaptada da referência 38).

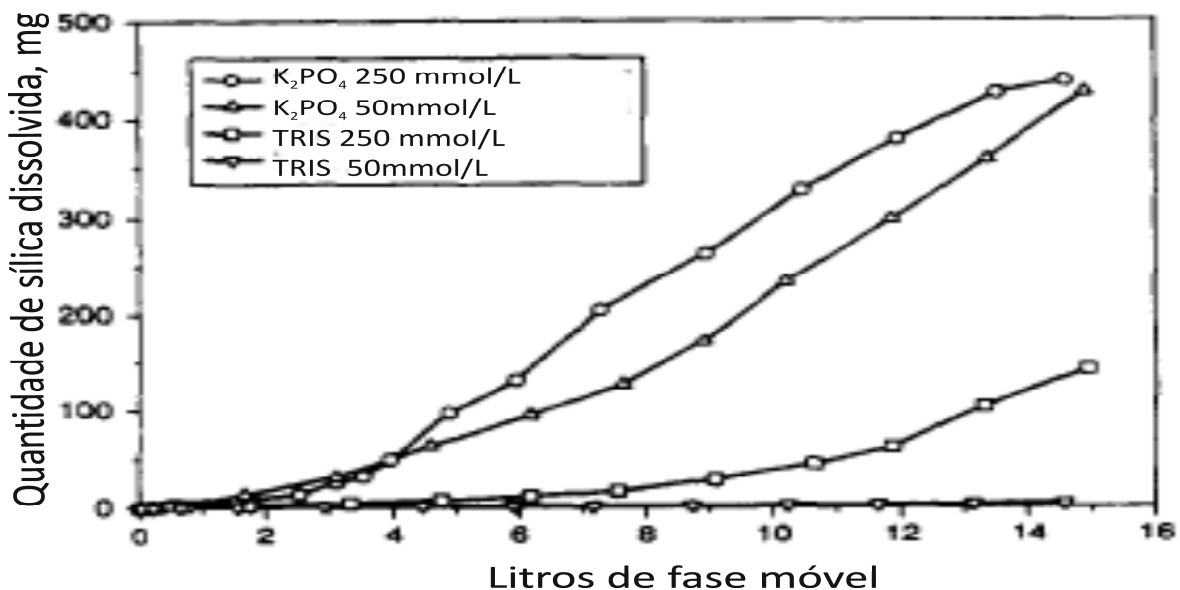


**Figura 2.30:** Separações de antidepressivos tricíclicos. Efeito do tipo de tampão sobre a separação. Coluna Zorbax SB-CN, 150 × 4,6 mm. As colunas foram purgadas com fase móvel acetonitrila-tampão (pH 7; 250 mmol/L) 20:80 (v/v) a 60 °C, lavadas com 20 volumes de coluna de fase móvel: metanol-água 60:40 (v/v), reequilibradas com 20 volumes de coluna de fase móvel acetonitrila-tampão fosfato (pH 7; 10 mmol/L) 60:40 (v/v) e avaliadas com a mesma fase móvel a temperatura de 40 °C; vazão 1 mL/min. Solutos teste: doxepina, trimipramina, amitriptilina e nortriptilina. (Figura adaptada da referência 42).

Desta forma, mesmo fases estacionárias a base de sílica podem ser utilizadas com fases móveis alcalinas quando se faz uso de tampões orgânicos, temperatura ambiente e concentrações diminutas de tampão, como é mostrado na da Figura 2.33. Porém, é necessário ter em mente que o pH da fase móvel após adição de modificador orgânico ( $\text{pH}_w^s$ ) é diferente do pH da fase aquosa ( $\text{pH}_w^w$ ) (Tabela 2.3) e que, por sua vez, diferentes tipos de tampões levam a diferentes seletividades (Tabela 2.5).



**Figura 2.31:** Efeito da temperatura sobre a quantidade de sílica dissolvida (em mg), em função da passagem de fase móvel. Coluna: Zorbax Rx-C18, 150 × 4,6 mm. Fase móvel: acetonitrila-tampão fosfato (pH 7; 250 mmol/L) 20:80 (v/v). Vazão: 1,0 ml/min. (Figura adaptada da referência 42).



**Figura 2.32:** Efeito da concentração e do tipo de tampão sobre a quantidade de sílica dissolvida (em mg) em função da passagem de fases móveis (em L). Coluna: Zorbax Rx-C18, 150 × 4,6 mm. Fase móvel: 20:80, v/v, acetonitrila-tampão a pH 7. Vazão: 1,0 ml/min. Temperatura: 60°C. (Figura adaptada da referência 42).

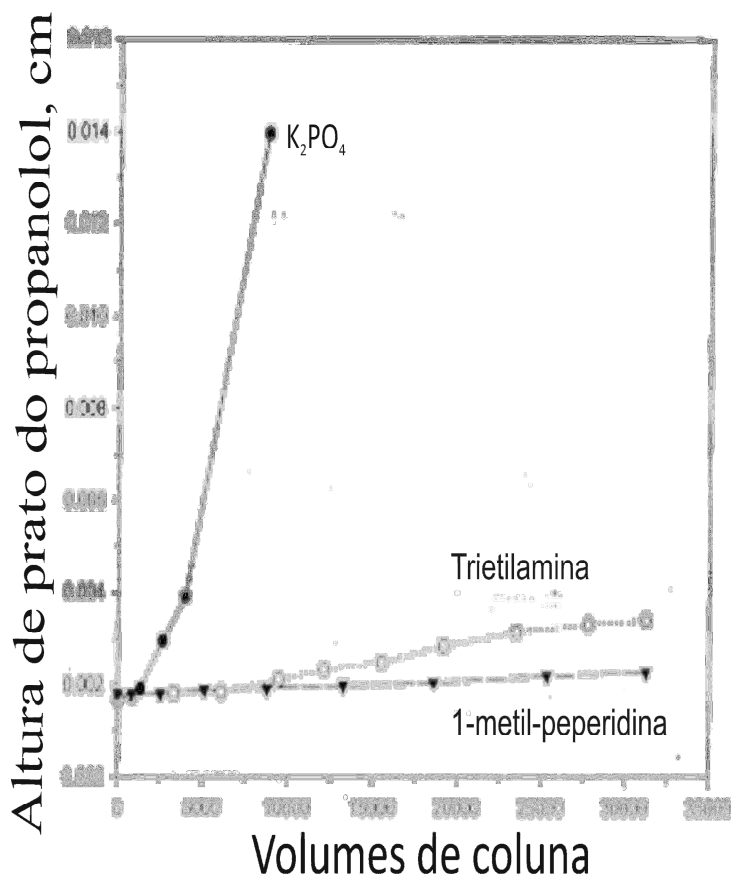


Figura 2.33: Efeito do tipo de tampão sobre a estabilidade. Coluna: 150 x 4,6 mm Zorbax XDBC8. A coluna foi purgada com fase móvel: 55:45, v/v, metanol-tampão (pH 11;17 mmol/L) a 23 °C a uma vazão de 1,5 mL/min e avaliadas na mesma fase móvel a 40 °C a uma vazão de 1 mL/min. (Figura adaptada da referência 43).



## Testes cromatográficos

Dentre os diversos testes propostos na literatura para avaliar as propriedades cromatográficas os testes de Engelhardt, SRM 870 e Tanaka são os testes mais usados.

### Teste de Tanaka

O teste de Tanaka e colaboradores [9] foi desenvolvido no final da década de 80 e ainda hoje é largamente utilizado. Este teste avalia as fases estacionárias frente a seis parâmetros cromatográficos: *hidrofobicidade*, *seletividade metilênica*, *seletividade estérica*, *capacidade de fazer ligação de hidrogênio*, *capacidade de troca iônica a pH 7,6* e *capacidade de troca iônica a pH 2,7*. Estes parâmetros são obtidos com as seguintes fases móveis:

- FM1: MeOH: H<sub>2</sub>O (80:20, v/v).
- FM2: MeOH: H<sub>2</sub>O (30:70, v/v).
- FM3: MeOH:tampão fosfato (pH 7,6; 20 mmol/L) 30:70 (v/v).
- FM4: MeOH:tampão fosfato (pH 2,7; 20 mmol/L) 30:70 (v/v).

• *Hidrofobicidade* ( $k_{Pe}$ ). Este parâmetro mede o recobrimento superficial do suporte cromatográfico. É calculada pelo fator de retenção do pentilbenzeno na FM1. É importante ressaltar que a retenção de um soluto apolar na fase estacionária depende do recobrimento e da área superficial do suporte cromatográfico.

*Seletividade metilênica* ( $CH_2$ ). É determinada pela razão dos fatores de retenção do pentilbenzeno e do butilbenzeno,  $CH_2 = k_{PB} / k_{BB}$  na FM1. Este parâmetro é uma medida de como a fase estacionária separa solutos que diferem em sua estrutura apenas por um grupo  $CH_2$ .

- *Seletividade estérica (T/O)*. É medida pela razão entre os fatores de retenção do trifenileno e da *o*-terfenila,  $T/O = k_T / k_O$ , na FM1. A T/O mede a seletividade estérica, devido ao fato que a hidrofobicidades destes solutos serem semelhantes, porém a estrutura deles diferencia devido ao fato do *o*-terfenil poder mudar sua conformação enquanto que o trifenileno apresenta uma estrutura rígida.
- *Capacidade de fazer ligação de hidrogênio (C/P)*. Esta propriedade é obtida pela razão entre os fatores de retenção da cafeína e do fenol,  $C/P = k_C / k_F$  na FM2. O  $\alpha_{C/F}$  é uma medida do número de grupos silanóis disponíveis capazes de fazer ligações de hidrogênio com solutos polares
- *Capacidade de troca iônica a pH 7,6 (B/P 7,6)*. Propriedade medida pela razão entre os fatores de retenção da benzilamina (pKa 9,7) e do fenol (pKa 10),  $B/P 7,6 = k_B/k_P$  a pH 7,6 na FM3. O valor obtido é uma estimativa da capacidade de troca iônica da fase estacionária a pH 7,6 onde a benzilamina e o fenol estão protonados e espera-se que os silanóis residuais estejam desprotonados.
- *Capacidade de troca iônica a pH 2,7 (B/P 2,7)*. Propriedade medida pela razão entre os fatores de retenção da benzilamina e do fenol,  $B/P \text{ pH } 2,7 = k_B / k_F$  na FM4. O valor obtido é uma estimativa da capacidade de troca iônica pH 2,7 da fase estacionária. A pH 2,7 a benzilamina e o fenol estão protonados e espera-se que os silanóis residuais também estejam protonados.

Euerby et al. [44-46] avaliaram 229 fases estacionárias utilizando o teste de Tanaka [9]. As correlações para os seis parâmetros avaliadas com o teste de Tanaka e a estatística básica para as 229 fases estacionárias são mostradas na Tabela 2.11 e Tabela 2.12, respectivamente.

**Tabela 2.11:** Correlações entre os seis parâmetros da mistura teste de Tanaka [9 14] obtidos com 229 fases estacionárias. (As correlações foram calculadas com os valores da referência 10).

	<i>CH<sub>2</sub></i>	<i>T/O</i>	<i>C/P</i>	<i>B/P 2,7</i>	<i>B/P 7,6</i>
<i>k<sub>PeB</sub></i>	0,71	-0,06	-0,31	-0,23	-0,16
<i>CH<sub>2</sub></i>		-0,09	-0,32	-0,19	-0,04
<i>T/O</i>			-0,17	0,07	0,07
<i>C/P</i>				0,38	0,10
<i>B/P 2,7</i>					0,62

**Tabela 2.12:** Estatística básica obtida para os seis parâmetros da mistura teste de Tanaka [9] obtidos com 229 fases estacionárias. DPR é a abreviação de desvio padrão relativo. (A estatística básica foi calculada com os valores da referência 10).

	<i>média</i>	<i>mediana</i>	<i>primeiro quartil</i>	<i>quarto quartil</i>	<i>DPR</i>
$k_{PeB}$	3,61	2,98	1,59	5,47	73,87
$CH_2$	1,38	1,42	1,31	1,48	9,25
T/O	1,58	1,49	1,22	1,84	37,21
C/P	0,66	0,49	0,39	0,72	88,90
B/P 7.6	1,28	0,48	0,32	1,00	205,60
B/P 2.7	0,44	0,11	0,08	0,16	392,76

A Tabela 2.11 mostra que os únicos parâmetros cromatográficos correlacionados no teste de Tanaka são  $k_{PeB}$  e  $CH_2$ . Foi observado que a correlação obtida para estes parâmetros, de 0,71, se deve a fases estacionárias com pequena hidrofobicidade (como, por exemplo, fases estacionárias ciano, diol, carbamato) que não separam o pentilbenzeno e o butilbenzeno na FM1. Ao se excluir estas fases do conjunto, a correlação chega 0,98.

Na avaliação cromatográfica de uma fase estacionária é necessário que os parâmetros avaliados apresentem baixas correlações e DPR alto para poder diferenciar as fases estacionárias. A baixa correlação entre os parâmetros indica que os mesmos fornecem informações distintas a respeito das propriedades cromatográficas da fase estacionária, uma vez que não é interessante realizar diversos testes para obter a mesma informação. DPR alto significa que o parâmetro estudado varia consideravelmente de uma fase estacionária para outra, uma vez que um parâmetro que apresenta DPR pequeno não é útil para diferenciar as fases estacionárias.

A Tabela 2.12 mostra que o parâmetro  $CH_2$  não é útil para avaliar as fases estacionárias devido ao seu baixo DPR. O parâmetro  $k_{PeB}$  apresenta valores de DPR altos e, por isso, é útil para diferenciar as fases estacionárias. Em geral as fases estacionárias com grupos polares como diol, ciano e com grupo polar embutido tem seus valores de hidrofobicidade dentro do primeiro quartil, devido a menor hidrofobicidade destes ligantes. As fases estacionárias do tipo C8 e C18 tem valores de hidrofobicidade dentro do quarto quartil. É importante ressaltar que em fases estacionárias preparadas com a mesma sílica as fases do tipo fenil, com grupos polares embutidos, ciano e com cadeias alquílicas curtas têm menor

hidrofobicidade que fases C8 e C18, porém, esta afirmação não é válida para fases estacionárias preparadas com sílicas diferentes devido a diferentes percentagens de recobrimento e área superficial do suporte. O DPR para o parâmetro T/O é menor do que o DPR da hidrofobicidade, provavelmente porque o fator de separação do trifenileno e do o-terfenil não varia muito em função do tipo de sílica ou do ligante utilizado no preparo da fase estacionária. Nota-se que os valores do primeiro para o quarto quartil estão próximos, assim como os valores da média e da mediana também estão próximos (Tabela 2.12). Fases estacionárias do tipo C18 têm seletividade estérica próximas a da mediana, enquanto que fases estacionárias capazes de fazer interações do tipo  $\pi$ - $\pi$  (como perfluorofenil, grupo polar embutido e ciano) apresentam valores de seletividade estérica próximas ao do quarto quartil. No entanto, Interações do tipo  $\pi$ - $\pi$  na maior parte das fases fenil causam coeluição do o-terfenil e do trifenileno, devido a maior retenção do o-terfenil. O DPR do parâmetro C/P é um pouco maior que o DPR da hidrofobicidade. Normalmente, fases estacionárias C8 e C18 apresentam valores de C/P próximos a mediana. Fases estacionárias capazes de fazer interações do tipo  $\pi$ - $\pi$ , do tipo “aqua” (as reações de capeamento são feitas com silanos pequenos que contem hidroxilas) e preparadas com sílicas que contem alta quantidade de contaminantes metálicos (sílica do tipo A) apresentam valores de C/P próximos do quarto quartil. Os valores de capacidade de troca iônica a pH 7,6 e 2,7 (B/P 7,6 e B/P 2,7, respectivamente) são os parâmetros que possuem maior DPR, o que reforça a afirmação de que as propriedades de troca iônica definem estas fases estacionárias.

Atualmente, a grande maioria das fases estacionárias disponíveis comercialmente são preparadas utilizando sílicas com poucos contaminantes metálicos (sílica do tipo B) o que representa silanóis menos ácidos e, conseqüentemente, interações menos vigorosas dos solutos básicos com os silanóis residuais na superfície da sílica, além de se ter uma menor capacidade de troca iônica em meio ácido e neutro. Das 229 fases estacionárias estudadas por Euerby et al. [44] apenas três delas são fases estacionárias preparadas com sílicas do tipo A e, por esta razão, a mediana dos valores para a capacidade de

troca iônica a pH 7,6 e 2,7 é baixa. A grande diferença de valores entre a média e a mediana se deve a presença de algumas fases dentre as 229 estudadas que possuem altas propriedades de troca iônica, como as fases ZirChrom preparadas pelo recobrimento da zircônia com PBD, Primesep com grupos carboxila embutidos e Hypersil Duet Cátion, que apresentam valores para B/P 7,6 entre 20 e 10 e valores para B/P 2,7 entre 7 e 12.

Tanaka e colaboradores [9] propuseram inicialmente que fases estacionárias com altos valores de B/P 7,6 e B/P 2,7 não são adequadas para a análise de solutos básicos, enquanto que fases estacionárias com pequenos valores de B/P 7,6 e B/P 2,7 são apropriadas para a análise de compostos básicos, o que é verdadeiro em muitos casos. No entanto, as fases estacionárias ZirChrom possuem altos valores de B/P 7,6 e B/P 2,7 e fornecem bons resultados na análise de solutos básicos (alta seletividade, alta eficiência e fatores de assimetria próximos a unidade) [33-36].

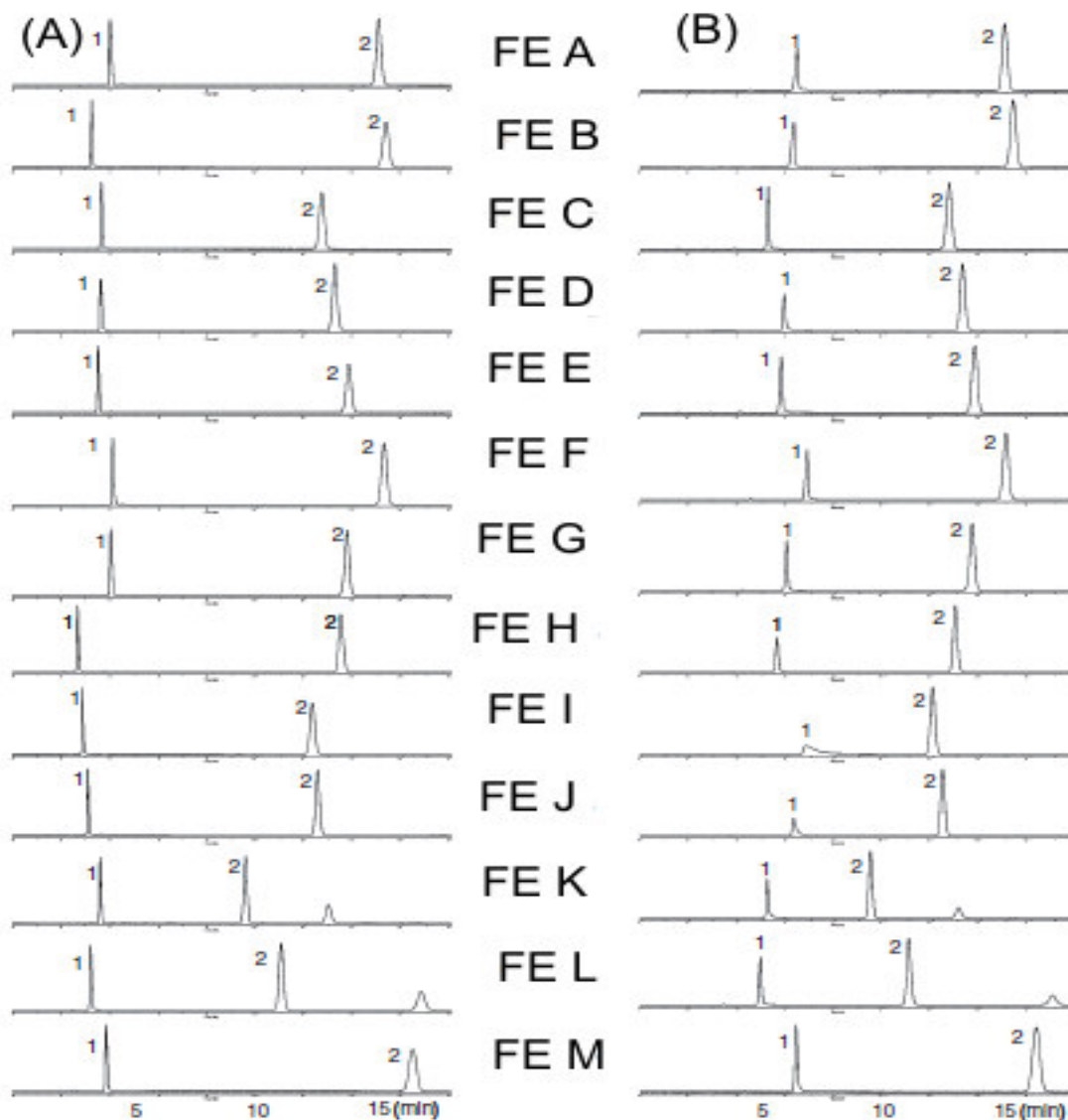
Okusa et al. [47] avaliaram os valores de B/P 7,6 e B/P 2,7 para 13 fases estacionárias do tipo C18 preparadas com sílica do tipo B, como é mostrado na Figura 2.34. As 13 fases apresentaram pequenos valores para B/P 2,7, devido a pouca retenção da benzilamina, e para B/P 7,6, embora a benzilamina tenha sido mais retida a pH 7,6 do que em pH 2,7, como é esperado para fases estacionárias preparadas com sílica do tipo B. Todas as fase estacionárias apresentaram fatores de assimetria próximos a unidade para benzilamina em pH 2,7. Já em pH 7,6 apenas as fases estacionárias Symmetry C18 e Luna 5u C18(2) (FE I e FE J, respectivamente) apresentaram fatores de assimetria maiores que 1,3 para a benzilamina.

Quando as mesmas fases estacionárias foram avaliadas frente a uma mistura de antidepressivos (Figura 2.35a) com fase móvel a pH 7, observou-se que, para as fases estacionárias Inertsil ODS-4, Inertsil ODS-3 e L-Column2 ODS (FE A, FE B e FE C) a mianserina elui depois da amitriptilina, enquanto que, com a FE J, estes solutos coeluem. Com todas as outras fases estacionárias, a amitriptilina elui depois da mianserina. A FE J, que forneceu fatores de assimetria elevados para a benzilamina no teste de Tanaka a pH 7,6, apresentou boa

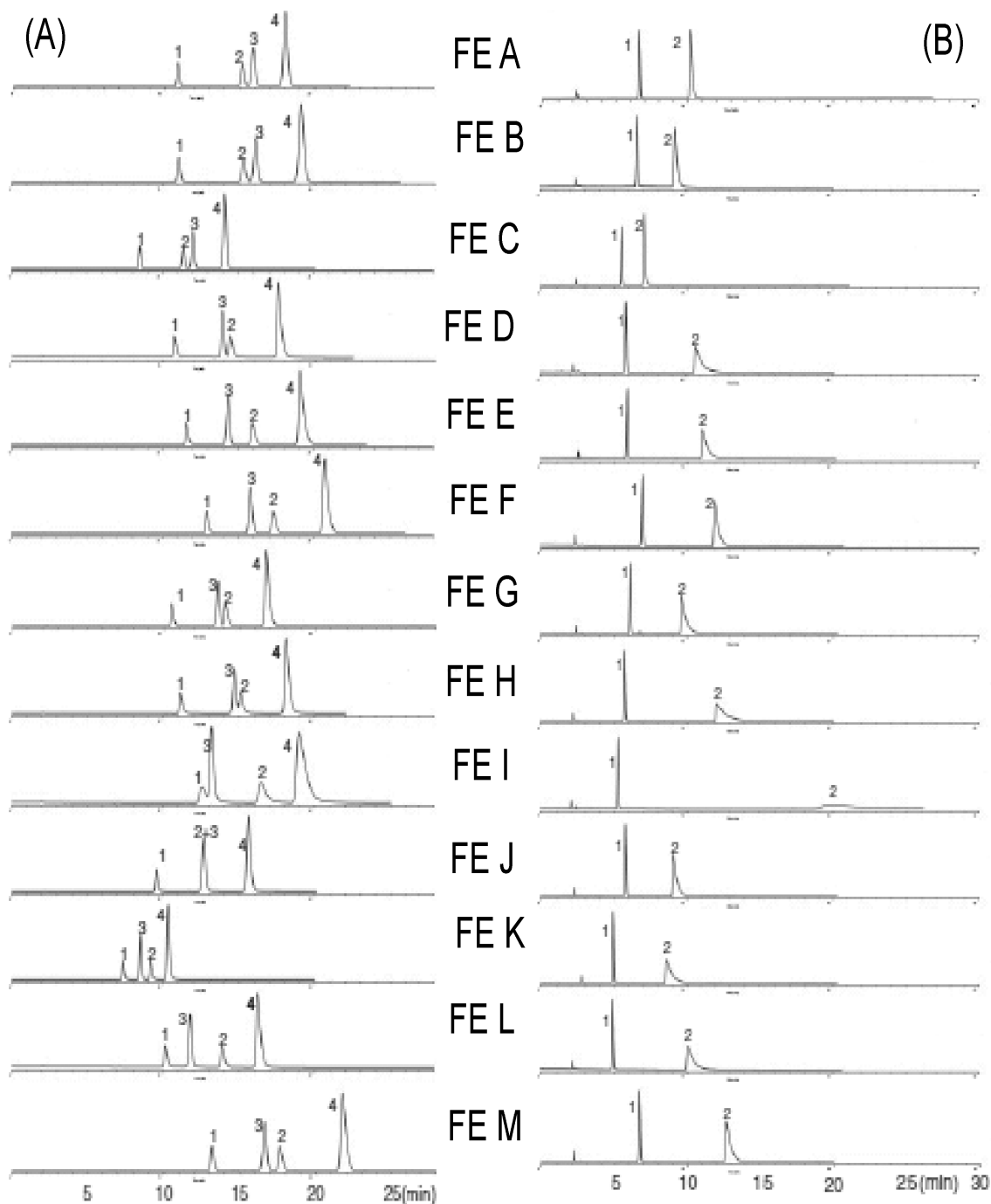
assimetria para os antidepressivos enquanto que a FE I, que tinha apresentado fatores de assimetria ainda mais elevados que a FE J para a benzilamina, foi a fase estacionária que apresentou os piores fatores de assimetria para os antidepressivos.

Por fim, as fases estacionárias foram avaliadas com fase móvel a pH 7 frente ao dextrometorfano (Figura 2.35b), onde apenas a FE A, FE B e FE C apresentaram assimetria de pico aceitável para este soluto. Novamente, o pior fator assimetria dentre todas as fase estacionárias estudadas foi apresentado pela FE I (Symmetry C18).

Com base nos resultados apresentados por Okusa et al. [47] pode-se observar que a avaliação das 13 fases estacionárias apenas com o teste de Tanaka seria impossível observar qual delas seria melhor para analisar compostos básicos, visto que todas têm valores de B/P 7,6 e B/P 2,7 similares. Quando os fatores de assimetria da benzilamina são incluídos nos resultados, é possível diferenciar apenas a FE I e FE J das demais, enquanto a análise das fases estacionárias com uma mistura de antidepressivos permite um melhor entendimento da seletividade. A avaliação do fator de assimetria do dextrometorfano mostra claramente que, dentre as fases estacionárias avaliadas, FE A, FE B e FE C são as fases estacionárias mais apropriadas para analisar solutos básicos. Se uma das 13 fases estacionárias tivesse de ser escolhida para analisar compostos básicos, levando em conta apenas o fator de assimetria do dextrometorfano, estas fases seriam escolhidas como as melhores alternativas, mas se o alvo da análise fosse separar a amitriptilina da mianserina, FE E, FE F e FE L seriam alternativas mais interessantes (Figura 2.35.A). A desvantagem de testes que classificam as fases estacionárias com “melhores” ou “piores” para analisar solutos básicos é que estes testes não fornecem nenhuma idéia a respeito da seletividade da fase estacionária.



**Figura 2.34:** Avaliação de 13 fases estacionárias com a mistura teste de Tanaka (A) Avaliação de B/P 2,7. Fase móvel: metanol:tampão fosfato (pH 2,7; 20 mmol/L) 30:70 (v/v) (B) Avaliação de B/P 7,6. Fase móvel: metanol:tampão fosfato (pH 7,6; 20 mmol/L) 30:70 (v/v). Colunas: 150 x 4,6 mm. Vazão: 1,0 mL/min. Temperatura: 40 °C. Identificação dos solutos: (1) = benzilamina; (2) = fenol. Identificação das fases estacionárias: FE A = Inertsil ODS-4 (GL Sciences); FE B = Inertsil ODS-3 (GL Sciences); FE C = L-Column2 ODS (Chemicals Evaluation and Research Institute, Tóquio , Japão); FE D = Capcell Pak C18 MGII (Shiseido, Tóquio , Japão); FE E = YMC-Pack Pro C18 (YMC, Tóquio , Japão); FE F = TSK-GEL ODS-100 V (Tosoh, Chunam, Japão); FE G =Atlantis T3 d18; FE H = Sunfire C18 (Waters, Milford, EUA); FE I = Symmetry C18 (Waters, Milford, EUA); FE J = Luna 5u C18(2) (Phenomenex, Torrance, EUA); FE K = Hypersil GOLD (Thermo Scientific, Waltam, EUA); FE L = Zorbax Eclipse Plus C18 (Agilent Technologies, Santa Clara EUA); e FE M = PLATISIL ODS (DIKMA, Beijing, China). (Figura adaptada da referência 47).



**Figura 2.35:** Avaliação de 13 fases estacionárias. **(A)** Com a uma mistura de antidepressivos (1) = imipramina; (2) = amitriptilina; (3) = mianserina; (4) = clomipramina. Fase móvel: acetonitrila:tampão fosfato 60: 40 (v/v) (pH 7; 20 mmol/L). **(B).** Com (1) = fenol e (2) = dextrometorfan. Fase móvel: acetonitrila:tampão fosfato 40: 60 (v/v) (pH 7; 20 mmol/L). Vazão: 1,0 mL/min. Temperatura 40 °C. Identificação das fases estacionárias: como na Figura 2.34. (Figura adaptada da referência 47).



## Teste de Engelhardt

O teste original de Engelhardt foi proposto no ano de 1990 [3] e utiliza apenas uma fase móvel não tampnada (metanol:água 55:24 (v/v) a 40 °C) e avaliava a atividade silanofílica com uma série de toluidinas (p-toluidina, pKa 5,12, m-toluidina, pKa 4,69, e o-toluidina, pKa 4,39 [10]) porque as toluidinas apresentam hidrofobicidades muito semelhantes e a separação destes solutos ocorre por interações com os silanóis residuais. Os autores concluíram que uma fase estacionária ideal para a análise de compostos básicos deve falhar na separação das toluidinas ou apresentar fatores de separação menores que 1,05. A atividade silanofílica também era medida pelo fator de separação da anilina e do fenol ( $k_A/k_P$ ), sendo que a anilina deveria eluir antes do fenol quando a fase estacionária possui poucos silanóis residuais. Outros fatores levados em conta eram o fator de separação entre tolueno e p-toluidina, que deveria ser maior que 4 ( $k_T/k_{p-E}$ ), e a razão entre os fatores de assimetria da anilina e do fenol, que deveria ser menor que 1,3 [3] ( $A_{sA}/A_{sP}$ ).

Em 1997, em outro trabalho, Engelhardt et al. [4] afirmou que é mais interessante avaliar a atividade silanofílica apenas pelo fator de assimetria da p-etilanilina, e classificou as fases estacionárias conforme o nível de atividade silanofílica da seguinte forma: (a) baixa atividade silanofílica (quando o fator de assimetria da p-etilanilina ( $A_{sp}$ ) é menor ou igual a 2), (b) atividade silanofílica intermediária (para  $2 > A_{sp} \leq 5$ ) e (c) alta atividade silanofílica, quando  $A_{sp}$  é maior que 5.

Atualmente, a grande maioria das fases estacionárias disponíveis no mercado são preparadas com sílicas do tipo B e fornecem bons formatos de pico até mesmo para bases fortes ( $pK_a > 9$ ), tais como, benzilamina e antidepressivos tricíclicos. Por isso, é necessário que solutos ainda mais desafiadores (como o dextrometorfano) sejam utilizados para diferenciar se uma determinada fase estacionária é mais apropriada que a outra para ser utilizada na análise de compostos básicos, como já foi discutido nos exemplos das **Figura 2.34** e **Figura 2.35**.

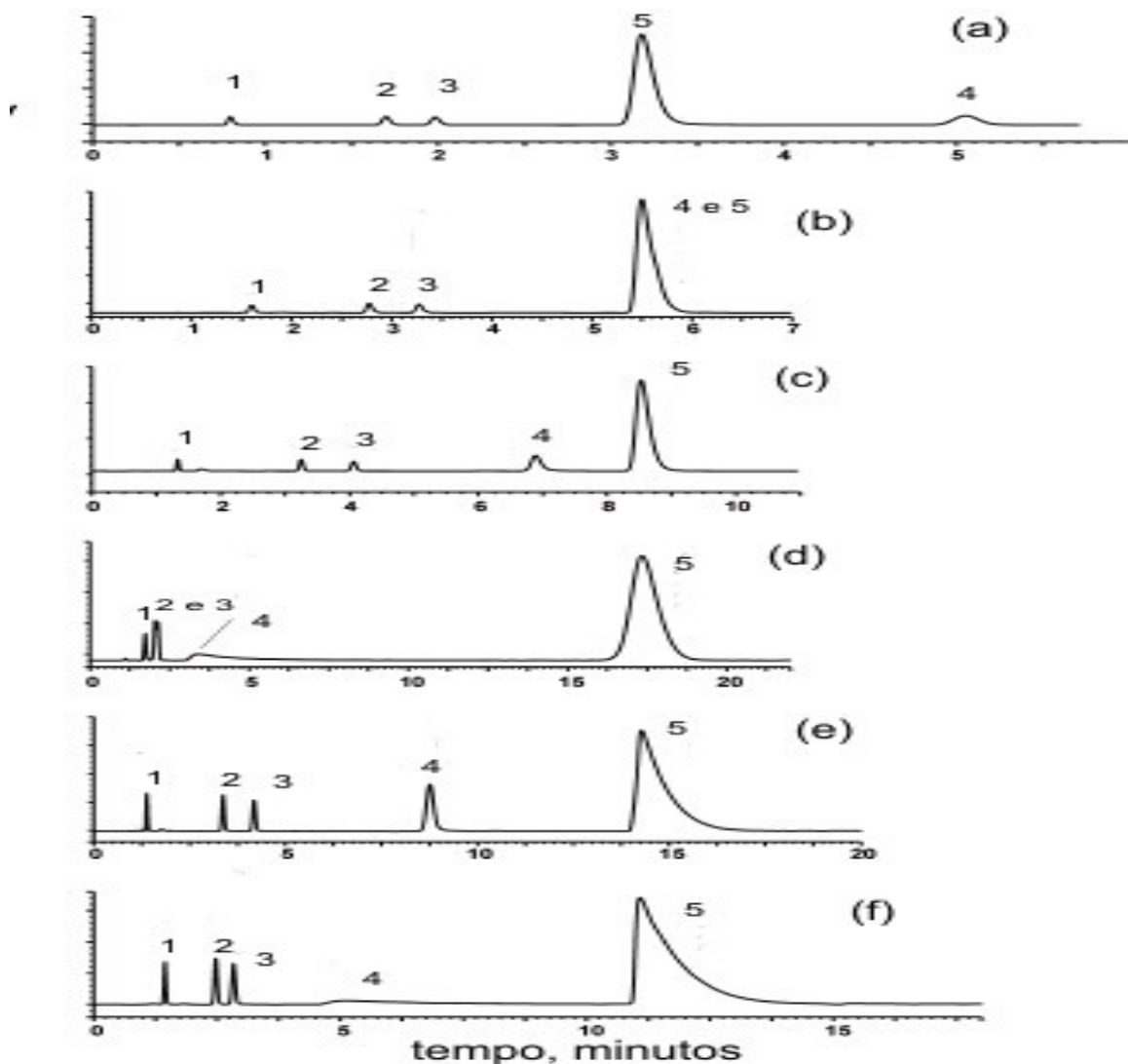
Outros fatores que limitam o teste de Engelhardt é a alta correlação dos parâmetros obtidos com este teste, como indica o estudo conduzido por Araigo et al. [10] onde 23 fases estacionárias abrangendo as do tipo C8, C18 e recobertas com poliácrlato (todas preparadas com sílicas do tipo B) foram avaliadas. Araigo et al. observou que os fatores de retenção de todos os solutos apresentaram alta correlação e que os parâmetros utilizados para avaliar atividade silanofílica ( $k_T/k_{p-E}$ ,  $A_{sA}/A_{sP}$  e  $k_A/k_P$ ) apresentaram DPR inferior a 15%. Desta forma, pode-se afirmar que o teste de Engelhardt não é útil para avaliar fases estacionárias preparadas com sílica do tipo B, uma vez que parâmetros correlacionados fornecem a mesma informação e parâmetros com pequeno DPR indicam que a propriedade cromatográfica avaliada varia pouco de uma fase estacionária para outra, não sendo úteis para diferenciar as fases estacionárias.

## Teste SRM 870

O teste SRM 870 foi desenvolvido no ano de 2003 [6-8] e consiste na análise de uma mistura-teste com cinco solutos (uracila, tolueno, etilbenzeno, quinizarina e amitriptilina) com fase móvel metanol:tampão fosfato (pH 7; 20 mmol/L) a 23 °C. Este teste avalia as fases estacionárias frente aos seguintes parâmetros cromatográficos: hidrofobicidade, medida pelo fator de retenção do etilbenzeno ( $k_E$ ); atividade silanofílica, mediada pelo fator de retenção e de alargamento da amitriptilina ( $k_{ami}$  e  $Tf_{ami}$ , respectivamente) e a pureza da sílica, medida pelo fator de alargamento da quinizarina ( $Tf_Q$ ).

Este teste considera os fatores de separação do etilbenzeno e do tolueno como constantes. As fases estacionárias apropriadas para analisar solutos básicos apresentam comportamento cromatográfico semelhante ao observado na Figura 2.36a, b e c, onde a quinizarina elui depois da amitriptilina em fases estacionárias com grupo polar embutido. Já fases estacionárias menos adequadas para a análise de compostos básicos apresentam comportamento cromatográfico semelhante ao mostrado na Figura 2.36(d), e (e). No caso da Figura 2.36d, a fase estacionária foi contaminada por metais liberados pelo corpo da coluna e/ou pelos

filtros. Fases estacionárias preparadas com sílica do tipo A apresentam comportamento cromatográfico semelhante da Figura 2.36f e não devem ser utilizadas na análise de solutos básicos.



**Figura 2.36:** Exemplos do teste SRM 870 com fases estacionárias com: (a) atividade silanofílica e quantidades de metal na sílica baixas e com grupo polar embutido, (b) atividade silanofílica e quantidades de metal na sílica, (c) baixa atividade silanofílica e baixas quantidades de metal na sílica, (d) atividade silanofílica moderada e altas quantidades de metal na sílica, (e) alta atividade silanofílica e quantidades moderadas de metal na sílica e (f) atividade silanofílica e quantidades de metal na sílica altas. Fase móvel: 80:20 (v/v) metanol:tampão fosfato (pH 7; 20 mmol/L). Colunas de 150 x 4,6 mm. Vazão: 1,5 mL/mim.

Temperatura: 23 °C. Identificação dos solutos: (1) = uracila; (2) = tolueno, (3) = etilbenzeno; (4) = quinizarina; (5) = amitriptilina.

As correlações entre os parâmetros avaliados com o teste SRM 870 e a estatística básica para os resultados para 108 fases estacionárias são mostrados nas Tabela 2.13 e Tabela 2.14, respectivamente. A Tabela 2.13 mostra que os quatro parâmetros avaliados com este teste não estão correlacionados e fornecem informações distintas a respeito das propriedades das fases estacionárias. O fator de retenção e o fator de alargamento da amitriptilina não estão correlacionados, o que reforça as observações de que fases estacionárias com altas propriedades de troca iônica não fornecem necessariamente maus resultados na análise de solutos básicos.

**Tabela 2.13:** Correlações entre os quatro parâmetros obtidos com o teste SRM 870 [6-8] obtidos com 108 fases estacionárias (As correlações foram calculadas com os valores da referência 12)

	$Tf_Q$	$k_{ami}$	$Tf_{ami}$
$k_E$	-0,11	0,42	-0,02
$Tf_Q$		-0,03	0,29
$k_{ami}$			0,18

**Tabela 2.14:** Estatística básica obtida para quatro parâmetros obtidos com o teste SRM 870 [6-8] para 108 fases estacionárias (A estatística básica foi calculadas com os valores da referência 12)

	<i>média</i>	<i>mediana</i>	<i>primeiro quartil</i>	<i>quarto quartil</i>	<i>DPR</i>
$k_E$	1,81	1,80	1,30	2,20	42,76
$Tf_Q$	1,66	1,40	1,20	1,70	69,11
$k_{ami}$	6,26	5,30	3,50	7,50	70,44
$Tf_{ami}$	2,54	2,10	1,50	2,90	65,31

A Tabela 2.14 mostra que os quatro parâmetros têm DPR razoável. O DPR do fator de retenção do etilbenzeno é menor do que o DPR do fator de retenção do pentilbenzeno no teste de Tanaka, provavelmente porque este teste avaliou apenas 108 fases estacionárias (Euerby et al. [14] avaliaram 229 fases estacionárias), sendo que a maioria delas são do tipo C18. Por sua vez, o DPR para os fatores de assimetria da amitriptilina e da quinizarina é razoável, mas menor do que os DPR obtidos para B/P 2,7 e B/P 7,6 com o teste de Tanaka, pela mesma razão e também porque todas as fases estacionárias eram preparadas com sílica do tipo B. No entanto, a média, a mediana e o primeiro quartil dos

fatores de assimetria para amitriptilina mostram que muitas das fases estacionárias disponíveis comercialmente fornecem altos fatores de assimetria para a amitriptilina embora os fabricantes afirmem que estes materiais sejam preparados com sílicas do tipo B e sejam úteis para a análise de solutos básicos. Por exemplo, a fase estacionária Zorbax Rx-C18 da Agilent fornece um fator de assimetria de 6,8 (que é considerado como inaceitável) para a amitriptilina [12], embora o fabricante afirme que esta fase estacionária é preparada com sílica do tipo B [48]. Considerando estes resultados, pode-se afirmar que o teste SRM 870 é útil para avaliar fases estacionárias e que a amitriptilina é um soluto-teste eficiente para tal fim, embora o dextrometorfano seja um soluto mais “desafiador” e proporcione uma melhor diferenciação das fases estacionárias, como foi mostrado no exemplo da Figura 2.35.

## **Visão geral sobre os testes cromatográficos**

Existem diversos testes cromatográficos descritos na literatura e uma revisão destes testes foi feita recentemente por Lesellier & West [11]. Dentre estes, os testes mais utilizados são os de Engelhardt, Tanaka e SRM 870. Nestes testes (ou em outros testes descritos na literatura [11]) a hidrofobicidade é medida pelo fator de retenção de um soluto neutro e testes que avaliam a hidrofobicidade com solutos neutros como etilbenzeno e pentilbenzeno, que são sempre altamente correlacionados [49,50], enquanto a atividade silanofílica é avaliada pelo fator de assimetria de um soluto básico ou pelo fator de separação entre um soluto básico e um neutro, sendo que estes testes não são correlacionados [49-51]

A escolha de uma fase estacionária apropriada para analisar solutos básicos com base nos testes Engelhardt, SRM 870 e Tanaka parte do princípio de que as fases estacionárias mais apropriadas para analisar solutos básicos apresentam pequenos valores de C/P, B/P 2,7 e B/P 7,6 e fatores de assimetria para p-etilanilina e amitriptilina próximos a unidade. Com base nestes princípios, Rogers [51] avaliou 15 fases estacionárias (descritas na Tabela 2.15) com os testes Engelhardt, SRM 870 e Tanaka, e observou que cada um dos cinco

parâmetros cromatográficos levam a escolhas distintas, como é mostrado na, onde Tabela 2.16, onde as fases estacionárias mais adequadas as fases estacionárias mais adequadas para analisar compostos básicos receberam “*ranking*” 1 enquanto que as menos apropriadas recebem “*ranking*” 6.

**Tabela 2.15:** Colunas avaliadas por Rogers [51]. Todas as colunas 150 x 4,6 mm. (Tabela adaptada da referência 52)

<i>Fase estacionária</i>	<i>Fabricante</i>	<i>Abreviação</i>	<i>características</i>
Discovery C18	Supelco	DISC	capeada
Supelcosil-LC-18-DB	Supelco	SUPL	Sílica tipo B
Symmetry 300 18	Waters	SYM3	Poros de 300 Å
Symmetry C18	Waters	SYMM	Sílica tipo B
Symmetry Shield RP18	Waters	SYMS	Grupo polar embutido
YMC Pro 18	Waters	YMCP	Capeada
YMC Basic S5	Waters	YMCB	Sílica tipo B
Spherisorb ODS-2	Waters	SPH2	Capeada
Spherisorb ODS-1	Waters	SPH1	ODS
mBondapack C18	Waters	UBON	Capeada
Nova-Pak C18	Waters	NOVP	Capeada
Zorbax Rx-C18	Agilent	ZRX	ODS
Eclipse XDB-C18	Agilent	ECLP	Capeamento duplo
Zorbax SB-C18	Agilent	ZXSB	Estericamante protegida
Zorbax ODS	Agilent	ZXOD	Capeada
XTerra RP18	Waters	XTRA	Sílica híbrida

Como o pH da fase móvel afeta a ionização dos solutos e dos silanóis residuais as propriedades cromatográficas das fases estacionárias mudam em função do pH, como é mostrado na Tabela 2.17, onde cada uma das fases estacionárias apresenta maior eficiência e fatores de assimetria mais próximos a unidade em um valor de pH diferente. Por exemplo, na Tabela 2.17 a fase estacionária Eclipse XDB-C18 apresenta maiores eficiências em pH 4,5 e fatores de assimetria mais próximos da unidade em pH 6,5 enquanto a fase estacionária XTerra RP18 apresenta maiores eficiências em pH 6,5 e fatores de assimetria mais próximos a unidade em pH 5,5. Desta forma se as, três fases estacionárias que obtiveram as melhores classificações na Tabela 2.15 e a fase estacionária híbrida XTerra RP18 fossem avaliadas com uma mistura de solutos básicos em diferentes valores de pH e a fase estacionária como a maior média dos valores de eficiência e com a media dos fatores de assimetria próximos a unidade fosse escolhida como a fase estacionária mais apropriada para analisar solutos básicos

diferentes escolhas poderiam ser feitas dependendo do pH em que o teste é realizado, como é mostrado na Tabela 2.17

Com base nestes resultados pode-se afirmar que os testes que classificam as fases estacionárias como adequadas, ou não, para a análise de compostos básicos com base nas propriedades de troca iônica definidas com o fator de separação de um soluto básico por um soluto neutro, não são apropriadas para tal fim, uma vez que altas propriedades de troca iônica de uma fase estacionária não indicam se a mesma irá fornecer altos fatores de assimetrias e baixos valores de eficiências para solutos básicos. Enquanto isso, a avaliação do fator de assimetria é um parâmetro mais eficiente para tal fim. No entanto, quando a escolha de qual fase estacionária é mais apropriada para analisar solutos básicos for feita com base no fator de assimetria, a escolha da melhor fase estacionária dependerá do soluto ou dos solutos utilizados e do pH da fase móvel.

**Tabela 2.16:** “Ranking” (Rg) de 15 fases estacionárias de acordo com os testes de Engelhardt, SRM 870 e Tanaka. A fase estacionária que recebe “ranking 1” é considerada como a mais adequada para analisar solutos básicos mediante os resultados obtidos com cada teste, onde quanto menores os valores de C/P, B/P 2,7 e B/P 7,6 e mais próximos da unidade os valores de  $As_p$  e  $As_{ami}$  as fases estacionárias são consideradas mais apropriadas para analisar compostos básicos. As abreviações dos nomes das fases estacionárias são mostradas na Tabela 2.15. (Valores retirados da referência 51).

Fase estacionária	$As_p$	Rg	$As_{ami}$	Rg	C/P	Rg	B/P 7,6	Rg	B/P 2,7	Rg
DISC	1,3	1	1,9	1	1,9	4	0,30	1	0,09	2
SUPL	1,5	2	8,9	6	2,2	5	0,35	2	0,12	3
SYM3	3,2	6	1,3	1	2,5	6	0,30	1	0,09	2
SYMM	1,3	1	4,2	4	2,1	5	0,37	2	0,06	1
SYMS	1,2	1	2,5	2	2,1	5	0,27	1	0,03	1
YMCP	1,2	1	3,2	3	1,9	4	0,27	1	0,07	2
YMCB	1,3	1	2,5	2	1,9	4	0,39	2	0,09	2
SPH2	1,5	2	8,5	6	1,0	1	0,23	1	0,17	5
SPH1	1,6	2	6,3	6	2,6	6	0,41	2	0,23	6
UBON	1,1	1	3,6	3	1,3	2	0,49	3	0,15	4
NOVP	2,5	6	5,1	5	1,7	3	0,73	5	0,11	3
ZXRX	1,2	1	8,3	6	1,4	2	0,71	5	0,07	2
ECLP	1,4	2	1,6	1	1,9	4	0,49	3	0,08	3
ZXSB	1,5	2	2,3	2	1,5	2	0,87	6	0,09	3
ZXOD	1,3	1	6,2	6	1,5	2	0,35	1	0,14	5

**Tabela 2.17:** Determinação da melhor fase estacionária para analisar solutos básicos com base na média das eficiências (N) e dos fatores de assimetria (As) dos solutos 4-etilanilina, 4-picolina, 2,4-lutidina, 4-hidroxiquinolina, 4-nitrofenol, and 4-aminofenol. Fase móvel: acetonitrila: tampões citrato e fosfato, 20 mmol/L 10:90 (v/v). Vazão: 1,5 mL/min. Temperatura: 25 °C. (Tabela adaptada da referência 51)

	<i>ECLP</i>	<i>XTRA</i>	<i>SYMS</i>	<i>DISC</i>	<i>SYMM</i>	<i>melhor fase estacionária</i>
pH 2,65						SYMS
As	1,8	2,08	1,15	2,54	1,54	
N	3800	3600	3100	1100	2500	
pH 3,5						SYMS
As	2,09	1,96	1,39	2,14	1,74	
N	3500	3300	4000	1500	3000	
pH 4,5						SYMM
As	1,79	1,36	1,38	1,51	1,31	
N	5100	6100	5300	1800	2200	
pH 5,5						XTRA
As	1,58	1,14	2	1,3	1,26	
N	2400	5100	2800	2100	2100	
pH 6,5						XTRA
As	1,46	1,24	1,76	1,71	1,86	
N	2200	9300	5900	2800	3000	
pH 7,4						SYMS
As	1,65	1,56	1,52	1,93	2,06	
N	2100	4900	5000	2000	4400	
Média (As)	1,71	1,45	1,63	1,71	1,65	XTRA
Média (N)	3124	5746	4582	2074	2917	

## Referências

1. H.A. Claessens, Trends Anal. Chem. 20 (2001) 563-583.
2. E. Tonhi, K.E. Collins, I.C.S.F. Jardim, C.H. Collins, Quim. Nova 25 (2002) 616-623.
3. H. Engelhardt, M. Jungheim, Chromatographia 29 (1990) 59-68.
4. H. Engelhardt, M. Arangio, T. Lobert, LC–GC Int. 10 (1997) 803-812.
5. S.J. Schmitz, H. Zwanziger, H. Engelhardt, J. Chromatogr. 544 (1991) 381-391.
6. L. Sander, S.A. Wise, J. Sep. Sci. 26 (2003) 283-294.
7. National Institute of Standards and Technology, SRM 870, Column Performance Test Mixture, Gaithersburg, MD, 2002.
8. <http://www.usp.org/USPNF/columnsDB.html> acessado em 2 de fevereiro de 2010.
9. K. Kimata, K. Iwaguchi, S. Onishi, K. Jinno, R. Eksteen, K. Hosoya, M. Arki, N. Tanaka, J. Chromatogr. Sci. 27 (1989) 721-728.
10. <http://www.acdlabs.com/resources/freeware/> Acessada em 22 de Setembro de 2010.
11. E. Lesellier, C. West, J. Chromatogr. A 1158 (2007) 329–360.



12. C.H. Collins, G.L. Braga, P.S. Bonato, Fundamentos de Cromatografia, 4ª edição ., Editora da Unicamp, Campinas, 2006.
13. R.M. Ornaf, M.W. Dong In S. Ahuja, M.W. Dong (Eds) 6<sup>th</sup> Volume, Handbook of Pharmaceutical Analysis by HPLC, Elsevier Academic Press, Londres, 2005, pg 19-45.
14. A. Braithwaite, F.J. Smith, "Chromatographic Methods", 4ª. edição, Chapman and Hall, Londres, 1985.
15. Y. Kazakevich, R. Lobrutto, HPLC for Pharmaceutical Scientists, Wiley-Interscience Hoboken, 2005.
16. [http://www.lcresources.com/resources/TSWiz/TF\\_definition.gif](http://www.lcresources.com/resources/TSWiz/TF_definition.gif) Acessada em 8 de fevereiro de 2011.
17. <http://www.mac-mod.com/tr/07031-tr.html> Acessada em 8 de fevereiro de 2011.
18. M.C. McMaster, HPLC: A Practical User's Guide John Wiley & Sons, Hoboken, Nova Jersey, 2<sup>th</sup> ed., 2007.
19. X. Yang, J. Dai, P.W. Carr, J. Chromatogr. A 996 (2003) 13–31.
20. <http://chromatographyonline.findanalytichem.com/lcgc/article/articleDetail.jsp?id=460300&sk=&date=&pageID=2> acessada em 11/03/2011.
21. H. Engelhardt, Ch. Blay, J. Saar, Chromatographia, Suppl 62 (2005) S19-S29.
22. P. Agrafiotou, C. Ràfols, C. Castells, E. Bosch, M. Rosés, J. Chromatogr. A (2011), doi:10.1016/j.chroma.2010.12.119.
23. X. Subirats, E. Bosch, M. Rosés, J. Chromatogr. A 1216 (2009) 2491–2498.
24. X. Subirats, E. Bosch, M. Rosés, J. Chromatogr. A 1138 (2007) 203–215.
25. S.M.C. Buckenmaier, D.V. McCalley, M.R. Euerby, J. Chromatogr. A 1004 (2003) 71–79.
26. S.M.C. Buckenmaier, D.V. McCalley, M.R. Euerby, J. Chromatogr. A 1026 (2004) 251–259.
27. L.G. Gagliardi, C.B. Castells, C. Ràfols, M. Rosés, E. Bosch, J. Sep. Sci. 31 (2008) 969–980.
28. H.A. Claessens, M.A. Van Straten, J. Chromatogr. A. 1060 (2004) 23-41.
29. Y.-F. Cheng, T.H. Walter, Z. Lu, P. Iraneta, B.A. Alden, C. Gendreau, U.D. Neue, J.M. Grassi, J.L. Carmody, J.E. O'Gara, R. Fisk, LC–GC 18 (2000) 1162-1172.
30. K.D. Wyndham, J.E. O'Gara, T.H. Walter, K.H. Glose, N.L. Lawrence, B.A. Alden, G.S. Izzo, C.J. Hudalla, P.C. Iraneta, Anal. Chem. 75 (2003) 6781.
31. <http://pubs.acs.org/cen/coverstory/86/8617cover.html> acessada em 2 de fevereiro de 2011.
32. N.H. Davies, M.R. Euerby, D.V. McCalley, J. Chromatogr. A 1178 (2008) 71–78.
33. J. Nawrocki, C. Dunlap, J. Li, J. Zhao, C.V. McNeff, A. McCormick, P.W. Carr, J. Chromatogr. A 1028 (2004) 1–30.
34. J. Nawrocki, C. Dunlap, J. Li, J. Zhao, C.V. McNeff, A. McCormick, P.W. Carr, J. Chromatogr. A 1028 (2004) 31–62.
35. J. Dai, X. Yang, P.W. Carr, J. Chromatogr. A. 1005 (2003) 63–82.
36. Y. Hu, X. Yang, P.W. Carr, J. Chromatogr. A. 968 (2002) 17-29.

37. N.H. Davies, M.R. Euerby, D.V. McCalley, J. Chromatogr. A 1138 (2007) 65–72.
38. H.A. Claessens, M.A. van Straten, J. Chromatogr. A. 1060 (2004) 23–41.
39. J.J. Kirkland, J. Chromatogr. A 1060 (2004) 9–21
40. T. Teutenberg, K. Hollebekkers, S. Wiese, A. Boergers, J. Sep. Sci. 32 (2009) 1262–1274.
41. U. Neue, K. Van Tran, P.C. Iraneta, B. A. Alden, J. Sep. Sci. 26 (2003) 174–186.
42. H.A. Claessens, M.A. van Straten, J.J. Kirkland, J. Chromatogr. A, 728 (1996) 259–270.
43. J.J. Kirkland, M.A. van Straten, H.A. Claessens, J. Chromatogr. A, 797 (1998) 111–120.
44. M.R. Euerby, P. Petersson, LC-GC Eur. 13 (2000) 665–677.
45. M.R. Euerby, P. Petersson, J. Chromatogr. A 994 (2003) 13–36.
46. <http://www.acdlabs.com/resources/freeware/>.
47. K. Okusa, Y. Suita, Y. Otsuka, M. Tahara, T. Ikegami, N. Tanaka, M. Ohira, M. Takahashi J. Sep. Sci. 33 (2010) 348–358.
48. <http://www.chem.agilent.com/Library/datasheets/Public/880969-001e.pdf>
49. H.A. Claessens, M.A. van Straten, C.A. Cramers, M. Jezierskab, B. Buszewski J. Chromatogr. A 826 (1998) 135–156.
50. D. Visky, Y.V. Heyden, T. Ivany, P. Baten, J. De Beer, Z. Kovacs, B. Noszal, E. Roets, D. L. Massart, J. Hoogmartens, J. Chromatogr. A 977 (2002) 39–58.
51. S.D Rogers. Tese de doutorado, Chromatographic Silanol Activity Tests: The Development of a Comprehensive Test Procedure. The Florida State University, Tallahassee, 2003. [http://etd.lib.fsu.edu/theses/available/etd-08192004-103718/unrestricted/Rogers\\_S.pdf](http://etd.lib.fsu.edu/theses/available/etd-08192004-103718/unrestricted/Rogers_S.pdf)



## **Capítulo 3: Chromatographic evaluation of some stationary phases based on poly(methyloctylsiloxane) immobilized onto silica**

### **Abstract**

Several stationary phases were prepared by thermal immobilization of poly(methyloctylsiloxane) onto a silica surface using different amounts of poly(methyloctylsiloxane), and different times and temperatures of immobilization to provide different carbon contents for the phases. The chromatographic properties were evaluated using the Tanaka test. Comparison of the results obtained with literature data using hierarchical cluster analysis showed dissimilarity with most of the commercial phases. Some basic pharmaceuticals, including six benzodiazepines were separated on one of the better PMOS phases.

**Keywords:** stationary phase, poly(methyloctylsiloxane), hierarchical cluster analysis, Tanaka test, HPLC.

## Introduction

Reversed-phase high performance liquid chromatography (RP-HPLC) is a well-known technique for the sequential determination of many compounds, such as drugs, pesticides and petrochemicals. The stationary phases are, perhaps, the most important component in an HPLC system. For this reason a large number of stationary phases are commercially available.

Each application can be related to certain chromatographic properties of the stationary phases. For example, low ion exchange character, defined by the separation factor of a basic and neutral solute, is usually related to better coverage of residual silanols and is required for the analysis of basic compounds like amino acids, pharmaceuticals, pesticides, etc. On the other hand, when the focus is the analysis of polyaromatic hydrocarbons the principal chromatographic property relates to shape selectivity, the ability in separate solutes with similar polarity and size, but different shapes.

To understand the properties of the many different stationary phases in order to choose a stationary phase for a specific application, several different classifications based on chromatographic, spectroscopic or physical properties have been proposed [1-4]. However, spectroscopic and other physical properties usually do not provide a sufficient understanding of the differences in the stationary phase properties so chromatographic tests are more commonly applied.

There are several chromatographic approaches to characterize stationary phases [5-712], recently reviewed by Lesellier & West [013]. Several studies have investigated correlations between the properties [1,14,15] concluding that retention factor and efficiency for neutral solutes are correlated while silanol activity is largely uncorrelated. Some properties, such as metal content and shape selectivity were not considered by all procedures, yielding different results.

Among the chromatographic tests described in literature [0], the most popular test is that of Tanaka and co-workers [5]. Using this test Euerby and co-

workers [16-21] studied a large number of commercial alkyl (C<sub>3</sub>, C<sub>8</sub>, C<sub>12</sub>, C<sub>18</sub>), cyano, phenyl, perfluorinated, polar embedded, polar/hydrophilic (enhanced polar selectivity) and “aqua type” stationary phases, applying classification systems using hierarchical cluster analysis (HCA) and principal component analysis (PCA) to provide a chromatographic classification and comparison system for commercially available stationary phases for reversed-phase liquid chromatography.

HCA distances between pairs of samples (or variables) are calculated and compared. When distances between samples are relatively small, this implies that the samples are similar, at least with respect to the measurements in hand. Dissimilar samples will be separated by relatively large distances. HCA groups data into clusters having similar attributes [22].

The primary purpose of HCA is to present data in a manner which emphasizes natural groupings. In contrast to techniques that group samples into pre-existing categories, HCA seeks to define these categories in the first place. The presentation of HCA results in a plot called a dendrogram, which facilitates the visual recognition of the categories. HCA can focus on samples or variables. Clustering of samples reveals similarities among the samples while clustering of variables pinpoints intervariable relationships. [22]. This study applied HCA to the results of the Tanaka test on a series of stationary phases prepared by thermal immobilization of poly(methyloctylsiloxane) (PMOS) on to silica and on the data for commercial phases presented by Euerby and co-workers [16-21] to correlated those phases with commercial phases.

Polysiloxanes immobilized onto the surfaces of porous silica particles have proven to be good stationary phases for separation of diverse samples and for concentration and clean-up using solid phase extraction [23]. To illustrate their usefulness, some applications of these phases with real samples are shown using both methanol and ethanol as mobile phases. The later is an example of green chemistry [24,25].

## Materials and methods

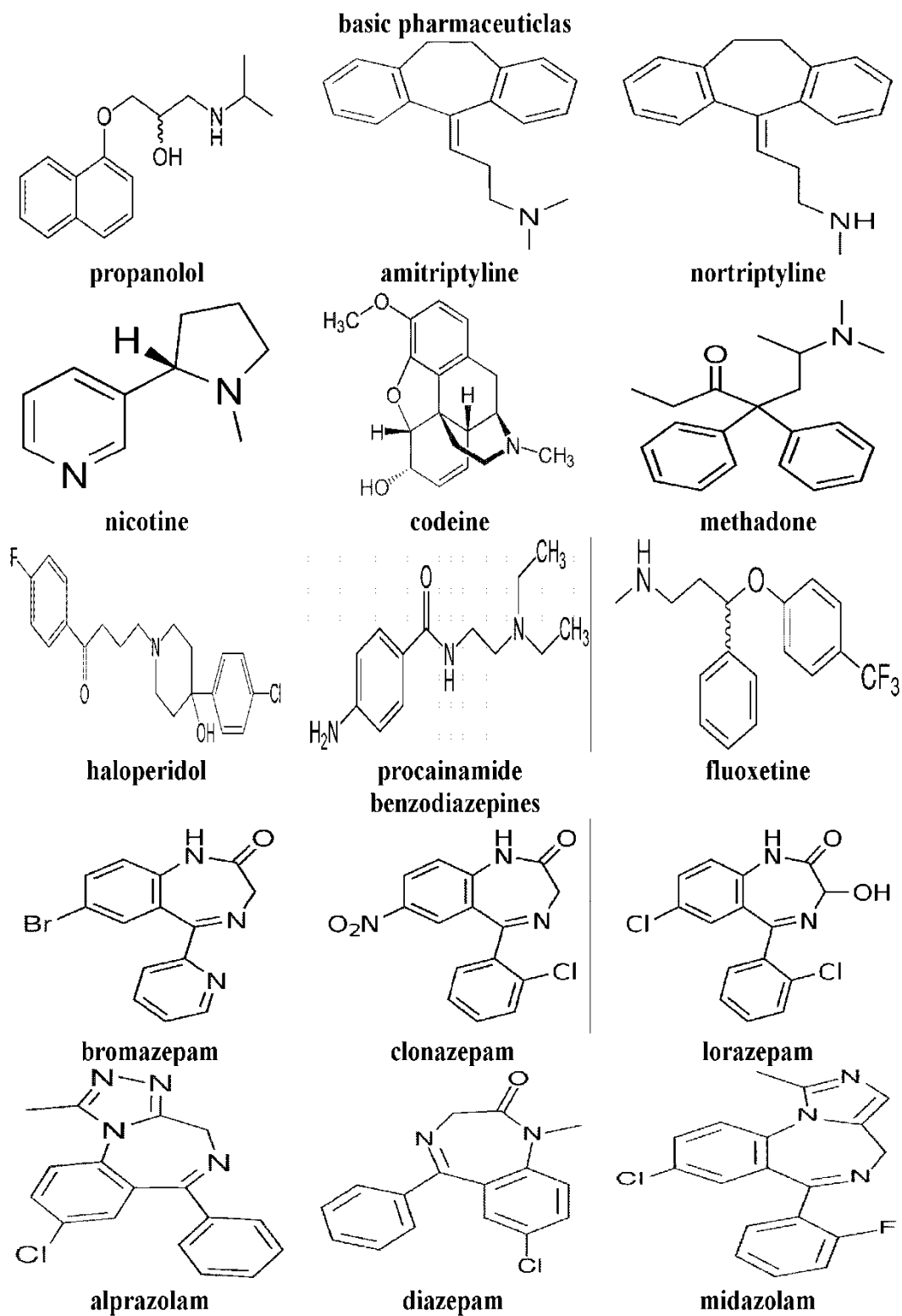
### *Chemicals and reagents*

The silica used was Kromasil, lot n<sup>o</sup>. AT 1959, from Akzo Nobel (Bohus, Sweden), with 5  $\mu\text{m}$  particle size, 11.1 nm pore size and 313  $\text{m}^2/\text{g}$  specific surface area.

The mobile phases were prepared with ultra pure water from a Millipore Direct-Q<sup>TM</sup>, Billerica, USA, and HPLC grade methanol and ethanol were from Tedia, Fairfield, USA. Isopropanol was also from Tedia and tetrahydrofuran was from J. T. Baker, Philipsburg, USA. Pentane was purchased from Merck, Darmstadt, Germany. Poly(methyloctylsiloxane) (PMOS), number-average molar mass,  $M_n$ , 6200 and weight-average molar mass,  $M_w$ , 16 000, was from United Chemicals Technologies, Bristol, PA, USA. The potassium salts,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (98%) and  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  (99%) were purchased from Synth, Diadema, Brazil. Phosphoric acid (85%) was from Nuclear, São Paulo, Brazil, and potassium hydroxide (85%) was from Merck.

The solutes used for the chromatographic tests were: uracil (98%) and butylbenzene (>99%), from Aldrich, Milwaukee, USA, benzylamine (>99%), pentylbenzene (>98%) o-terphenyl (> 99%) from Merck-Schuchardt, caffeine from Medley, Campinas, Brazil, and phenol (>99.5%) and triphenylene (>98%) from Fluka.

The basic pharmaceuticals used for the chromatographic tests were: amitriptyline hydrochloride (99%), nortriptyline hydrochloride (98%), (-)-nicotine (98-100%), all from Sigma, St. Louis, USA, methadone, codeine and propranolol, which were kindly donated by Dr. Marcelo Ribani of TECPAR, Curitiba, Brazil and several benzodiazepines, fluoxetine and haloperidol, which were kindly donated by Dr. Paulo César Pires Rosa of Eurofarma, Campinas, Brazil. The structures of these basic pharmaceuticals and the benzodiazepines are shown in Figure 3.1



**Figure 3.1:** Structures of the basic solutes and other solutes used in this study.



### ***Preparation of the stationary phases***

The stationary phases were prepared using different amounts of PMOS (g PMOS/ g silica), and different times (hours) and temperatures (°C) of thermal treatment, as summarized in Table 3.1. The general procedure for preparation of the stationary phases consists in dissolving PMOS in 20 mL of pentane, then adding 1 g of Kromasil silica and 20 mL more of pentane. This mixture was stirred for 30 minutes at room temperature and then placed in a fume hood for evaporation of the solvent at room temperature overnight. The dried material was then placed in an oven at the specified temperature for immobilization under an air atmosphere.

**Table 3.1:** Parameters for preparation of the stationary phases, initial percentage of PMOS per gram of silica (%PMOS) time (t) and temperature (T) of immobilization, %C and final %PMOS from elemental analysis.

<b>Code</b>	<b>%PMOS<sup>a</sup></b>	<b>t (hours)</b>	<b>T (°C)</b>	<b>%C</b>	<b>%PMOS<sup>b</sup></b>
<b>SP1</b>	30	4	100	4.3	6.9
<b>SP2</b>	60	4	100	8.9	14.3
<b>SP3</b>	30	8	100	5.5	8.8
<b>SP4</b>	60	8	100	15.0	24.2
<b>SP5</b>	30	4	130	6.6	10.6
<b>SP6</b>	60	4	130	11.2	18.1
<b>SP7</b>	30	8	130	7.1	11.4
<b>SP8</b>	60	8	130	18.4	29.7
<b>SP10</b>	70	6	115	8.9	14.3
<b>SP11</b>	45	2	115	10.3	16.6
<b>SP12</b>	45	9	115	14.4	23.2
<b>SP13</b>	45	6	90	5.7	9.1
<b>SP14</b>	45	6	140	12.3	19.9
<b>SP15</b>	45	6	115	8.4	13.6
<b>SP16</b>	45	6	115	8.8	14.2
<b>SP17</b>	45	6	115	7.6	12.3
<b>SP18</b>	45	6	115	7.2	11.6

<sup>a</sup> amount of PMOS used to prepare the phases.

<sup>b</sup> amount of PMOS immobilized onto the silica surface, determined after the packing procedure.

The stationary phases were slurry packed (0.8 g of stationary phase in 20 mL of 20:80 v/v, isopropanol:tetrahydrofuran) seven days after the immobilization procedure into previously polished 50 x 4 mm columns [26] made from 316 stainless steel tubing at a constant packing pressure of 40 MPa, using a Haskel Packing Pump (Burbank, USA) with methanol as propulsion solvent. All columns were conditioned for at least 2 hours with mobile phase at 0.5 mL/min before chromatographic evaluations. SP15 and SP16 were packed four months after the immobilization procedure.

Percent carbon was determined by elemental analysis on a Model CHN-2400 PerkinElmer Analyzer (Shelton, CT, USA). The masses of PMOS per gram of silica (specific mass of PMOS) were calculated using  $\%PMOS = (\%C / 0.62)$  since 62% of the PMOS refers to carbon.

### ***Mobile phase preparation***

All mobile phases were prepared volumetrically. The pH were measured in the aqueous phase with a calibrated pHmeter, Qualxtron model 8010, before the addition of organic modifier. pH adjustments were made with potassium hydroxide or hydrochloric acid solutions.

### ***Liquid chromatography***

All the chromatographic evaluations and the antidepressant separations were performed using a modular HPLC system with a Shimadzu LC 10AD pump (Kyoto, Japan), a Rheodyne model 8125i injection valve (Cotati, USA) with 5  $\mu$ L loop, a Shimadzu CTO-10AC column oven and a Shimadzu Model SPD-10 AV UV–VIS detector. Data were processed using ChromPerfect software (Justice Innovations, Mountain View, USA).

The benzodiazepine separations with ethanol were performed using a modular HPLC system from Shimadzu LC having a 10AT VP pump, SIL-10AF auto

injector, a CTO-10AS VP column oven, a SPD-M10A VP diode array detector and a SCL-10A VP system controller. The solvents were degassed with a DGU-2A degasser using helium at 50 kPa. The amounts of each solvent were determined by a FCV-10AL VP programmer. Data were processed using Class VP software.

### ***Tanaka test procedure***

The Tanaka test [5] is a well defined and established protocol for stationary phase characterization adopted by Euerby and co-workers [16-21] for chromatographic evaluation and comparison of 161 commercially available reversed-phases.

The test procedures, described below, were performed as in the literature [16-21] except for flow rate that was reduced to 0.5 mL/min for the 50 x 4.0 mm columns. The temperature was set at 40 °C in the oven without pre-heating of the mobile phase, the test solutes were detected at 254 nm and the injection volume was 5 µL.

Retention factors ( $k$ ) were calculated using the relation  $k = (t_R - t_M)/t_M$ , where  $t_R$  is the retention time for the solute and  $t_M$  is the retention time of the unretained component, uracil. Peak asymmetry was calculated using the relation  $As = rw_{10\%}/lw_{10\%}$ , where  $rw_{10\%}$  and  $lw_{10\%}$  are the right width and the left width, respectively, measured horizontally from the right or left edge of the peak to a vertical line from the peak apex, at the 10% level. Efficiency was calculated using  $N = 5.54(t_R/w_h)^2$ , where  $w_h$  is the peak width at 50% of the peak height.

The six parameters, reflecting different chromatographic conditions, were:

**Retention factor for pentylbenzene,  $k_{PeB}$ :** Reflects the surface coverage or ligand density. Mobile phase: methanol:water, 80:20, v/v.

**Hydrophobicity or hydrophobic selectivity,  $CH_2$ :** Retention factor ratio between pentylbenzene and butylbenzene. This is a measure of the surface coverage of the phase as the selectivity between the alkylbenzenes differentiated by one

methylene group depends on the ligand density. Mobile phase: methanol:water, 80:20, v/v.

**Shape selectivity, T/O:** The retention factor ratio between triphenylene and o-terphenyl, this descriptor is a measure of the shape selectivity, which is influenced by the spacing of the ligands. Mobile phase: methanol:water, 80:20, v/v.

**Hydrogen bonding capacity, C/P:** The retention factor ratio between caffeine and phenol, this descriptor is a measure of the number of available silanol groups and the degree of endcapping. Mobile phase: methanol:water, 30:70, v/v.

**Total ion-exchange capacity, B/P 7.6:** The retention factor ratio between benzylamine and phenol at pH 7.6, this is an estimate of the total silanol activity. Mobile phase: methanol:20 mmol/L phosphate buffer at pH 7.6, 30:70, v/v.

**Total ion-exchange capacity, B/P 2.7:** The retention factor ratio between benzylamine and phenol at pH 2.7, this is an estimate of the acid activity of the silanol groups. Mobile phase: methanol:20 mmol/L phosphate buffer at pH 2.7, 30:70, v/v.

### ***Hierarchical cluster analysis (HCA) and statistics***

HCA were performed using Pirouette Version 3.11 from Infometrix, Inc. Woodinville, WA, USA. The data afforded by Euerby and co-workers [16-21] were included with the data presented in Table 3.2 for the PMOS phases. In order to give all variables the same importance, they were “auto scaled”, i.e., the average was subtracted from each variable and each variable was divided by its standard deviation. For HCA, Euclidian distance and centroid linkages were used.

The correlations between the data presented in this work were calculated with STATISTICA 6.0 from STatSoft, Tulsa, USA.

## Results and discussion

### *Evaluation of PMOS phases with the Tanaka test.*

As shown in Table 3.1 the use of a larger amount of PMOS, longer times and/or higher temperatures of immobilization lead to larger amounts of PMOS being immobilized onto the silica. This increase in carbon content is directly proportional to the increase in the retention factor of pentylbenzene (Table 3.2), indicating an increase in hydrophobicity. Tanaka and co-workers [5] observed that an increase in the surface coverage of acid treated Develosil silica with chemically bonded C18 chains resulted in smaller C/P, B/P 7.6 and B/P 2.7 values, but for PMOS phases the increase in carbon content did not result in a reduction of those values or in a better peak shape for benzylamine, as observed in Table 3.2.

**Table 3.2:** Results of the Tanaka test, efficiency (N/m) of pentylbenzene and asymmetry factor (AsB) for benzylamine at pH 2.7 and 7.6, for the PMOS phases.

<i>name</i>	$k_{PeB}$	$CH_2$	$T/O$	$C/P$	$B/P\ 7.6$	$B/P\ 2.7$	$(N/m) \times 10^3$	$AsB\ 2.7$	$AsB\ 7.6$
<b>Platinum C<sub>18</sub> EPS [45]</b>	0.97	1.31	1.98	2.62	10.11	0.26	58		
<b>SP1</b>	0.6	1.4	1.0	1.9	11.1	0.2	27	1.6	3.9
<b>SP2</b>	1.4	1.4	1.0	1.6	6.7	0.1	52	1.7	5.7
<b>SP3</b>	1.4	1.3	1.0	2.2	11.9	0.2	18	1.8	3.8
<b>SP4</b>	3.4	1.4	1.0	1.6	9.8	0.1	59	1.9	4.0
<b>SP5</b>	1.3	1.3	1.0	2.0	9.2	0.2	38	2.4	5.9
<b>SP6</b>	2.5	1.4	1.0	1.7	7.0	0.1	61	2.0	8.0
<b>SP7</b>	1.0	1.4	1.3	1.3	16.9	0.2	27	1.3	2.8
<b>SP8</b>	6.2	1.4	1.1	1.2	9.3	0.0	74	2.8	5.4
<b>SP10</b>	2.4	1.4	1.0	1.5	6.0	0.1	54	2.5	5.2
<b>SP11</b>	2.4	1.4	1.0	1.1	6.4	0.2	36	2.3	4.3
<b>SP12</b>	3.9	1.4	1.0	1.1	8.3	0.1	30	1.5	1.7
<b>SP13</b>	0.7	1.4	1.0	1.8	11.5	-0.1	26	2.1	2.5
<b>SP14</b>	3.1	1.4	1.2	0.7	14.4	0.1	52	3.0	3.4
<b>SP15</b>	1.7	1.3	1.0	1.7	8.7	0.2	41	2.7	3.5
<b>SP16</b>	1.7	1.3	1.0	1.7	9.4	0.2	36	2.1	3.7
<b>SP17</b>	1.3	1.3	1.0	1.7	7.7	0.2	24	2.6	3.5
<b>SP18</b>	1.3	1.3	1.0	1.7	8.0	0.2	28	2.5	3.5

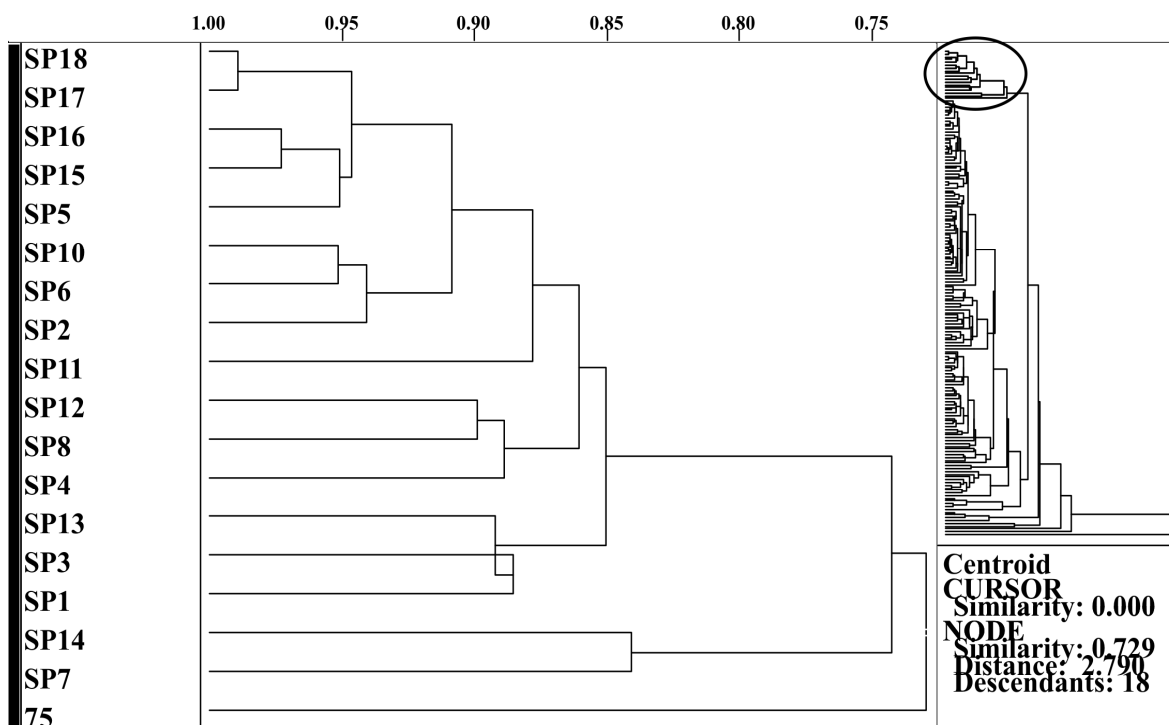
The PMOS phases do not show significant shape selectivity. Only the phases SP7, SP8 and SP14, prepared at higher temperature for a longer time

showed shape selectivity. This property was not related to more PMOS being immobilized, since SP7 presents the best shape selectivity of the PMOS phases. A small correlation was observed between more PMOS immobilized and higher efficiency for pentylbenzene. The most retentive phase, SP8, presented the highest efficiency for pentylbenzene.

Four PMOS phases were prepared using the same conditions, SP15 to SP18, the first two, SP15 and SP16, were only packed four months after the thermal immobilization and were more retentive than the phases SP17 and SP18, packed seven days after immobilization, showing that PMOS continued to auto-immobilize onto the silica surface during the storage period. The pairs SP15-SP16 and SP17-SP18 presented reproducible  $k_{PeB}$ ,  $CH_2$ , T/O, C/P and B/P 2.7, although B/P 7.6 were less satisfactorily reproduced.

### ***Classifications using HCA***

The PMOS phases were submitted to HCA together with the literature data presented by Euerby and co-workers [16-21], after excluding the nonsilica supports. The HCA analysis presented in Figure 3.2 shows that the new stationary phases (SP1 to SP18) have different properties from the commercial phases. Only the Platinum C<sub>18</sub> EPS phase was related to the PMOS phases. The literature data for commercial phases, excluding the non silica supports, shows smaller values for C/P, B/P 7.6 and B/P 2.7 with medians of 0.51, 0.52 and 0.11, respectively, while Platinum C<sub>18</sub> EPS presents the highest B/P 7.6 and the third largest C/P value of the commercial phases. The PMOS phases presented C/P and B/P 7.6 values larger than the commercial phases and B/P 2.7 values smaller than the median observed for the commercial phases, showing significant ion exchange properties at pH 7.6 and lower ion exchange at pH 2.7, again similar to Platinum C<sub>18</sub> EPS.



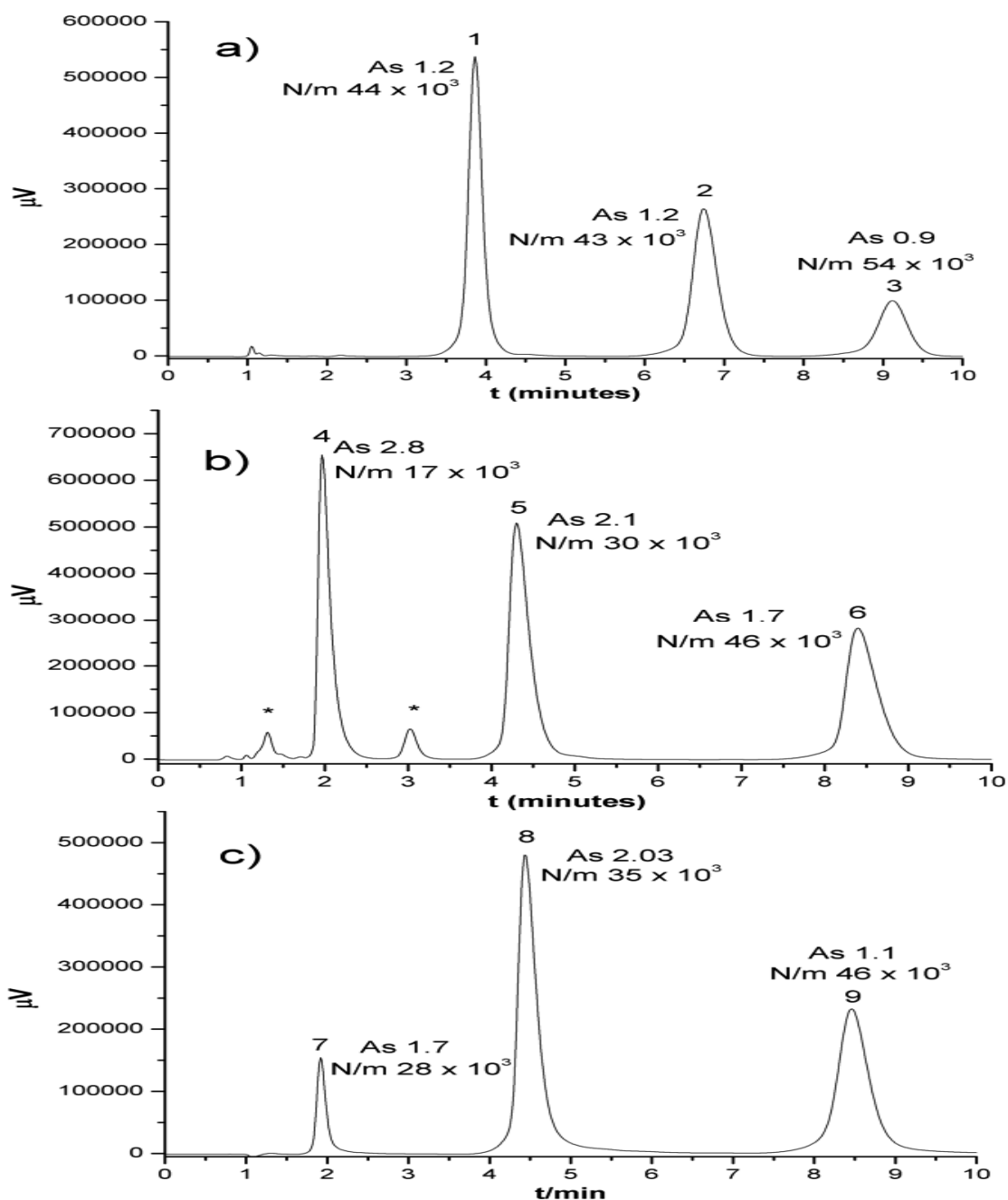
**Figure 3.2:** HCA of the new PMOS phases. Left: HCA of the new PMOS phases. Right : Complete HCA of the commercial phases [16-21] and the PMOS phases. The circle indicates the location of the PMOS phases.

The PMOS phases prepared with the same conditions were classified together in Figure 3.2 showing the good reproducibility of the preparation procedure.

### ***The applicability of the stationary phase based on PMOS thermally immobilized on silica***

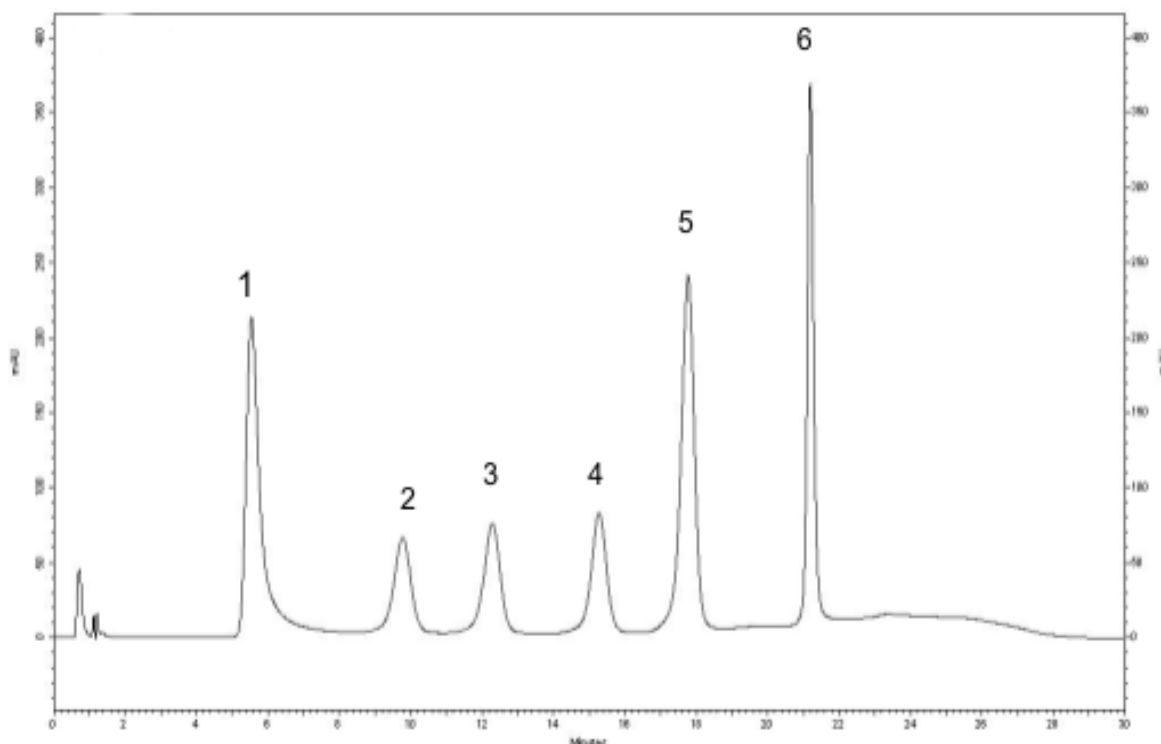
To illustrate the applicability of PMOS phases to real separations Figure 3.3 shows the separation of several basic pharmaceuticals with good peak shape and high efficiencies using SP4, one of the stationary phases with higher PMOS quantities. Figure 3.4 shows the separation of benzodiazepines on the same stationary phases, using ethanol as organic modifier. Benzodiazepine separations are problematic with some stationary phases [27 ] but, SP4 separated them with symmetrical peaks and good resolution using a non-buffered “green” mobile phase,

since the use of ethanol as organic modifier afforded a good separation without the generation of hazardous waste [24,26].



**Figure 3.3:** Chromatograms for the separation of some basic pharmaceutical on the SP4 stationary phase. Mobile phase: methanol-phosphate buffer (pH 7; 0.02 mol/L), (80:20, v/v). Flow rate: 0.5 mL/min. Detection: UV at 220 nm. Injection volume: 5  $\mu\text{L}$ . Temperature: 23  $^{\circ}\text{C}$ . Solutes: (a) 1=propranolol; 2=amitriptyline; 3=nortriptyline (b) 4=nicotine; 5=codeine; 6=methadone, (c) 7=haloperidol; 8=procainamide; 9=fluoxetine.





**Figure 3.4:** Chromatogram for a green separation of some benzodiazepines on the SP4 stationary phase. Mobile phase: A; ethanol-water (95:5, v/v), B; water, Step gradient: 25% A for 5 min, 30% A for 5 min, 35% A for 5 min, 60% A for 5 min, return to 25% A in 10 min. Flow rate: 0.5 mL/min. Detection: UV at 238 nm. Injection volume: 10  $\mu$ L. Temperature: 36  $^{\circ}$ C. Solutes: 1=bromazepam; 2=clonazepam; 3=lorazepam; 4=alprazolam; 5=diazepam; 6=midazolam.

## Conclusions

An increase in the amount of PMOS and in the time and temperature of immobilization results in larger amounts of PMOS being immobilized onto the silica surface. However, this does not result in lower values of C/P, B/P 2.7 and B/P 7.6 or better peak shapes for benzylamine at pH 2.7 and 7.6. Different chromatographic properties are obtained by varying the preparation conditions. HCA indicates that the PMOS phases are similar to Platinum C18 EPS but have properties significantly different from most commercial phases, although the PMOS phases were shown to be useful for basic pharmaceutical analysis, including some benzodiazepines.

## References

1. H.A. Claessens, M.A. van Straten, C.A. Cramers, M. Jezizrska, B. Buszewski, Comparative study of test methods for reversed-phase columns for high-performance liquid chromatography, *J. Chromatogr. A* 826 (1998) 135-156
2. R.J.M. Vervoort, A.J.J. Debets, H.A. Claessens, C.A. Cramers, G.J. de Jong, Optimisation and characterisation of silica-based reversed-phase liquid chromatographic systems for the analysis of basic pharmaceuticals, *J. Chromatogr. A* 897 (2000) 1-22.
3. C. Stella, S. Rudaz, J.L. Veuthey, A. Tchaplá, Silica and other materials as supports in liquid chromatography. Chromatographic tests and their importance for evaluating these supports. Part I, *Chromatographia* 53, Supplement 1 (2001) S113-S131.
4. H.A. Claessens, Review on the chemistry and thermal stability of stationary phases for reversed-phase liquid chromatography, *Trends Anal. Chem.* 20 (2001) 563-583.
5. K. Kimata, K. Iwaguchi, S. Onishi, K. Jinno, R. Eksteen, K. Hosoya, M. Arki, N. Tanaka, Chromatographic characterization of silica C18 packing materials. Correlation between a preparation method and retention of stationary phase, *J. Chromatogr. Sci.* 27 (1989) 721-728.
6. H. Engelhardt, M. Jungheim, Comparison and characterization of reversed phases, *Chromatographia* 29 (1990) 59-68.
7. H. Engelhardt, M. Arangio, T. Lobert, A chromatographic test procedure for reversed-phase HPLC column evaluation, *LC–GC Int.* 10 (1997) 803-812
8. S.J. Schmitz, H. Zwanziger, H. Engelhardt, Characterization of reversed phases by chemometric methods, *J. Chromatogr.* 544 (1991) 381-391.
9. U.D. Neue, B.A. Alden, T.H. Walter, Universal procedure for the assessment of the reproducibility and the classification of silica-based reversed-phase packings: II. Classification of reversed-phase packings, *J. Chromatogr. A* 849 (1999) 101-116.
10. D.V. McCalley, R.G. Brereton, Evaluation procedures for reversed-phase high-performance liquid chromatographic columns in the analysis of strongly basic compounds using principal components analysis for data assessment, *J. Chromatogr. A* 828 (1998) 407-420.
11. L. Sander, S.A. Wise, A new standard reference material for column evaluation in reversed-phase liquid chromatography, *J. Sep. Sci.* 26 (2003) 283-294.
12. National Institute of Standards and Technology, SRM 870, Column Performance Test Mixture, Gaithersburg, MD, 2002.
13. E. Lesellier, C. West, Description and comparison of chromatographic tests and chemometric methods for packed column classification, *J. Chromatogr. A* 1158 (2007) 329–360.
14. D. Visky, Y.V. Heyden, T. Ivany, P. Baten, J. De Beer, Z. Kovacs, B. Noszal, E. Roets, D. L. Massart, J. Hoogmartens. Characterisation of

- reversed-phase liquid chromatographic columns by chromatographic tests. Evaluation of 36 test parameters: repeatability, reproducibility and correlation, *J. Chromatogr. A* 977 (2002) 39–58.
15. S.D. Rogers. Doctoral thesis, The Florida State University, Tallahassee, 2003. [http://etd.lib.fsu.edu/theses/available/etd-08192004-103718/unrestricted/Rogers\\_S.pdf](http://etd.lib.fsu.edu/theses/available/etd-08192004-103718/unrestricted/Rogers_S.pdf)
  16. E. Cruz, M.R. Euerby, C.M. Johnson, C.A. Hackett, Chromatographic classification of commercially available reversed-phase HPLC columns *Chromatographia* 44 (1997) 151-161.
  17. M.R. Euerby, P. Petersson, A classification of commercially available RPLC columns: a tool for rational selection to find out how to choose the most appropriate RPLC column for your applications, *LC-GC Eur.* 13 (2000) 665-677.
  18. M.R. Euerby, A.P. McKeown, P. Petersson, Chromatographic classification and comparison of commercially available perfluorinated stationary phases for reversed-phase liquid chromatography using principal component analysis *J. Sep. Sci.* 26 (2003) 295-306
  19. M.R. Euerby, P. Petersson, Chromatographic classification and comparison of commercially available reversed-phase liquid chromatographic columns using principal component analysis *J. Chromatogr. A* 994 (2003) 13-36.
  20. M.R. Euerby, P. Petersson, Chromatographic classification and comparison of commercially available reversed-phase liquid chromatographic columns containing polar embedded groups/amino endcappings using principal component analysis, *J. Chromatogr. A* 1088 (2005) 1–15
  21. M.R. Euerby, P. Petersson, W. Campbell, W. Roe, Chromatographic classification and comparison of commercially available reversed-phase liquid chromatographic columns containing phenyl moieties using principal component analysis *J. Chromatogr. A* 1154 (2007) 138-151.
  22. Pirouette 3.11 User Guide.
  23. I.C.S.F. Jardim, K.E. Collins, C.H. Collins, Immobilized polysiloxanes as stationary phases for high-performance liquid chromatography and solid phase extraction, *Microchem J.* 77 (2004) 191–198.
  24. C.J. Welch, T. Brkovic, W. Schafer, X. Gong, Performance to burn? Re-evaluating the choice of acetonitrile as the platform solvent for analytical HPLC, *Green Chem.*, 11 (2009) 1232–1238.
  25. R.L.V. Ribeiro, C.G.G. Botolli, K.E. Collins, C.H. Collins, Reevaluation of ethanol as organic modifier for use in HPLC-RP mobile phases, *J. Braz. Chem. Soc.*, 15 (2004) 300-306.
  26. K.E. Collins, A.C. Franchon, I.C.S.F. Jardim, E. Radanovic, M.C. Gonçalves, The effects of inner surface roughness of microbore column blanks on column performance, *LC-GC* 18 (2000) 106-117
  27. R.B. Silva, C.R. Silva, C. Airoidi, C.H. Collins, I. C.S.F. Jardim, Preparation and characterization of a new HPLC C18 reversed phase containing thiocarbamate groups, *Microchem. J.* 82 (2006) 150–158

## **Capítulo 4: Chromatographic evaluation using basic solutes of the silanol activity of stationary phases based on poly(methyloctylsiloxane) immobilized onto silica.**

**Keywords:** basic solutes, immobilized polysiloxane, ion-exchange, RPLC, stationary phases

### **Abstract**

The chromatographic behaviors of some basic solutes were evaluated on stationary phases based on poly(methyloctylsiloxane) immobilized onto silica (PMOS-SiO<sub>2</sub>). The test solutes present both hydrophobic and hydrophilic properties. Evaluations of the pH effect used 80:20 (v/v) methanol:buffered mobile phase over the pH range 5 to 11.5 with inorganic buffers such as borate, carbonate and phosphate and with organic buffers like citrate, tricine and triethylamine. Evaluations in acid mobile phases used 50:50 (v/v) and 30:70 (v/v) methanol-buffer (pH 2.5; 20 mmol/L) mobile phase. The buffer concentration effect used 65:35 (v/v) methanol-phosphate (pH 7; 20 and 100 mmol/L) mobile phases. The results are compared to those obtained with two chemically bonded stationary phases. The immobilized phases show greater contributions from an ion exchange mechanism than do the commercial phases. The results indicate that the silanol activity of PMOS-SiO<sub>2</sub> stationary phases can be adequately evaluated by using appropriate basic probes and mobile phases having different pH, using different buffers.

## Introduction

Reversed-phase high performance liquid chromatography (RP-HPLC) is the analytical technique of choice for many applications in the life and environmental sciences and in the food, synthetic polymer and pharmaceutical industries. Often, basic solutes interact with some accessible residual silanol groups present on the surface of the support even after it is chemically modified [1-3]. Under certain conditions, negatively charged silanol groups can strongly interact with positively charged basic solutes. The detailed mechanisms of silanol interactions are far from clear, but ion-exchange is recognized as a major contribution to these silanol interactions [4].

One way to reduce secondary interactions is to reduce the number of free silanols on the surface by an end-capping reaction [5] or by impeding access to the free silanols on the silica surface [6]. Recent innovations are the preparation of hybrid silicas [2-9] which present lower amounts of free silanols due to the substitution of silanols by ethylene bridge or methyl groups, or the reduction of silanols to silicon hydride [5]. Another way to avoid these undesirable interactions is to increase the pH of the mobile phase to values higher than the  $pK_a$  of the basic solutes, so that the solutes and the residual silanols are both unprotonated and ion-exchange interactions do not occur [10]. However, in highly alkaline mobile phases the silica support starts to dissolve [11], especially if inorganic buffers are used, because mixtures of inorganic buffers with organic modifiers have higher apparent pH than mixtures with organic buffers and the final pH of solutions of aqueous buffers and organic modifiers such as methanol and acetonitrile are functions of the percent of organic modifier, the buffer type and concentration and the column temperature [12]. All these factors strongly influence basic solute selectivity in RP-HPLC [1,2]. A further manner to avoid secondary interactions is to use acidic mobile phases where both the solutes and the silanols on the silica support are protonated. Such separations are usually reproducible when the mobile phase pH is maintained at  $pH < 3$  but there are some undesirable aspects as well: Often selectivity is

prejudiced in low pH mobile phases due the suppression of ion-exchange interactions that, in fact, can help the separation. Retention factors of the solutes in their protonated form are often lower than when the solute is neutral. Also bonded-phase columns are unstable at low pH [13,14]. However analyses conducted with acidic mobile phases have become popular using anionic additives such as  $\text{ClO}_4^-$  and  $\text{CF}_3\text{COO}^-$  to increase the retention and the selectivity of cationic solutes in RP-HPLC [15].

The literature reports that chemically bonded phases with ligand densities below  $0.5 \mu\text{mol}/\text{m}^2$  give better peak shape for tricyclic antidepressants than do stationary phases with higher ligand densities because peak shape relates to the contribution of a dual retention mechanism involving both the free silanols and the hydrophobic chains. A low ligand density results in more interactions with free silanols and better peak shapes, contradicting the idea that a better coverage of free silanols and reduction of the ion exchange mechanism should result in better peak shape [6]. Thus, poor peak shape are often attributed to ion-exchange interactions of free silanols with basic solutes. However, Fornstedt et al. outlined that poor peak shape may not be due ion-exchange interactions but to the existence of competitive retention mechanisms. [17]. These authors propose that the origin of peak asymmetry at low solute concentrations is due to the existence of two different types of adsorption sites having different equilibrium isotherms and different rates of mass transfer kinetics. Even if the experimental conditions are such that both mechanisms operate linearly, tailing can be observed if the mass transfer kinetics is much slower on one type of site than on the other. The most pronounced peak tailings occur when the slower type of adsorption sites give a smaller contribution to the retention than the faster type. More recently, Neue et al. [18] proposed a model to explain the retention of basic solutes based on three different retention sites: a purely ion-exchange site, a purely reversed-phase site and a hydrophobically assisted ion-exchange site and showed that the hydrophobically assisted ion-exchange sites dominate over purely reversed-phase or purely ion-exchange retention mechanisms under certain conditions.

The pH of the mobile phase also affects parameters such as efficiency, asymmetry factor and selectivity and more than one solute and mobile phase pH must be evaluated [1-3,18]. Other studies indicate that the use of buffered eluents appears to be essential to probe silanol interactions when strongly basic solutes are used, due to variable ionization effects [19]. Only major differences between stationary phases can be quantified with unbuffered eluents using simple solutes, such as aniline and pyridine, although these are commonly used as probe solutes [20]. Real solutes, such as most pharmaceuticals and some pesticides, have much more complex structures and are more challenging test probes.

The contribution of ion-exchange interactions can also be evaluated through the influence of buffer concentration on the retention of basic solutes [1,2, 21]. Phases with little ion-exchange behavior show smaller variations in the retention factors of basic solutes as the buffer concentration increases while phases with higher ion exchange interactions present larger variations in retention with buffer concentration.

Previous work by our research group [22-25] has evaluated the physical, chemical and chromatographic behavior of PMOS-SiO<sub>2</sub> stationary phases using several test mixtures, including the Tanaka test [26] which permits comparison to PMOS-SiO<sub>2</sub> stationary phases with literature data [46] for a large number of commercial stationary phases, showing that PMOS-SiO<sub>2</sub> stationary phases possess high ion exchange properties at pH 7.6, high hydrogen bonding capacities and low ion exchange properties at pH 2.7 [28]. The present paper evaluates the influence that these different ion exchange properties have on retention factors, asymmetry factors and selectivity of several basic solutes. The silanol activities of these PMOS-SiO<sub>2</sub> stationary phases were evaluated using several mobile phase pH, using different buffer types, buffer concentrations and several complex hydrophobic and hydrophilic solutes as probes.

## Experimental

### *Chemicals and reagents*

The mobile phases were prepared with ultrapure water from a Millipore Direct-Q™ system (Billerica, USA) and HPLC grade methanol from Tedia (Rio de Janeiro, Brazil). Isopropanol was also from Tedia and tetrahydrofuran was from J.T Baker (Phillipsburg, USA). Pentane was purchased from Merck (Darmstadt, Germany).

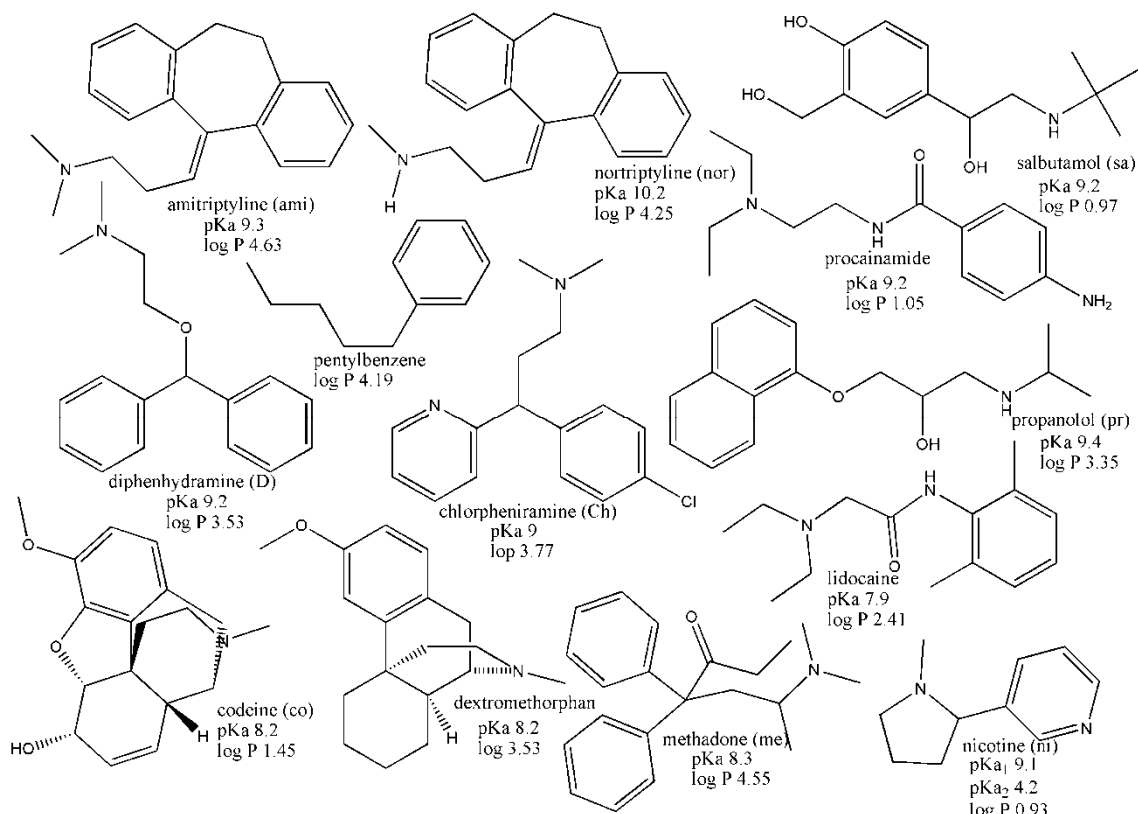
The acid and buffers used to prepare mobile phases were:  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (98%),  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  (99%) and  $\text{KHCO}_3$  (99.7-100.5%) from Synth (Diadema, Brazil), sodium citrate tribasic dihydrate (99%) and N-(2-hydroxy-1,1-bis(hydroxymethyl)ethyl)glycine (99%) (tricine) from Sigma, (St. Louis, USA), sodium borate from Fisher (Fairlawn, USA), triethylamine (99%) (TEA) and trifluoroacetic acid (99.5%) (TFA) from Vetec (Duque de Caxias, Brazil), perchloric acid (69.0-72%) from Nuclear (Diadema, Brazil). 2-Amino-2-hydroxymethylpropane-1,3-diol (Tris) from Mallinckrodt (Paris, France).

The silica used to prepare the stationary phases was Kromasil, lot n° AT 1959, from Akzo Nobel (Bohus, Sweden), with 5  $\mu\text{m}$  particle size, 11.1 nm pore size and 313  $\text{m}^2/\text{g}$  specific surface area. The polysiloxane used was poly(methyloctylsiloxane), number-average molar mass,  $M_n$ , 6200 and weight-average molar mass,  $M_w$ , 16 000, obtained from United Chemicals Technologies (Bristol, USA).

The solutes used for the chromatographic tests were: uracil (98%) from Aldrich (Milwaukee, USA) and pentylbenzene (PeB) (98%) from Merck Schuchardt (Hohenbrunn, Germany). The basic test solutes were amitriptyline hydrochloride (ami), (99%), ( $\pm$ )-chlorpheniramine maleate salt (Ch), dextromethorphan hydrobromide, (-)-nicotine (ni) (98-100%), nortriptyline hydrochloride (nor) (98%), procainamide hydrochloride, all from Sigma (St Louis, USA), lidocaine from Proderma (Piracicaba, Brazil) and codeine phosphate (co), diphenhydramine



hydrochloride (D), methadone (me), propranolol (pr) and salbutamol sulfate (sa), which were kindly donated by TECPAR, Curitiba, Brazil. The structures of the test solutes and their pKa and log P values are shown Figure 4.1.



**Figure 4.1:** The basic test compounds with their pKa and log P values.

### ***Preparation of the stationary phases***

The stationary phases were prepared using different amounts of PMOS (g PMOS/ g silica) and different times and temperatures of thermal treatment to produce stationary phases with different carbon contents. The general procedure for preparation of the stationary phases consists in dissolving the appropriate amount of PMOS in 20 mL of pentane, then adding 1 g of Kromasil silica and 20 mL more of pentane. This mixture is stirred for 30 minutes at room temperature and then placed in a fume hood for evaporation of the solvent at room temperature overnight. The dried material is then placed in an oven at the specified temperature for immobilization under an air atmosphere as described elsewhere [28]

The stationary phases were slurry packed (0.8 g of stationary phase in 20 mL isopropanol-tetrahydrofuran (20:80, v/v)) into previously polished 50 x 3.9 mm columns [29], made from 316 stainless steel tubing at a constant packing pressure of 40 MPa, using a Haskel Packing Pump (Burbank, USA) with methanol as propulsion solvent. The pressure was maintained until the passage of 200 mL of methanol to assure a good packing and the removal of excess PMOS [51] and the not immobilized PMOS was removed during the packing procedure. All columns were conditioned for at least 2 hours with mobile phase at 0.5 mL/min before the chromatographic evaluations.

### ***Commercial stationary phases***

The commercial stationary phases used for comparison were Nova-Pak C<sub>8</sub> (Nova) (Serial number W133061 056), 14 %C, and Symmetry C<sub>8</sub> (Sym) (Serial number W21211W 012), 11.7 %C, both in 150 x 3.9 mm columns, both from Waters (Dublin, Ireland)

### ***Mobile phase preparation***

All mobile phases were prepared volumetrically. The pH were measured in the aqueous phase with a calibrated pHmeter, Qualxtron model 8010 (Jundiaí, Brazil), before the addition of organic modifier. pH adjustments were made with potassium hydroxide or hydrochloric acid solutions.

### ***Physical characterization of the stationary phases.***

#### *Percent carbon.*

Elemental analyses were carried out on the material recovered after the column packing and dried for a week at ambient temperature with a Model CHN-2400 PerkinElmer Analyzer (Shelton, USA). The percent in mass of PMOS per gram of Kromasil silica (%PMOS) was calculated using the formula: %PMOS = %C/(0.62), since 62% of the PMOS refers to carbon.

#### *Solid-state <sup>29</sup>Si CP-MAS NMR spectroscopy*

Solid-state <sup>29</sup>Si NMR measurements were performed on an INOVA spectrometer (Varian, Palo Alto, USA) using cross polarization and magic angle spinning (CP-MAS). The contact time and pulse interval time were 5 ms and 1.5 s, respectively. A frequency of 59.6 MHz was used. Representative samples of 200–300 mg were spun at 4 kHz using 7 mm double ZrO rotors. Typically, 1.5 k free induction decays (FIDs) with an acquisition time of 35 ms were accumulated in 1 kb data points, zero-filling to 8 kb prior to Fourier transformation. The line broadening used was 30 Hz and the spectral width for all spectra was about 25 kHz.

### ***Chromatographic evaluations***

All the chromatographic evaluations were performed using a modular HPLC system with a Shimadzu LC 10AD pump (Kyoto, Japan), a Rheodyne model 8120i injection valve (Cotati, USA) with 5 µL loop, a Shimadzu CTO-10AC column oven and a Shimadzu Model SPD-10 AV UV–VIS detector. Data were processed using ChromPerfect software (Justice Innovations, Mountain View, USA).

All tests were conducted at a flow rate of 0.5 mL/min at 23 °C. Amitriptyline, nortriptyline, pentylbenzene, propranolol and uracil were detected at 254 nm and

codeine, diphenhydramine, chlorpheniramine, methadone, nicotine and salbutamol were detected at 220 nm. The test solutions of solids were prepared by the dissolution of 20 µg in 100 mL of 30:70 (v/v) methanol:water, 15 µL of nicotine were dissolved in 100 mL of the same solvent.

Retention factors ( $k$ ) were calculated using the relation  $k = (t_R - t_M)/t_M$ , where  $t_R$  is the retention time for the solute and  $t_M$  is the retention time of the unretained component, uracil. Peak asymmetry was calculated using the relation  $As = rw_{10\%}/lw_{10\%}$ , where  $rw_{10\%}$  and  $lw_{10\%}$  are the right width and the left width, respectively, measured horizontally from the right or left edge of the peak to a vertical line from the peak apex, at the 10% level. Efficiency was calculated using  $N = 5.54(t_R/w_h)^2$ , where  $w_h$  is the peak width at 50% of the peak height.

#### *Chromatographic evaluation using a neutral mobile phase.*

Chromatographic evaluations using a neutral mobile phase were carried out using pentylbenzene as neutral marker and amitriptyline and nortriptyline as basic probes in 80:20 (v/v) methanol:phosphate buffer (pH 7; 20 mmol/L) mobile phase.

#### *Chromatographic evaluation using an acidic mobile phase.*

Chromatographic evaluations using an acidic mobile phase were carried out using amitriptyline and nortriptyline as basic probes in 50:50 (v/v) methanol:phosphate buffer (pH 2.5; 20 mmol/L) mobile phase.

#### *Effect of mobile phase pH and buffer type on retentions and asymmetry factors.*

The retention factors and asymmetry factors of the basic solutes were evaluated using 80:20 (v/v) methanol:buffer solutions. For mobile phases buffered at pH 6, 7, 8, 11 were used phosphate buffers, for mobile phases buffered at pH 8 was used tricine buffer, for mobile phases buffered at pH 9 and 10 were used borate buffer, for mobile phases buffered at pH 10.5 were used ammonium buffer and for mobile phases buffered at pH 11.5 were used triethylamine buffer. The buffer solutions were 20 mmol/L, except for the borate buffers that were 5 mmol/L concentrations.

### *Effect of buffer concentration*

The retention factors and asymmetry factors of eight basic solutes were evaluated using 65:35 (v/v) methanol:phosphate buffers at pH 7 using 20 mmol/L and 100 mmol/L concentrations.

### *Software*

All graphs were constructed using OriginPro 7.5 SRO v7.5714(B714), (Northampton, USA). The chemical structures were done and log P values estimated using ChemDraw Ultra 9.0 from CambridgeSoft (Cambridge, England).

## **Results and Discussion.**

### ***Physical characterization of the stationary phases.***

The different %C and %PMOS for the stationary phases prepared by thermal immobilization of PMOS onto silica (PMOS-SiO<sub>2</sub>) are given in Table 4.1. The %PMOS vary from 9% to 47% as a result of the different initial quantities of PMOS used and the different times and temperatures of thermal immobilization.

The <sup>29</sup>Si NMR spectra of the PMOS-SiO<sub>2</sub> stationary phases (data not shown) indicates the existence of D<sup>1</sup><sub>H</sub>, D<sup>2'</sup> and D<sup>2''</sup> groups from PMOS and Q<sup>2</sup>, Q<sup>3</sup> and Q<sup>4</sup> from silica. A D<sup>1</sup><sub>H</sub> signal represents the breaking of some Si–O–Si bonds of the siloxane chain during the thermal immobilization processes, D<sup>2''</sup> indicates that the PMOS chains are loosely attached or physically adsorbed to the silica, while D<sup>2'</sup> represents chemical bonding between the PMOS and the silica surface [31-33]. Q<sup>2</sup> indicates geminal silanols, the Q<sup>3</sup> signals are isolated or vicinal silanols and Q<sup>4</sup>

are tetrasiloxane in the silica backbone [31-33]. Unfortunately, the relative contribution of these Si-OC linkages cannot be quantified.

**Table 4.1:** Carbon content (%C), PMOS content (%PMOS) and chromatographic evaluations using a neutral mobile phase.

<b>SP</b>	<b>%C</b>	<b>%PMOS</b>	<b><math>k_{PeB}</math></b>	<b><math>k_{ami}</math></b>	<b><math>k_{nor}</math></b>	<b><math>As_{ami}</math></b>	<b><math>As_{nor}</math></b>
SP2	8.9	14.4	1.9	5.4	9.9	1.3	1.1
SP3	5.5	8.9	1.1	5.2	10.4	1.4	1.3
SP4	14.2	22.9	4.5	12.4	23.2	1.4	1.2
SP5	6.6	10.6	1.1	4.7	9.2	1.2	1.0
SP6	11.2	18.1	2.4	7.2	12.9	1.2	1.0
SP7	7.1	11.5	1.3	4.9	13.4	1.6	1.1
SP8	17.5	28.2	6.2	23.6	42.8	1.1	1.1
SP9	15.0	24.2	4.6	15.6	23.9	1.1	1.2
SP10	8.5	13.7	1.8	6.9	15.8	1.7	1.4
SP11	10.0	16.1	2.5	7.3	11.6	1.6	1.5
SP12	8.3	13.4	1.7	15.0	23.9	1.1	1.2
SP13	10.3	16.6	2.7	6.2	12.9	1.4	1.2
SP14	18.4	29.7	7.1	18.7	44.5	1.1	1.0
SP15	19.3	31.1	7.1	14.8	27.5	2.0	1.6
SP16	11.9	19.2	3.5	15.2	29.0	0.9	1.0
SP17	29.3	47.3	12.0	25.8	70.3	1.3	1.5
SP18	14.9	24.0	4.6	12.8	26.4	1.3	1.2
Nova	14.0	-	2.5	3.2	2.6	1.6	1.6
Sym	11.7	-	4.2	4.0	2.8	1.2	1.3

### **Chromatographic evaluations**

#### *Chromatographic evaluation using a neutral mobile phase.*

Chromatographic evaluations of columns containing the new stationary phases using a neutral mobile phase are shown in Table 4.1. On all the PMOS-SiO<sub>2</sub> stationary phases nortriptyline, with less hydrophobicity and a higher pKa than amitriptyline, was retained considerably longer than amitriptyline, while both were significantly more retained than pentylbenzene. This is “anti-reversed phase” retention behavior [34]. On both commercial columns amitriptyline eluted after

nortriptyline, as expected for a reversed phase column. On the Symmetry C<sub>8</sub> column amitriptyline and nortriptyline were always less retained than pentylbenzene, while on the Nova-Pak C<sub>8</sub> column these solutes were slightly more retained than pentylbenzene. For the PMOS-SiO<sub>2</sub> stationary phases the asymmetry factors of the amitriptyline and nortriptyline peaks are uncorrelated to the carbon content of the stationary phases, but the retention factors of these test solutes are highly related to the carbon content.

The silanol groups identified Q<sup>2</sup> and Q<sup>3</sup> in the <sup>29</sup>Si NMR spectra are able to ionize as a function of pH with most silanol groups ionized at pH 7. At this pH the basic test solutes are almost totally protonated, resulting in a predominant ion exchange mechanism that makes *nortriptyline* elute after *amitriptyline* and confers high retention and good peak shape for the basic test solutes.

*Chromatographic evaluation using an acidic mobile phase.*

Chromatographic evaluations using an acidic mobile phase are shown in Table 4.2. At this pH a poorer peak shape than at neutral pH is obtained for the basic test solutes using the PMOS-SiO<sub>2</sub> stationary phases, while with the commercial phases the peak shapes are better in the acidic mobile phase than in the neutral mobile phase. With all the stationary phases nortriptyline eluted before amitriptyline at pH 2.5, a fact that points to a predominant hydrophobic retention mechanism on both types of stationary phase at this pH. The increase in carbon content from 6.6 to 15% for the PMOS-SiO<sub>2</sub> stationary phases results in an increase in retention factor of nortriptyline from 9.21 to 27 at pH 7 (Table 4.1), while at pH 2.5 the same increase in carbon content results in smaller increases in the retention factor of nortriptyline.

**Table 4.2:** Chromatographic evaluations using an acidic mobile phase. The chromatographic conditions are in the experimental section.

<i>SP</i>	<i>k<sub>ami</sub></i>	<i>As<sub>ami</sub></i>	<i>k<sub>nor</sub></i>	<i>As<sub>nor</sub></i>
SP2	2.7	2.6	2.1	2.3
SP3	1.8	1.6	1.3	1.7
SP4	4.6	2.7	3.3	2.3
SP5	3.3	2.3	2.5	2.2
SP6	2.2	2.1	1.6	2.1

SP7	2.3	2.6	1.7	1.9
SP18	5.0	2.3	5.0	2.3
Sym	7.1	0.9	7.1	1.0
Nova	7.7	1.2	6.1	1.1

At pH 2.5 the silanol groups of PMOS-SiO<sub>2</sub> are not ionized and ion exchange interactions with the protonated basic test solutes are not seen, resulting in a predominant hydrophobic retention, where *amitriptyline* is always eluted after *nortriptyline* and where both solutes have smaller retentions and present significant asymmetries, as shown in Table 4.2.

*Effect of mobile phase pH and buffer type on retentions and asymmetry factors.*

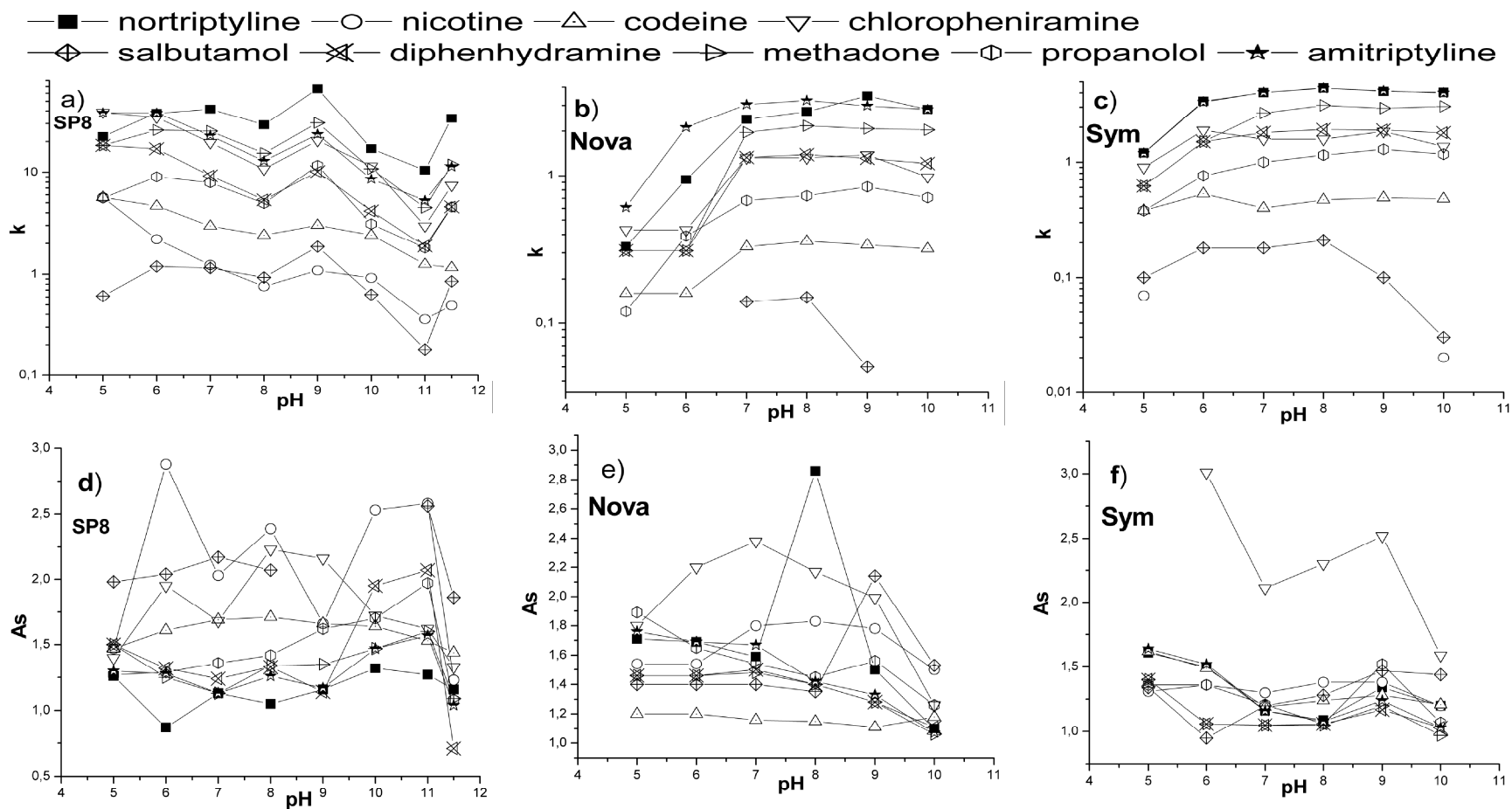
As the pH is changed, all the chromatographic parameters for the basic solutes also change. Normally a mobile phase buffered at a pH value higher than the pKa of the solutes is used with chemically bonded phases [10] to ensure that the solute is unprotonated, avoiding ion exchange interactions and enriching the hydrophobic interactions. This usually results in better peak shapes and increased retentions for the solutes than when the separation is conducted in mobile phases buffered at pH equal to or less than the pKa of the solutes, where the solutes are involved in a mixed mode retention mechanism.

To understand the nature of the ion exchange interactions that take place, the SP8 phase and the commercial phases were evaluated with nine basic solutes in 80:20 (v/v) methanol-buffer mobile phases with the pH ranging from 5 to 11.5, using both organic and inorganic buffers to evaluate the influence of pH and the nature of the buffer on both the retention and asymmetry factors. The results are shown in Figure 4.2. The commercial stationary phases present small variations in their retention and asymmetry factors as the pH increases from 7 to 10 but the use of alkaline mobile phases (pH > 7) does not result in better peak shape or selectivity than the values obtained at pH 7 (except for chlorphenamine that presents its best peak shape at pH 10), since the principal retention mechanism for these stationary phases involves hydrophobic interactions. On the other hand the PMOS-SiO<sub>2</sub> stationary phases present significant variations in their retention

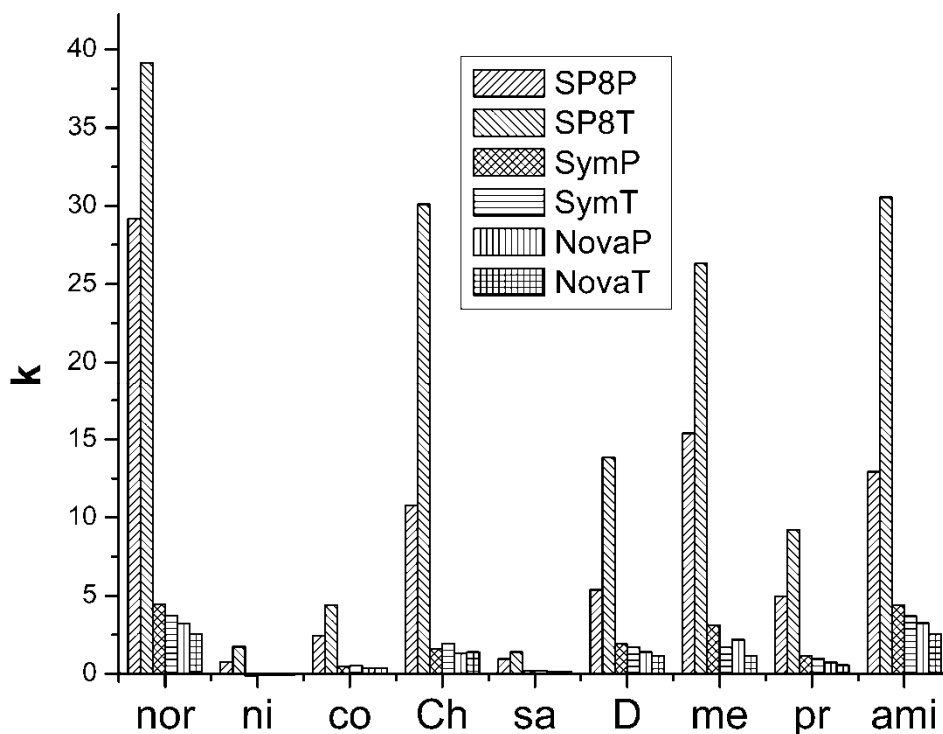


factors as a function of pH due to both ion exchange and hydrophobic interactions. All the test solutes were only slightly retained on SP8 at pH less than 5. At pH 5 with citrate buffer and at pH 6 with phosphate buffer the test solutes are protonated and the majority of silanol groups are also protonated, reducing the ion exchange interactions implied in a dual retention mechanism, yielding decreased retentions and poorer peak shapes. At pH 7 some silanol groups are unprotonated and the test solutes are still protonated, increasing the ion exchange interactions and resulting in a predominant ion exchange retention mechanism, longer retentions and better peak shapes. Even the basic hydrophilic solutes nicotine, codeine and salbutamol were retained. At pH higher than 7 the deprotonation of the test solutes reduces ion exchange interactions and increases hydrophobic interactions, which are weaker than the ion exchange interactions, resulting in reduced retention times and peak shapes that are poorer than at pH 7.

Stationary phases that present a predominant ion exchange retention mechanism show significant variation in retention at the same aqueous pH as a function of the buffer used, as shown in Figure 4.3 for SP8 and for the commercial phases. The change from phosphate buffer to tricine buffer results in a significant increase in retention on SP8, while for the commercial phases there are negligible changes. The effect of buffer type was lower for the hydrophilic bases than for hydrophobic bases since these solutes were less retained than hydrophobic bases on SP8 and are not retained on the commercial phases (nicotine, codeine and salbutamol elute together with the mobile phase on the commercial phases). The retention factors observed in Figure 4.2 for SP8 with borate buffer were much higher than those obtained with phosphate buffer at pH 7, while at pH 10 with borate the retention factors were significantly reduced, being close to those observed at pH 11 with phosphate buffer. On the other hand, the retention factors obtained with tricine at pH 8 were higher than those obtained with phosphate buffer at pH 8 (Figure 4.3)



**Figure 4.2:** Retention factor a), b) and c) and peak shape variations d), e) and f) as functions of pH on SP8 and the commercial phases. The chromatographic conditions are in the experimental section



**Figure 4.3:** Influence of buffer type on retention on SP8 and the commercial phases. The letter P indicates a 80:20 (v/v) methanol-phosphate buffer (pH 8; 20 mmol/L) mobile phase, while the letter T indicates a 80:20 (v/v) methanol-tricine buffer (pH 8; 20 mmol/L) mobile phase.

These observations are explained by the Lewis base theory since phosphate buffer is a harder Lewis base than either borate or tricine. Soft buffers interact better with the soft ion-exchange sites (silanol groups) on the PMOS-SiO<sub>2</sub> stationary phases than do phosphate buffers, making cation exchange interactions the dominant retention mechanism. At higher pH the solutes and the free silanols are both unprotonated so that ion exchange interactions are suppressed. Thus, the retentions at pH 10 (borate) and at pH 11 (phosphate) were reduced. The opposite was observed for ZirChrom-PBD [34,35]; hard bases interact better with the hard Lewis acid sites on the zirconia surface (ZrOH) than they do with a softer buffer. The ZirChrom-PDB stationary phase presents lower retention for neutral compounds than silica-based stationary phases, but they were more retentive for

basic solutes since the ion exchange interactions are stronger than hydrophobic interactions. On the other hand the PMOS-SiO<sub>2</sub> stationary phases had surface areas and phase ratios similar to classical C18 stationary phases and present high retention for basic solutes due the association of a dominant ion-exchange retention mechanism with a high surface area and phase ratio.

### *Effect of buffer concentration*

As a final test to evaluate the importance of the ion exchange mechanism that occurs with the PMOS-SiO<sub>2</sub> stationary phases, the influence of buffer concentration on the retention factor and asymmetry factor at pH 7 was investigated for SP10 and SP11 and for the commercial phases. With stationary phases that have predominately hydrophobic retention mechanisms little or no variation in retention or peak shape of basic solutes are reported with buffer concentration variation [1-3,34,35]. However, as indicated in Table 4.3, when the buffer concentration was increased from 20 mmol/L to 100 mmol/L, the retention factors of some of the test solutes decreased almost 50% for SP10 and SP11 and only 5% to 8% for the commercial stationary phases. The increase of buffer concentration causes an increase in the retention factors of nicotine and codeine on the PMOS-SiO<sub>2</sub> stationary phases, while the retentions of these solutes are almost unchanged on the commercial phases. The variations caused in the retention factors by the increase in buffer concentration have the same magnitude for both SP10 and SP11.

Another observation is the increase in asymmetry factors with the increase in buffer concentration for most solutes on the PMOS-SiO<sub>2</sub> stationary phases, as also shown in Table 4.3. The increase in buffer concentration reduces ion-exchange interactions, resulting in a competition between ion exchange interactions and hydrophobic interactions and poorer peak shapes. For the commercial phases, with predominantly hydrophobic retention mechanisms, the increase in buffer concentration results in negligible changes in peak shape.

**Table 4.3:** Retention and asymmetry factor variations as functions of phosphate buffer concentration.

<i>Solute</i>	<i>SP10</i>		<i>SP11</i>		<i>Symmetry C<sub>8</sub></i>		<i>Nova-Pak C<sub>8</sub></i>	
	<i>20 mmol/L</i>	<i>100 mmol/L</i>	<i>20 mmol/L</i>	<i>100 mmol/L</i>	<i>20 mmol/L</i>	<i>100 mmol/L</i>	<i>20 mmol/L</i>	<i>100 mmol/L</i>
	<b>k</b>							
pr	3.0	1.8	5.9	3.2	4.2	3.4	2.8	2.2
ami	14.2	7.6	24.1	11.7	30.2	27.8	23.5	20.4
ni	0.6	0.8	1.1	1.1	1.5	0.3	1.1	1.1
co	1.5	1.8	2.7	4.2	1.7	1.7	1.4	1.3
Ch	7.7	6.0	15.1	10.9	10.0	8.2	7.4	6.0
sa	0.7	0.6	1.3	1.3	0.5	0.4	0.4	0.3
D	6.1	3.2	8.9	4.9	10.2	9.0	8.4	6.7
me	12.1	6.3	22.5	11.9	11.3	9.0	8.4	6.7
	<b>As</b>							
pr	1.6	1.4	1.5	1.6	2.8	1.7	2.7	2.6
ami	1.1	1.3	1.1	1.3	3.2	2.7	5.0	4.9
ni	2.3	1.7	2.5	2.2	1.1	1.2	2.7	1.5
co	1.8	1.6	1.9	1.5	2.0	1.0	2.4	2.0
Ch	2.0	2.1	2.2	3.0	8.1	7.4	6.3	6.6
sa	0.9	1.4	1.8	1.5	1.4	1.8	1.4	1.2
D	1.2	1.6	1.6	1.4	1.9	2.8	2.2	3.3
me	1.5	1.8	1.5	2.1	1.9	2.8	2.2	3.3

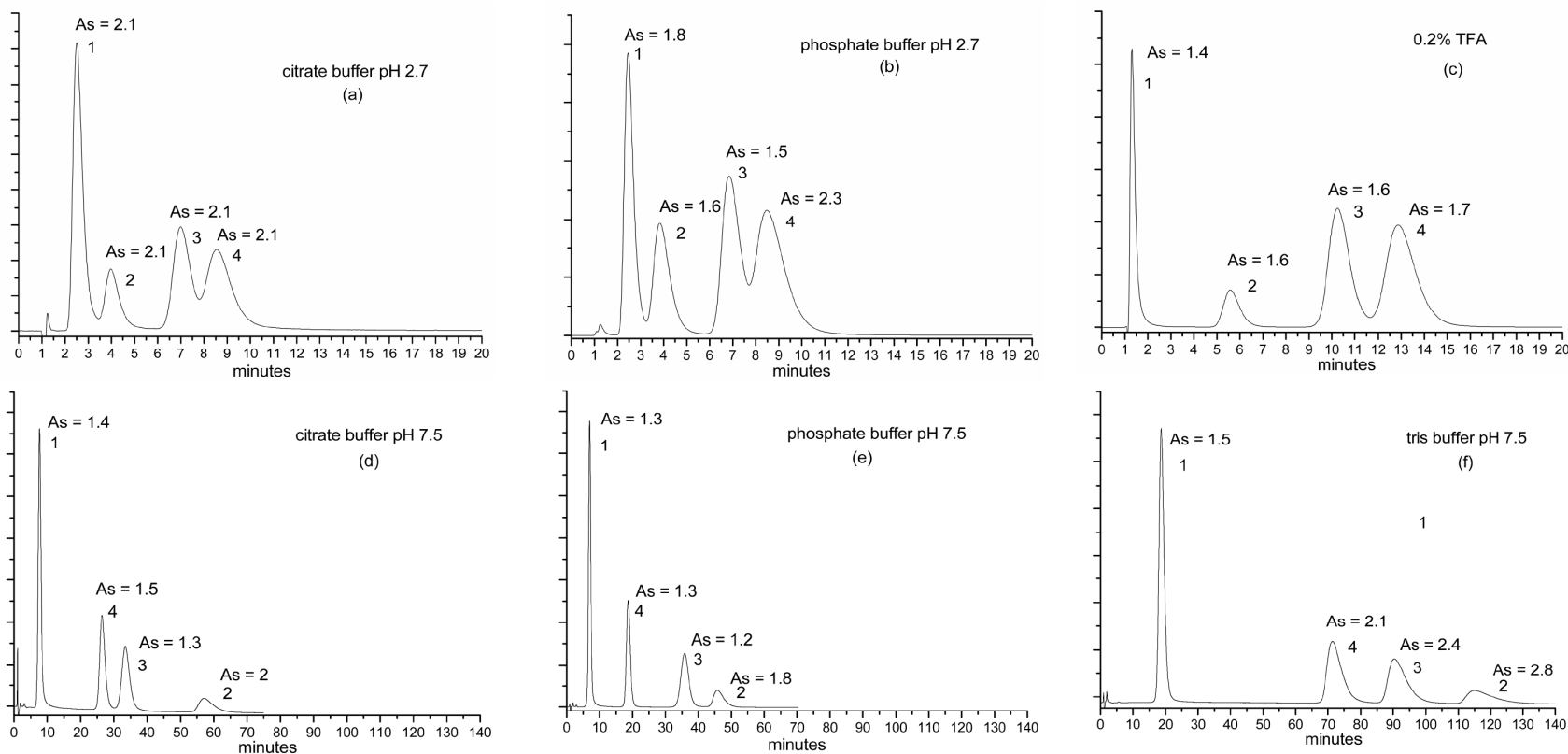
### The applicability of some PMOS-SiO<sub>2</sub> stationary phases

Some examples of the effect the predominant hydrophobic retention mechanism that occurs with PMOS-SiO<sub>2</sub> stationary phases in acid mobile phases are shown in Figure 4.4a, b and c. Under these conditions the PMOS-SiO<sub>2</sub> stationary phases present a typical “reversed phase behavior” and test solutes with higher log P values are more retained. The use of trifluoroacetic acid results in better retention. Perchloric acid shows retention similar to that obtained with phosphate and citrate buffers (Figure 4.4a and b) where amitriptyline and nortriptyline are poorly resolved, showing that ion exchange interactions are suppressed in acidic mobile phases. In neutral mobile phases the PMOS-SiO<sub>2</sub> stationary phases present “anti-reversed phase” behavior, as shown in Figure 4.4d, e and f. The test solutes are more retained with a 80:20 (v/v) methanol:aqueous neutral mobile phase than with a 50:50 (v/v) methanol:aqueous

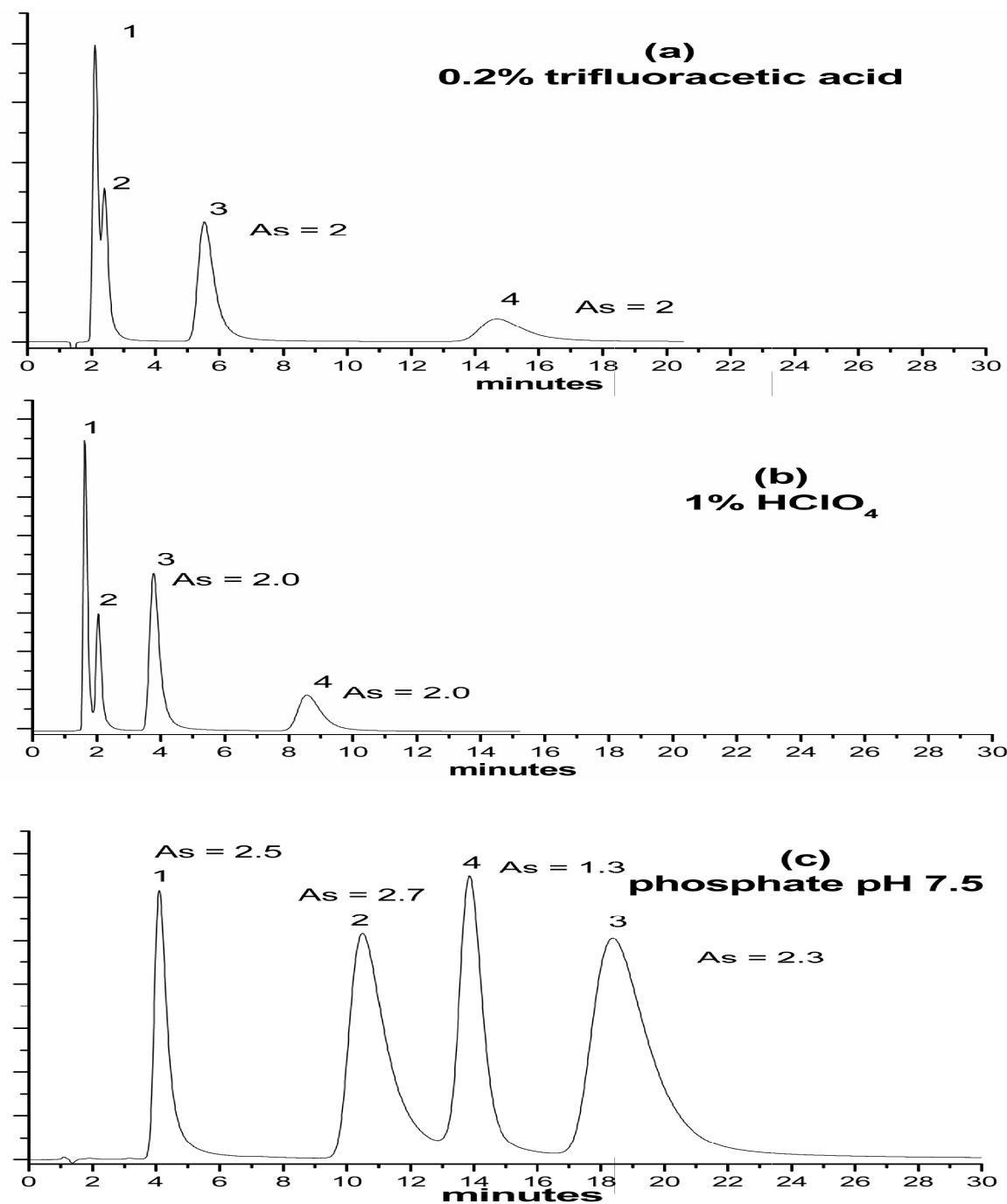
acidic mobile phase and the elution order is no longer governed by the log P values. Different chromatographic behaviors were observed as a function of the buffer used. Increased retentions were obtained for soft buffers, even for solutes with poor peak shapes such as tris buffer, as previously shown in Figure 4.2.

Dextromethorphan is a very challenging test solute and gives poor peak shapes on most commercial phases based on highly pure silica, although these stationary phase normally present good peak shape for tricyclic antidepressant drugs [20]. In neutral mobile phases this solute presents poorer peak shapes than amitriptyline and nortriptyline and elutes after those tricyclic antidepressant drugs but shows better peak shape and is less retained than the antidepressant drugs in acidic mobile phases (Figure 4.4).

The increased retention and symmetrical peaks observed with PMOS-SiO<sub>2</sub> stationary phases in neutral mobile phases can also be used for the separation of hydrophilic drugs, as shown in Figure 4.5. The basic hydrophilic drugs salbutamol and procainamide are poorly resolved in 10:90 (v/v) methanol: aqueous buffer using either trifluoroacetic acid or perchloric acid but are well resolved in 55:45 (v/v) methanol:phosphate buffer (pH 7.5; 20 mmol/L) mobile phase.



**Figure 4.4:** Chromatograms for the separation of some basic solutes on SP8 stationary phase using acidic 50:50 (v/v) mobile phases: (a) methanol:citrate buffer (pH 2.7; 20 mmol/L), (b) methanol:phosphate buffer (pH 2.7; 20 mmol/L), (c) methanol:0.2% trifluoroacetic acid and using neutral 80:20 (v/v) mobile phases: (d) methanol:citrate buffer (pH 7.5; 20 mmol/L), (e) methanol:phosphate buffer (pH 7.5; 20 mmol/L), (f) methanol:tris buffer (pH 7.5; 20 mmol/L),. Solutes: 1 = propranolol; 2 = dextromethorphan; 3 = nortriptyline; 4 = amitriptyline.



**Figure 4.5:** Chromatograms for the separation of some hydrophilic bases on the SP8 stationary phase using (a) 10:90 (v/v) mobile phases: methanol:0.2% trifluoroacetic acid, (b) 10:90 (v/v) mobile phases: methanol:1% perchloric acid, (c) 55:45 (v/v) methanol:phosphate buffer (pH 7.5; 20 mmol/L). Flow rate: 0.5 mL/min. Temperature: 40 °C. Solutes: 1 = salbutamol; 2 = procainamide; 3 = codeine; 4 = lidocaine.



## Conclusion

Elution of nortriptyline before amitriptyline at neutral pH, reduction of the retention factor of basic solutes with increasing pH, pronounced variations in retention and asymmetry factors with the buffer type used at the same aqueous pH, and pronounced variation of retention factors and peak shapes of basic solutes with buffer concentration are all observations that suggest a predominant ion exchange retention mechanisms for the PMOS-SiO<sub>2</sub> stationary phases in neutral mobile phases. However, this does not adversely affect the use of these stationary phases especially at neutral pH, where stationary phase stability is not a problem, as the asymmetry factors are, for the most part, within acceptable ranges. These properties are similar to those of other stationary phases that have predominately ion exchange retention mechanisms with basic solutes, such as polymer-coated zirconium oxide [34,35] and stationary phases with embedded carboxylic groups [36].

The predominant ion exchange mechanism confers both high retention for hydrophilic bases that are poorly retained on chemically bonded phases and good peak shape for both hydrophobic and hydrophilic bases. Variations in pH and buffer type can be used to manipulate selectivity, permitting specific separations of complex mixtures. Thus, this paper has shown that the silanol activity of PMOS-SiO<sub>2</sub> stationary phases can be adequately evaluated by using appropriate basic probes and mobile phases with different pH, buffer types and buffer concentrations.

## References

1. McCalley, D.V., *J. Chromatogr. A* 2010, 1217, 858–880.
2. McCalley, D.V., *J. Sep. Sci.* 2003, 26, 187–200
3. Nawrocki, J., *J. Chromatogr. A* 1997, 779, 29-71.
4. Bij, K.E., Horvath, C., Melander, W.R., Nahum, A., *J. Chromatogr.* 1981, 203 65-84.

5. Gritti, F., Perdu, C., Guiochon, G., *J. Chromatogr. A* 2008, 1180, 73–89.
6. Kirkland, J.J., van Straten, M.A., Claessens, H.A., *J. Chromatogr. A* 1988, 797 111-120.
7. Cheng, Y.-F., Walter, T.H., Lu, Z., Iraneta, P., Alden, B.A., Gendreau, C., Neue, U.D., Grassi, J.M., Carmody, J.L., O’Gara, J.E., Fisk, R., *LC–GC* 2000 18, 1162-1172.
8. Wyndham, K.D., O’Gara, J.E., Walter, T.H., Glose, K.H., Lawrence, N.L., Alden, B.A., Izzo, G.S., Hudalla, C.J., Iraneta, P.C., *Anal. Chem.* 2003, 75, 6781-6788.
9. <http://www.kromasil.com/kromasil/opencms/eternity/about.html> accessed in September, 2010.
10. Engelhardt, H., Blay, Ch., Saar, J., *Chromatographia Suppl* 2005, 62,S19-S29
11. Claessens, H.A., *Trends Anal. Chem.* 2001, 20, 563-583.
12. Subirats, X., Bosch, E., Rosés, M., *J. Chromatogr. A* 2009, 1216, 1756–1775.
13. Claessens, H.A., van Straten, M.A., *J. Chromatogr. A* 2004, 1060, 23–41.
14. Trammell, B.C., Boissel, C.A., Carignan, C., O’Shea, D.J., Hudalla, C.J., Neue, U.D., Iraneta, P.C., *J. Chromatogr. A* 2004, 1060, 153–163.
15. Dai, J., Carr, P.W., *J. Chromatogr. A* 2009, 1216, 6695–6705.
16. Neue, U.D., Alden, B.A., Walter, T.H., *J. Chromatogr. A* 1999, 849 101–116.
17. Fornstedt, T., Zhong, G., Guiochon, G., *J. Chromatogr. A* 1996, 741, 1-12.
18. Neue, U.D. Tran, K.M., Méndez, A., Carr, P.W., *J. Chromatogr. A* 2005, 1063, 35-45.
19. Kele, M., Guiochon, G., *J. Chromatogr. A* 1999, 830, 41-54.
20. Okusa, K., Suita, Y., Otsuka, Y., Tahara, M., Ikegami, T., Tanaka, N., Ohira, M., Takahashi, M., *J. Sep. Sci.* 2010, 33, 348–358.
21. Golubitskii, G.B., Ivanov, V.M., *J. Anal. Chem.* 2008, 4, 203-395.
22. Maldaner, L., Jardim I.C.S.F., Lourenço, J., Fioravanti, L.M.A., Collins, C.H., *J. Sep. Sci.* 2010, 33, 2917-2929.
23. Faria, A.M., Collins, C.H., Jardim, I.C. S. F., *J. Braz. Chem. Soc.*, 2009, 20, 1385-1398.
24. Collins, C. H., Silva, C.R., Faria, A.M., Collins, K.E., Jardim, I.C.S. F., *J. Braz. Chem. Soc.*, 2009, 20, 604-612.
25. Jardim, I.C.S.F., Collins, K.E., Collins, C.H., *Microchem J.* 2004, 77, 191–198.
26. Kimata, K., Iwaguchi, K., Onishi, S., Jinno, K., Eksteen, R., Hosoya, K., Arki, M., Tanaka, N., *J. Chromatogr. Sci.* 1989, 27, 721-728.
27. <http://www.acdlabs.com/resources/freeware/> . accessed in September of 2010.
28. Borges, E.M., Silva, C.G.A., Collins, C.H., *Microchem. J.* 2010, 96, 120-125.
29. Collins, K.E., Franchon, A.C., Jardim, I.C.S.F., Radanovic, E., Gonçalves, M.C., *LC–GC* 2000, 18 106-117.
30. Kapor, M.A., Master thesis, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2001. <http://biq.iqm.unicamp.br/arquivos/teses/vtIs000237862.pdf>

31. Vigna, C.R.M., Bottoli, C.B.G., Collins, K.E., Collins, C.H., *J. Chromatogr. A* 2007 1156:60–67.
32. Tonhi, E., Bachmann, S., Albert, K., Jardim, I.C.S.F., Collins, K.E., Collins, C.H. *J. Chromatogr. A* 948 (2002) 97–107.
33. Bachmann, S., Melo, L.F.C., Silva, R.B., Anazawa, T.A., Jardim, I.C.S.F., Collins, K.E., Collins, C.H., Albert, K., *Chem. Mater.* 2001, 13, 1874-1879.
34. Y. Hu, X. Yang, P.W. Carr, *J. Chromatogr. A* 2002, 968, 17-29.
35. Nawrocki, J., Dunlap, C., Li, J., Zhao, J., McNeff, C.V., McCormick, A., Carr, P.W., *J. Chromatogr. A* 2004, 1028, 1–30.
36. Davies N.H., Euerby, M.R., McCalley, D.V. *J. Chromatogr. A* 2007, 1138:65–72.

## **Capítulo 5: Evaluation of immobilized stationary phases. Part I: Effect of pH, temperature, buffer type and buffer concentration on chromatographic performance.**

### **Abstract**

The effects of mobile phase pH, temperature, buffer type and buffer concentration on the chromatographic performances (selectivity, retention factor, asymmetry factor and efficiency) of basic pharmaceuticals were evaluated using new stationary phases prepared by the thermal immobilization of poly(methyloctylsiloxane) onto silica. Basic pharmaceuticals show longer retention times at near neutral pH, as both the silanols and the basic pharmaceuticals are protonated and shorter retention times in alkaline pH, where the silanols and the basic solutes are not protonated. Temperature and buffer concentration increases also result in shorter retention times. However, changes in mobile phase pH, temperature and increased buffer concentration did not result in better peak shapes. These and other tests confirm the contribution of a predominant ion-exchange retention mechanism for these stationary phases.

*Keywords:* basic pharmaceuticals, immobilized polysiloxane, ion-exchange, RPLC, silanol activity,

## Introduction

HPLC is widely used in the pharmaceutical industry [1] due to its ease of use with gradient elution, compatibility with aqueous samples, and the versatility of its retention mechanisms, which allow changes in the separations to be brought about by changes in pH, organic modifier or additives. One concern with respect to these analyses is the effect of “silanol activity” that often implies poor chromatographic performance (distorted peak shape, less selectivity and low efficiency) for basic solutes, attributed to secondary interactions with accessible residual silanol groups present on the surface of the support, even after it is chemically modified. The detailed mechanisms involving “silanol activity” are far from clear, but ion-exchange interactions are recognized as having important contributions [1,2].

In classical C8 and C18 stationary phases the principal retention mechanisms involves hydrophobic interactions with the hydrophobic chains bonded on the silica surface. The presence of unreacted silanols is responsible for ion-exchange interactions that compete with the hydrophobic interactions and these competing retention mechanisms may result in low chromatographic performance for basic solutes. On the other hand, with ZirChrom stationary phases, based in zirconium oxide [3-5], and Primesep phases having embedded carboxylic groups [6], the most important retention mechanism is ion-exchange and these stationary phases show good chromatographic performances for basic solute analyses [3-6]

Carr and co-workers [5] have proposed a modification of Neue’s two site model [7] to explain retention and asymmetry factors for RP-HPLC when the main retention mechanism is ion-exchange interaction, as seen with polymer-coated zirconium oxide stationary phases. Retention is attributed to three different sites, adding a purely ion-exchange site to the purely reversed-phase site and the hydrophobically assisted ion-exchange site of Neue’s model.

A recent paper from our laboratory [8] has shown that PMOS-SiO<sub>2</sub> stationary phases with different %C have high ion-exchange properties in near neutral mobile phases using the Tanaka test [9] and afford good peak shapes and high efficiencies for highly basic pharmaceuticals and benzodiazepines at neutral pH [8]. In the present study the effect of mobile phase pH, temperature, buffer type and buffer concentration on the chromatographic performance (selectivity, retention factor, asymmetry factor and efficiency) of new stationary phases, prepared by the thermal immobilization of poly(methyloctylsiloxane) onto silica surfaces, has been examined using several basic pharmaceuticals as probes. The results are explained by Carr's three site retention model.

## Experimental

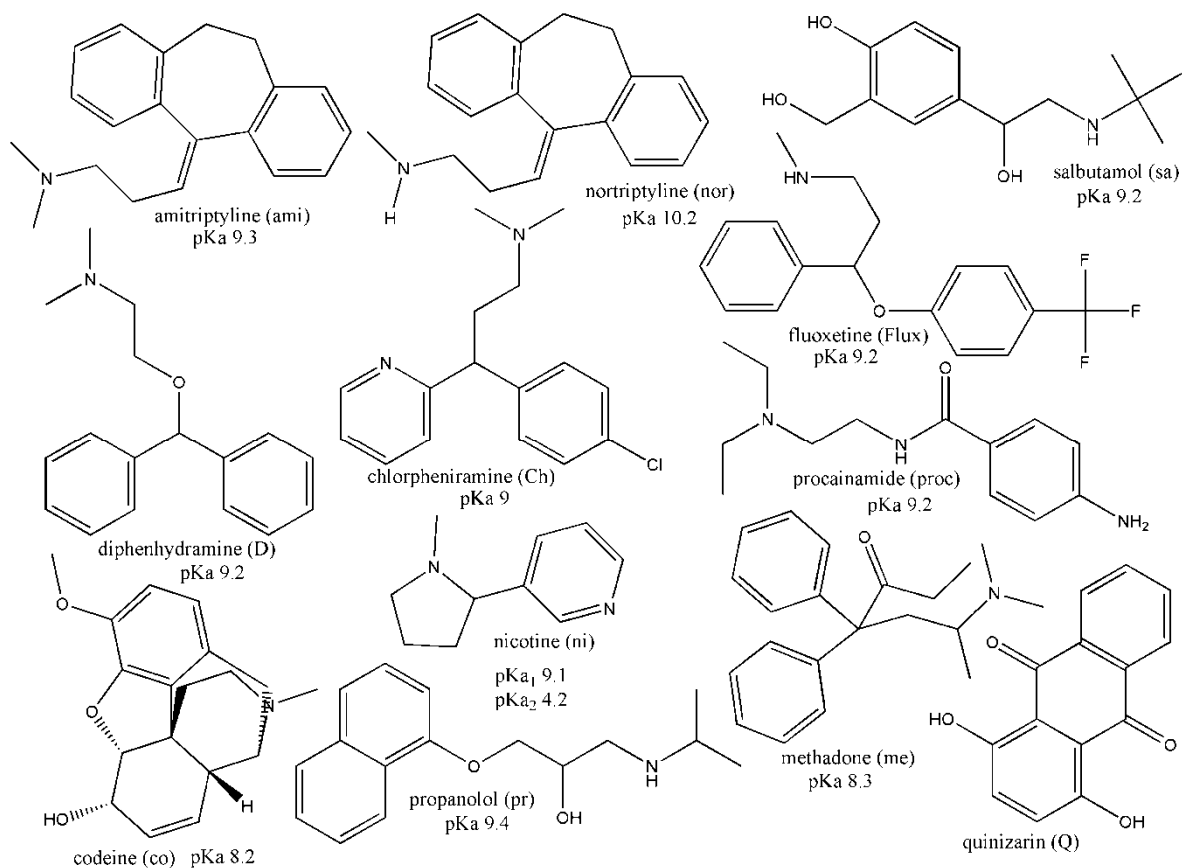
### *Chemicals and reagents*

The mobile phases were prepared with ultrapure water from a Millipore Direct-Q™ system (Billerica, USA). Methanol and isopropanol were from Tedia, (Fairfield, USA). Tetrahydrofuran was from J.T Baker (Phillipsburg, USA). Pentane was purchased from Merck (Darmstadt, Germany). Poly(methyloctylsiloxane) (PMOS), number-average molar mass, *M<sub>n</sub>*, 6200 and weight-average molar mass, *M<sub>w</sub>*, 16 000, was obtained from United Chemicals Technologies (Bristol, PA, USA). The potassium salts, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (98%), K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (99%) and KHCO<sub>3</sub> (99.7-100.5%), were purchased from Synth (Diadema, Brazil). Sodium citrate tribasic dihydrate (99%) and N-(2-hydroxy-1,1-bis(hydroxymethyl)ethyl)glycine (tricine) (99%) were from Sigma (St. Louis, USA). Sodium borate was from Fisher (Fairlawn, USA). Triethylamine (TEA) (99%) was from Vetec (Duque de Caxias, Brazil). 2-Amino-2-hydroxymethyl-propane-1,3-diol (Tris) was from Mallinckrodt (Paris, France). Ammonium hydroxide (28-30%) was from LabSynth (Diadema, Brazil).

The silica used was Kromasil, lot n<sup>o</sup> AT 1959, from Akzo Nobel (Bohus, Sweden), with 5 μm particle size, 11.1 nm pore size and 313 m<sup>2</sup>/g specific surface

area. Kromasil is a type B silica that has only a small amount of contaminant metals.

The test solutes were: uracil (98%), butylbenzene (BB) (>99%) and amitriptyline hydrochloride (ami) (99%) from Aldrich (Milwaukee, USA), HPLC grade toluene from Tedia and quinizarin (96%), nortriptyline hydrochloride (nor) (98%), (-)-nicotine (ni) (98-100%), ( $\pm$ )-chlorpheniramine maleate (Ch) and procainamide hydrochloride from Aldrich (Steinheim, Germany). Codeine sulfate (co), diphenhydramine hydrochloride (D), propranolol (pr), salbutamol sulfate (sa) and methadone (me) were kindly donated by Dr. Marcelo Ribani from TECPAR (Curitiba, Brazil) while fluoxetine (Flux) was kindly donated by Dr. Paulo César Pires Rosa of EMS (Hortolandia, Brazil). The structures of the test solutes and their pKa values are shown in Figure 5.1.



**Figure 5.1:** The basic test compounds with their pKa values

## Preparation of the stationary phases

The stationary phases were prepared using different amounts of PMOS (g PMOS/g silica), and different times (hours) and temperatures ( $^{\circ}\text{C}$ ) of thermal treatment, to obtain five stationary phases with different carbon contents (%C), as shown in Table 5.1. The general procedure for preparation of the stationary phases consists in dissolving the PMOS in 20 mL of pentane, then adding an appropriate amount of silica and 20 mL more of pentane. This mixture was stirred for 30 minutes at room temperature and then placed in a fume hood for evaporation of the solvent at room temperature. The dried materials were then placed individually in an oven at the specified temperature for immobilization under an air atmosphere.

**Table 5.1:** Percentage of PMOS per gram of silica (%PMOS), time (t) and temperature (T) of immobilization used to prepare the PMOS-SiO<sub>2</sub> stationary phases.

<i>Code</i>	<i>%PMOS<sup>a</sup></i>	<i>t (hours)</i>	<i>T (<math>^{\circ}\text{C}</math>)</i>	<i>%C</i>	<i>%PMOS<sup>b</sup></i>
SP1	30	8	100	5	9
SP2	30	4	130	7	10
SP3	60	4	100	9	15
SP4	45	6	140	12	20
SP5	60	8	130	19	30

<sup>a</sup> amount of PMOS used to prepare the phases

<sup>b</sup> amount of PMOS immobilized onto the Kromasil silica surface after the packing procedure.

The stationary phases were slurry packed (0.8 g of stationary phase in 20 mL of 20:80 (v/v) isopropanol-tetrahydrofuran) into previously polished 50 x 4 mm columns [8] made from 316 stainless steel tubing at a constant packing pressure of 40 MPa, using a Haskel Packing Pump (Burbank, USA) with methanol as propulsion solvent.

## Percent carbon

Elemental analyses were carried out with a Model CHN-2400 PerkinElmer Analyzer (Shelton, USA).



## Mobile phase preparation

All mobile phases were prepared volumetrically. The pH were measured in the aqueous phase with a calibrated pHmeter, Qualxtron model 8010 (Jundiaí, Brazil), before the addition of organic modifier. Lower pH adjustments were made with hydrochloric acid solutions for organic buffers and phosphoric acid solutions for phosphate buffers, while potassium hydroxide solutions were used to adjust neutral and higher pH with both inorganic and organic buffers.

## Chromatographic evaluations

All the chromatographic evaluations were performed using a modular HPLC system with a Shimadzu LC 10AD pump (Kyoto, Japan), a Rheodyne model 8120i injection valve (Cotati, USA) with 5  $\mu$ L loop, a Shimadzu CTO-10AC column oven and a Shimadzu Model SPD-10 AV UV–VIS detector. Data were processed using ChromPerfect software from Justice Innovations (Mountain View, USA). All tests were conducted at a flow rate of 0.5 mL/min.

Retention factors ( $k$ ) were calculated using the relation  $k = (t_R - t_M)/t_M$ , where  $t_R$  is the retention time for the solute and  $t_M$  is the retention time of the unretained component, uracil. Asymmetry factors ( $As$ ) were calculated using the relation  $As = rw_{10\%}/lw_{10\%}$ , where  $rw_{10\%}$  and  $lw_{10\%}$  are the right width and the left width, respectively, measured horizontally from the right or left edge of the peak to a vertical line from the peak apex, at the 10% level,  $w_{5\%}$ . Efficiency was calculated using  $N = 5.54(t_R/w_h)^2$ , where  $w_h$  is the peak width at 50% of the peak height.

The effects of mobile phase pH and buffer type on retention factors and asymmetry factors were evaluated using basic pharmaceuticals, with 80:20 (v/v) methanol:buffer solutions. For pH 5 sodium citrate was used, for pH 6, 7, 8, 11 phosphate buffers were used, for pH 8.5 tris buffer was used, for pH 10.5 ammonia buffer was used and for pH 11.5 triethylamine buffer was used, tricine buffer was also used for pH 8. These buffers were 20 mmol/L. For pH 9 and 10 borate buffers were used, while carbonate was also used at pH 10. The borate and carbonate

buffers concentrations were 5 mmol/L. The test was carried out at a column temperature of 23 °C. Detection was at 220 nm.

The effects of buffer concentration on the retention factors and asymmetry factors of eight basic pharmaceuticals were evaluated using 65:35 (v/v) methanol:phosphate buffer at pH 7 with concentrations of 10 mmol/L, 50 mmol/L and 100 mmol/L. The analyses were performed at 23 °C. Detection was at 220 nm.

The effects of temperature were evaluated using the retention factors and asymmetry factors of nine basic pharmaceuticals, one neutral solute (butylbenzene) and one chelating solute (quinizarin) with 80:20 (v/v) methanol:phosphate buffer (pH 7; 20 mmol/L). The analyses were performed at 16 °C, 40 °C and 60 °C. Detection of the basic solutes was at 220 nm and detection of the others was at 254 nm.

## Software

All graphs were constructed using OriginPro 7.5 SRO v7.5714(B714), (Northampton, USA).

## Results and discussion

The principal objectives of this work are to understand the influence of mobile phase pH, temperature, buffer type and buffer concentration on the retention factors and asymmetry factors of several highly basic pharmaceutical solutes using PMOS-SiO<sub>2</sub> stationary phases.

### **Effect of mobile phase pH and buffer type on retention factors and asymmetry factors.**

As the pH is changed, all the chromatographic parameters for basic pharmaceuticals also change. Normally a mobile phase buffered at a pH value

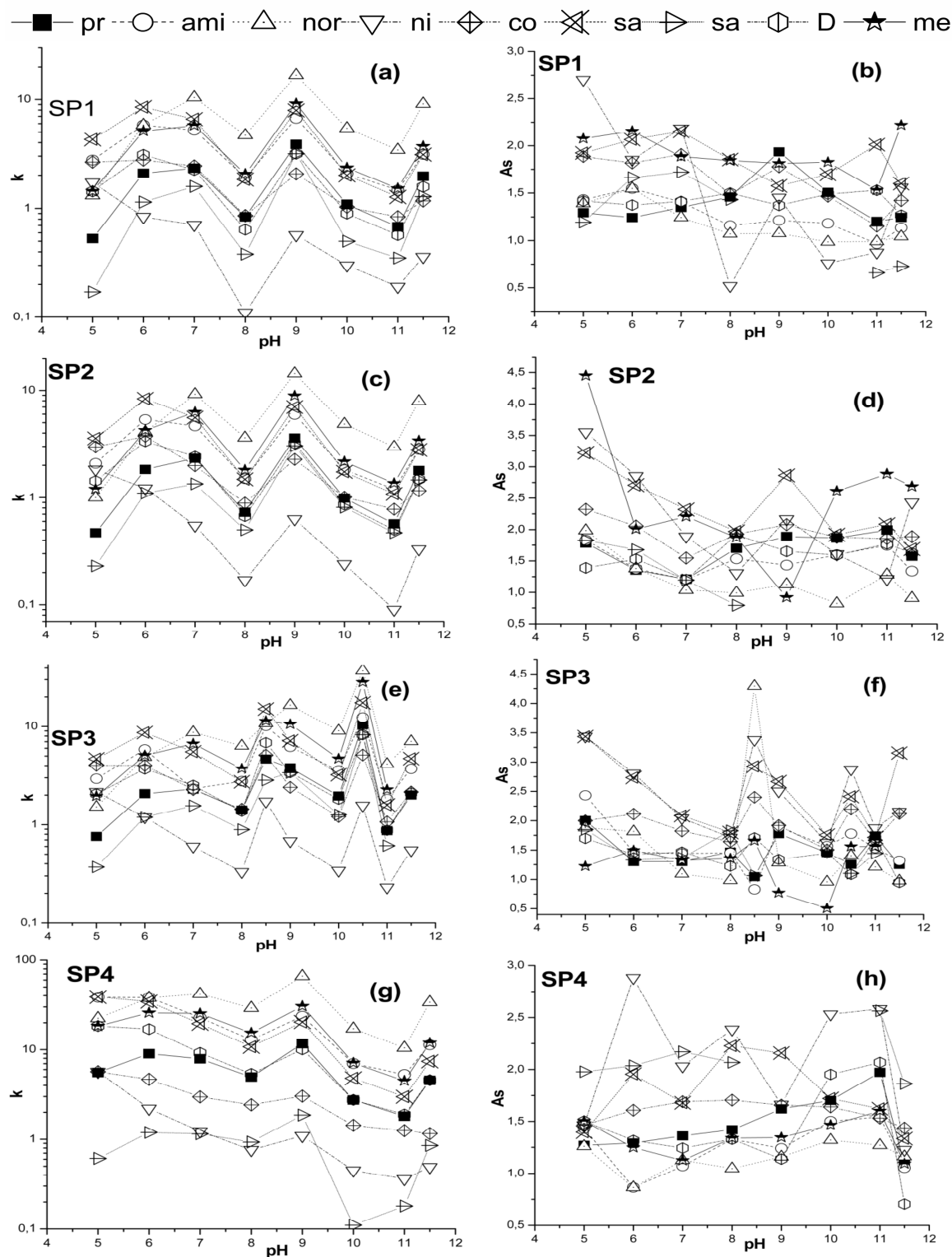
higher than the pKa of the solutes is used with chemically bonded phases to ensure that the solute is unprotonated, thus avoiding ion exchange interactions and enriching the hydrophobic interactions [1,10]. This usually results in better peak shapes and increased retentions for the solutes than when the separation is conducted in mobile phases buffered at pH equal to or less than the pKa of the solutes, where the basic pharmaceuticals are protonated and can undergo strong ion-exchange interactions with ionized silanols.

To understand the influence of pH and the nature of the buffer on the retention factors and asymmetry factors with the PMOS-SiO<sub>2</sub> stationary phases, SP1, SP2, SP3 and SP4 were evaluated with nine basic pharmaceutical compounds in 80:20 (v/v) methanol-buffer mobile phases with both organic and inorganic buffers, having pH ranging from 5 to 11.5. These results are shown in Figure 5.2, while Table 5.2 compares the effect of different buffer types at the same pH.

Mobile phase pH is a function of the buffer type and the concentration of the buffer as well as the type of organic modifier used in the mobile phase [12]. Figure 5.2 shows that, for mobile phases buffered with phosphate, the retention factors increase as the pH increases from 6 to 7 but decrease as the pH goes from 7 to 11. The peak shapes also improve as the pH goes from 6 to 7 and remain about the same as the pH goes from 7 to 11. At pH 6-8 with phosphate buffer the test solutes are almost 100% protonated while at pH 11 they are almost 100% unprotonated [12]. Thus, the effect of the ion-exchange contribution to the separation mechanism diminishes and the retention factors decrease, although peak asymmetry improves a bit as the pH increases to above the pKa value. In all the mobile phases above pH 6 nortriptyline elutes after amitriptyline, which is “anti-reversed phase” retention behavior [13]. In contrast, at pH below 6, nortriptyline eluted before amitriptyline, indicating that ion exchange interactions were not the dominant retention mechanism with more acidic mobile phases where both the free silanols and the test solutes are protonated.

Different elution orders were observed with each mobile phase used. Some solutes have better peak shapes at one pH and other solutes have better shapes

at another pH, as previously observed by McCalley [1]. On SP3, higher retention factors were observed with tris buffer at pH 8.5, borate buffer at pH 9 and with ammonia buffer at pH 10.5 than with phosphate buffer at pH 7. Similarly, higher retention factors were observed with tricine buffer at pH 8 than with phosphate buffer at pH 8 with all the PMOS-SiO<sub>2</sub> stationary phases (Table 5.2). Phosphate is a harder Lewis base than the organic buffers; the latter interact better with the soft ion-exchange sites (SiOH) on the PMOS-SiO<sub>2</sub> stationary phase surfaces, making the PMOS-SiO<sub>2</sub> stationary phases stronger cation exchangers. Longer retention times for basic solutes occur when the ion exchange interactions are stronger than the hydrophobic ones. The retention factors with borate at pH 9 were greater than with phosphate at pH 7, while the retention factors with borate at pH 10 and near to those obtained with carbonate at pH 10 and phosphate at pH 11, due to the suppression of ion exchange interactions that occur when both the test solutes and free silanols are unprotonated. Some of these differences may result from the fact that the actual pH of the mobile phase is not the pH of the aqueous phase, since the pH changes after the addition of the organic constituent [12]. For example the non-aqueous pH of a 80:20 (v/v) methanol-buffer mobile phase prepared with tris buffer at pH 8, phosphate buffer at pH 7 and borate buffer at pH 9 (all solutions 10 mmol/L at 25 °) are 7.95, 9.53 and 9.45, respectively [14,15], which means that the longer retention times observed with borate buffer than with phosphate buffer can be attributed to better interactions of soft ion-exchange sites (SiOH) on the PMOS-SiO<sub>2</sub> stationary phase, while the longer retention times observed for tris buffer than for phosphate buffer can be attributed both to the better interactions of soft ion-exchange sites and to the higher amount of unprotonated SiOH sites.



**Figure 5.2:** Retention factor (a, c, e, g) and asymmetry factor (b, d, f, h) variations as functions of pH. Note that the retention factor scale is logarithmic. The buffer used for pH 8 is phosphate and at pH 10 borate. The chromatographic conditions are in the experimental section. Solute identifications are in Figure 5.1.

**Table 5.2:** Influence of buffer type on retention factors ( $k$ ) and asymmetry factors ( $A_s$ ) of several basic solutes on PMOS-SiO<sub>2</sub> stationary phases. The symbol 8P indicates an 80:20 (v/v) methanol-phosphate buffer (pH 8; 20 mmol/L) mobile phase, the symbol 8T indicates an 80:20 (v/v) methanol:tricine buffer (pH 8; 20 mmol/L) mobile phase, the symbol 10B indicates an 80:20 (v/v) methanol:borate buffer (pH 10; 5 mmol/L) mobile phase, and the symbol 10C indicates a 80:20 (v/v) methanol:carbonate buffer (pH 10; 5 mmol/L) mobile phase. Solute identifications in Figure 5.1

<i>buffer</i>	<i>pr</i>	<i>ami</i>	<i>nor</i>	<i>ni</i>	<i>co</i>	<i>Ch</i>	<i>sa</i>	<i>D</i>	<i>me</i>
(k) SP1									
8P	0.8	1.9	4.7	0.1	0.9	1.8	0.4	0.6	2.1
8T	2.5	6.4	7.1	0.9	3.1	9.3	1.3	3.4	5.8
10B	1.1	2.1	5.4	0.3	1.0	2.0	0.5	0.9	2.3
10C	1.1	2.3	5.6	0.3	1.1	2.1	0.6	0.9	2.3
(k) SP2									
8P	0.7	1.5	3.6	0.2	0.9	1.5	0.5	0.7	1.8
8T	2.2	5.4	5.7	0.9	3.3	8.0	1.4	3.3	5.1
10B	1.0	1.8	4.9	0.2	1.0	1.7	0.8	0.9	2.2
10C	0.9	1.9	4.6	0.2	1.1	1.8	0.6	0.7	2.1
(k) SP3									
8P	1.4	2.8	6.4	0.3	1.4	2.7	0.9	1.4	3.7
8T	5.3	10.0	14.1	1.4	4.7	14.0	3.3	6.4	12.7
10B	2.0	3.6	9.1	0.3	1.2	3.2	1.3	1.8	4.7
10C	1.2	2.2	5.0	0.3	1.1	1.9	0.7	1.0	2.6
(k) SP4									
8P	5.0	12.9	29.2	0.8	2.4	10.8	0.9	5.4	15.4
8T	9.2	30.6	39.2	1.7	4.4	30.1	1.4	13.8	26.3
10B	2.7	7.0	17.2	0.5	1.4	4.8	0.1	2.8	7.1
10C	3.1	8.6	17.0	0.9	2.4	11.5	0.6	4.2	10.8
(As) SP1									
8P	1.5	1.2	1.1	0.5	1.5	1.8	1.4	3.8	1.8
8T	1.2	1.3	1.7	1.9	1.8	2.5	1.8	1.7	2.1
10B	1.5	1.2	1.0	0.8	1.5	1.6	0.7	2.4	1.8
10C	0.9	1.0	0.9	0.7	1.2	1.4	0.8	2.0	1.4
(As) SP2									
8P	1.7	1.4	1.0	1.3	1.9	2.0	0.8	2.8	1.9
8T	1.2	1.3	1.7	1.9	1.8	2.5	1.3	2.0	1.8
10B	1.9	1.5	0.8	1.6	1.9	1.9	--	2.1	2.6
10C	1.8	1.6	0.7	1.2	1.6	1.8	0.4	3.4	2.6
(As) SP3									
8P	1.5	1.3	1.0	1.7	1.6	1.8	1.8	1.3	1.4
8T	1.4	2.2	1.4	2.5	2.2	3.3	1.6	1.7	1.6
10B	1.5	1.6	1.0	1.6	1.5	1.8	1.9	1.2	0.5
10C	1.5	1.6	0.7	2.0	1.6	1.8	1.7	1.4	1.4
(As) SP4									
8P	1.4	1.3	1.1	2.4	1.7	2.2	2.1	1.3	1.3
8T	1.3	1.3	1.1	2.2	1.6	2.0	2.2	1.4	1.2
10B	1.7	1.5	1.3	2.5	1.6	1.7	5.5	2.0	1.5

10C	1.6	1.3	0.9	2.6	1.6	2.0	2.0	1.5	1.2
-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----

As the predominant retention mechanism in neutral and slightly alkaline mobile phases with these PMOS-SiO<sub>2</sub> stationary phases is ion exchange [8], smaller variations in asymmetry factors were observed with changes in pH or buffer type. Also, all the PMOS-SiO<sub>2</sub> stationary phases, independent of the %C, present the same chromatographic behavior, since the free silanols remain available in the PMOS-SiO<sub>2</sub> stationary phases, as the PMOS is immobilized onto silica surface as plugs [16]. This higher silanol availability confers to these stationary phases significant ion-exchange properties.

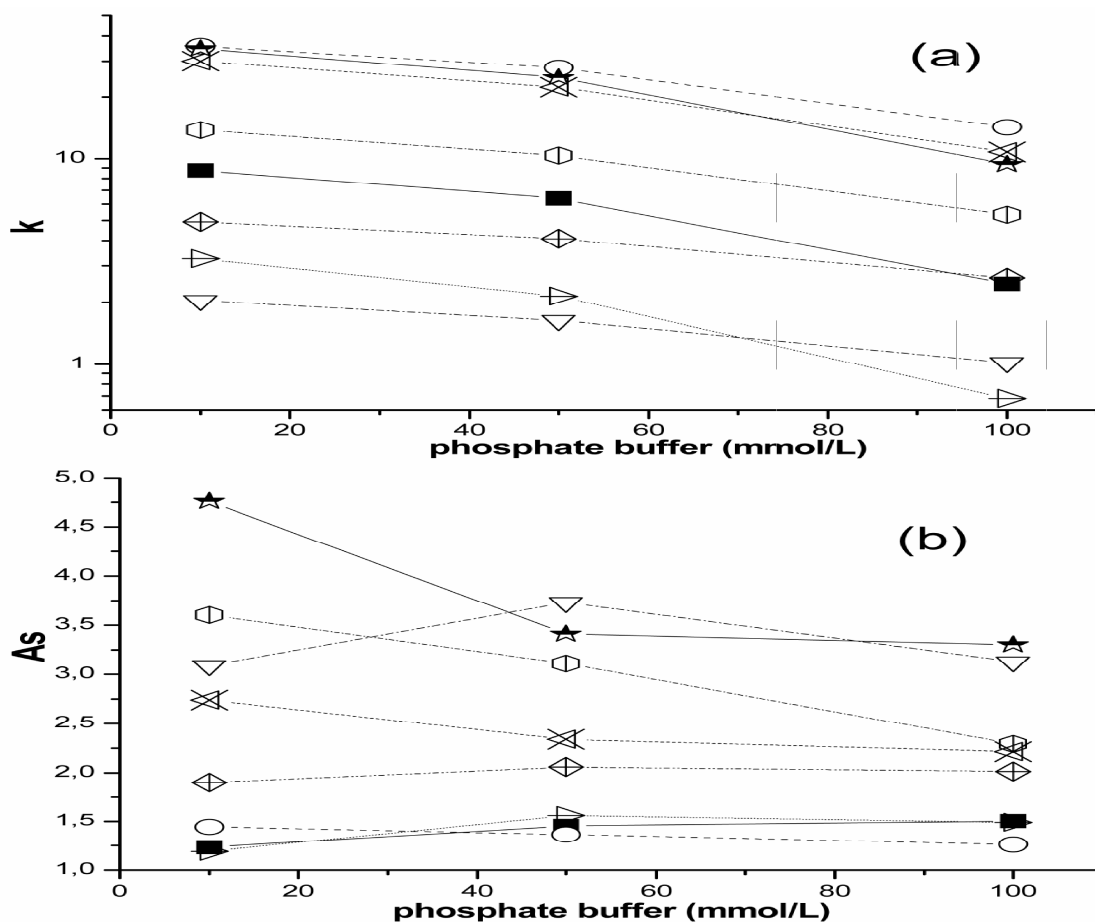
### Effect of buffer concentration

The mobile phase buffer concentration has a large impact on solute retention in ion-exchange chromatography but only a minor effect in RP-HPLC [13]. Thus it is important to examine how changes in buffer concentration can affect retention on PMOS-SiO<sub>2</sub> stationary phases. 10, 50 and 100 mmol/L phosphate buffers at pH 7 were chosen to ensure that the effect would be large enough to be detected. The mobile phases were 65:35 (v/v) methanol:phosphate buffers. Due to the high aqueous content, nortriptyline was removed from the test solute mixture.

The effects of buffer concentration on the retention factors and asymmetry factors of the test solutes are shown in Figure 5.3. For all the solutes, the retention factors decrease as the buffer concentration is increased. This confirms that ion exchange interactions contribute to retention on the PMOS-SiO<sub>2</sub> stationary phases. For some solutes increases in the buffer concentration also result in better peak shapes.

The variations in retention factors with the increase in buffer concentration are different for the various solutes. This means that when the concentration of the mobile phase additive changes, the retentions of the different solutes do not change proportionally. Thus, selectivity (band spacing) will vary as the buffer concentration is changed. The elution order of salbutamol and nicotine was

inverted as the buffer concentration increased, confirming the influence of the ion exchange mechanism for the PMOS-SiO<sub>2</sub> stationary phases.



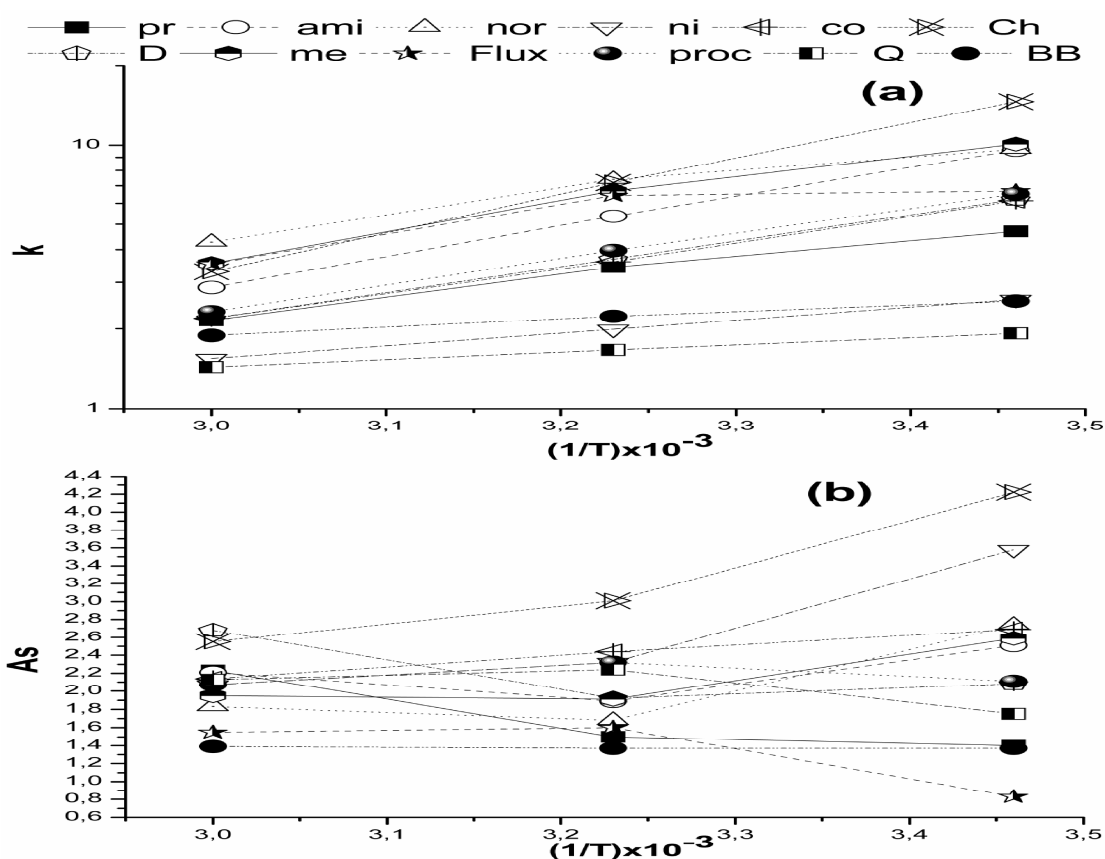
**Figure 5.3:** Effects of buffer concentration on: a) retention factors and b) asymmetry factors for basic solutes versus phosphate buffer concentration in mmol/L at pH 7. Note that the retention factor scale is logarithmic.. Solute identifications are in Figure 5.1. The symbols are the same as in Figure 5.2.

The non-linearity of the plots of  $\log(k)$  vs phosphate buffer concentration suggest that the three-site model proposed by Carr and co-workers [5] also applies to these PMOS-SiO<sub>2</sub> stationary phases. At a low buffer concentration, all three sites are responsible for retention, resulting in poorer peak shapes, while at higher buffer concentrations hydrophobically assisted ion-exchange interactions are suppressed, resulting in better peak shapes than at lower buffer concentrations. In both cases the principal retention mechanisms are due to the purely ion-exchange sites.



## Effect of temperature.

Temperature is a variable that presents a series of advantages in liquid phase separations, such as: reduced analysis time, reduced pressure drop, reduced asymmetry factors, modified retentions, controlled selectivities, better peak shape and improved detectivities, as well as permitting green chromatography [17-19]. Examples of how temperature can change selectivity and peak shape are shown Figure 5.4.



**Figure 5.4:** Van't Hoff plots of (a) retention factors and (b) asymmetry factors for basic and neutral solutes. Temperature is in kelvin (K). Note that the retention factor scale is logarithmic. Chromatographic conditions are in section 0. Solute identifications are in Figure 5.1.

The effects of temperature on selectivity in the temperature range from 16 to 60 °C are shown by the Van't Hoff plots in Figure 5.4a. The retention factor of the neutral test solute decreases linearly as the temperature increases, while the effect

on the retention factors of the basic solutes is not linear, indicating that more than one retention mechanism is involved, confirming the observations of the previously section.

The large variations in the retention factors with small variations in temperature are due to reduction in ion-exchange interactions as the temperature increases. Temperature changes result in large variations in selectivity. At 16 °C amitriptyline ( $k = 9.6$ ), nortriptyline ( $k = 9.7$ ) and methadone ( $k = 10.1$ ) nearly coelute. Also, codeine ( $k = 6.1$ ), diphenhydramine ( $k = 6.2$ ), fluoxetine ( $k = 6.7$ ) and procainamide ( $k = 6$ ) also nearly coelute, while propranolol ( $k = 4.7$ ) and chlorpheniramine ( $k = 14.7$ ) were well resolved from the other basic pharmaceuticals. At 40 °C amitriptyline ( $k = 5.4$ ) was well resolved from nortriptyline ( $k = 7.4$ ) and methadone ( $k = 6.7$ ), which elutes near chlorpheniramine ( $k = 7.2$ ) and fluoxetine ( $k = 6.4$ ), while codeine ( $k = 3.6$ ), diphenhydramine ( $k = 3.7$ ), procainamide ( $k = 4.0$ ) and propranolol ( $k = 3.4$ ) also elute near one another. At 60 °C amitriptyline ( $k = 2.9$ ) and nortriptyline ( $k = 4.3$ ) were well resolved, while chlorpheniramine ( $k = 3.3$ ), methadone ( $k = 3.5$ ) and fluoxetine ( $k = 3.5$ ) nearly coelute and propranolol ( $k = 2.2$ ), procainamide ( $k = 2.3$ ), codeine ( $k = 2.2$ ) and diphenhydramine ( $k = 2.2$ ) similarly elute together.

There is less effect of increased temperature on the asymmetry factors (Figure 5.4b) for the majority of the basic pharmaceuticals studied, chlorpheniramine and nicotine being exceptions that show significant decreases in asymmetry factor as the temperature increases. These results are probably due to changes in the influence of all three sites active in retention for basic pharmaceuticals on these PMOS-SiO<sub>2</sub> stationary phases.

## Conclusions

The retention mechanisms for basic solutes with the PMOS-SiO<sub>2</sub> stationary phases involve both ion-exchange due to exposed silanols and hydrophobic interactions with the C8 chain of the polysiloxane immobilized onto the silica. An increase in the pH of the mobile phase reduces the ion-exchange interactions

between the basic solute and the stationary phase, resulting in reduced retention factors. The ion-exchange retention mechanism for basic solutes with these PMOS-SiO<sub>2</sub> stationary phases confers unique selectivities for basic solutes as well as good peak shapes, observations similar to those made for other stationary phases that have significant ion-exchange contributions to retention.

The high stability of PMOS-SiO<sub>2</sub> stationary phases at near neutral pH that favor a predominant ion-exchange mechanism yield unique selectivities that make these stationary phases very promising for analysis of highly basic solutes, one of the main applications of HPLC.

## References

1. McCalley DV (2010) *J. Chromatogr. A* 1217:858-880  
[doi:10.1016/j.chroma.2009.11.068](https://doi.org/10.1016/j.chroma.2009.11.068)
2. Stadalius MA, Berus JS, Snyder LR (1988) *LC-GC* 6:494-500
3. J. Nawrocki J, Dunlap C, Li J, Zhao J, McNeff CV, McCormick A, Carr PW, (2004) *J. Chromatogr. A* 1028:1-30 [doi:10.1016/j.chroma.2003.11.052](https://doi.org/10.1016/j.chroma.2003.11.052)
4. Dai J, Yang X, Carr PW (2003) *J. Chromatogr. A* 1005:63-82  
[doi:10.1016/S0021-9673\(03\)00929-4](https://doi.org/10.1016/S0021-9673(03)00929-4)
5. Yang X, Dai J, Carr PW (2003) *J. Chromatogr. A* 996:13-31.  
[doi:10.1016/S0021-9673\(03\)00537-5](https://doi.org/10.1016/S0021-9673(03)00537-5)
6. Davies NH, Euerby MR, McCalley DV (2007) *J. Chromatogr. A* 1138:65-72.  
[doi:10.1016/j.chroma.2006.10.002](https://doi.org/10.1016/j.chroma.2006.10.002)
7. Neue UD, Phoebe CH, Tran K, Cheng Y-F, Lu (2001) *J. Chromatogr. A* 925:49-67 [doi:10.1016/S0021-9673\(01\)01009-3](https://doi.org/10.1016/S0021-9673(01)01009-3)
8. Borges EM, Silva CGA, Collins CH (2010) *Microchem. J.* 96:120-125.  
[doi:10.1016/j.microc.2010.02.005](https://doi.org/10.1016/j.microc.2010.02.005)
9. Kimata K, Iwaguchi K, Onishi S, Jinno K, Eksteen R, Hosoya K, Arki M, Tanaka N (1989) *J. Chromatogr. Sci.* 27:721-728.
10. Engelhardt H, Blay Ch, Saar J (2005) *Chromatographia Suppl.* 62:S19-S29.  
[doi:10.1007/s10337-005-0573-0](https://doi.org/10.1007/s10337-005-0573-0)
11. Rosés M, Subirats X, Bosch E (2009) *J. Chromatogr. A* 1216:1756-1775  
[doi:10.1016/j.chroma.2008.12.042](https://doi.org/10.1016/j.chroma.2008.12.042)
12. Davies NH, Euerby MR, McCalley DV (2008) *J. Chromatogr. A.* 1178:71-78.  
[doi:10.1016/j.chroma.2007.11.040](https://doi.org/10.1016/j.chroma.2007.11.040)
13. Hu Y, Yang X, Carr PW (2002) *J. Chromatogr. A.* 968:17-29.  
[doi:10.1016/S0021-9673\(02\)00754-9](https://doi.org/10.1016/S0021-9673(02)00754-9)
14. Subirats X, Bosch E, Rosé M (2009) *J. Chromatogr. A* 1216:5445-5448  
[doi:10.1016/j.chroma.2009.05.044](https://doi.org/10.1016/j.chroma.2009.05.044)
15. Roses M (2004) *J. Chromatogr. A* 1037:283-298  
[doi:10.1016/j.chroma.2003.12.063](https://doi.org/10.1016/j.chroma.2003.12.063)

16. Collins KE, Granja MLMM, Pereira Filho RG, Anazawa TA, Jardim ICSF (1997) *Chromatographia* 45:99-103. [doi:10.1016/j.microc.2010.02.005](https://doi.org/10.1016/j.microc.2010.02.005)
17. Borges EM, Bottoli CBG, Collins CH (2010) *Quim. Nova* 33:945-953. [doi:10.1590/S0100-40422010000400033](https://doi.org/10.1590/S0100-40422010000400033)
18. Heinisch S, Rocca J-L (2009) *J. Chromatogr. A* 1216:642–658. [doi:10.1016/j.chroma.2008.11.079](https://doi.org/10.1016/j.chroma.2008.11.079)
19. Vanhoenacker G, Sandra P (2006) *J. Sep. Sci.* 29:1822 – 1835. [doi:10.1002/jssc.200600160](https://doi.org/10.1002/jssc.200600160)



## **Capítulo 6: Evaluation of immobilized stationary phases. Part II: Effect of pH, temperature, buffer type and buffer concentration on stability**

### **Abstract**

The effects of mobile phase pH, temperature, buffer type and buffer concentration on the chemical and thermal stability of stationary phases prepared by thermal immobilization of poly(methyloctylsiloxane) onto silica surfaces were examined. These phases are quite stable at low pH, suggesting that the Si-C bond of the poly(methyloctylsiloxane) is less susceptible to hydrolysis. The phases are also stable at ambient temperature (23 °C) using neutral mobile phase with phosphate buffer (pH 7) and at high pH with triethylamine buffer (pH 11) and borate buffer (pH 10). With high mobile phase pH using carbonate (pH 10) and phosphate (pH 11) the phases are quite unstable. Temperature increases stationary phase degradation and at, 60 °C, phosphate at pH 7 is as aggressive as phosphate at 23 °C at pH 11. Buffer concentration has a minimal effect on stationary phase degradation indicating that these immobilized polysiloxanes phases have similar stability to the equivalent chemical bonded phases.

*Keywords:* Alkaline conditions, acidic conditions, immobilized polysiloxane, RPLC, chemical and thermal stability,

## Introduction

Chemical and thermal stability is a principal concern in stationary phase development and applications, especially when acidic or basic mobile phases and/or temperatures near 60 °C are involved. Mobile phase pH is one of the major tools in Reversed phase Liquid Chromatography (RPLC) to manipulate separations of ionizable solutes and discrete increases in temperature (20 to 60 °C) result in large variations in selectivity [1-4].

Claessens [5,6] has summarized some characteristics that should be considered with respect to the stability of chemically bonded phases:

- a) Inorganic buffers such as carbonate, phosphate and borate dissolve the silica support and degrade stationary phases more aggressively than do organic buffers such as glycine, triethylamine and 1-methylpiperidine, while carbonate is more aggressive than phosphate and phosphate is more aggressive than borate.
- b) At pH 7-10, stationary phases are more rapidly degraded by higher column temperatures than by higher buffer concentrations.
- c) Silica stationary phases are more rapidly dissolved by buffers having hard cations than those with soft cations.

Temperature is a variable that has recently received considerable attention as the use of higher temperatures in RPLC presents a series of advantages such as: reduced analysis time, reduced pressure drop, better asymmetry factors, modified retentions and selectivities, better efficiencies, and improved detectivities, as well as permitting green chromatography [2,3]. Only small variations of retention factors and selectivities are seen for small and neutral solutes, while for basic solutes those variations are significant, since the retention of basic solutes may involve ion-exchange retention mechanisms that possess enthalpies of retention greater than those from pure hydrophobic interactions [2,7,18].

Claessens [5,6] has shown that stationary phase degradation with alkaline mobile phases are due silica dissolution, while with acidic mobile phases stationary phase degradation are principally due the cleavage of the Si-C bond.

Part I of this in these series [9] has shown that stationary phases prepared by thermal immobilization of poly(methyloctylsiloxane) onto silica surfaces (PMOS-SiO<sub>2</sub>) provide unique selectivity due to a predominant ion-exchange retention mechanism for basic pharmaceuticals and that the ion-exchange interactions are increased by the usage of softer buffers such as ammonia, borate, tris, tricine and triethylamine. In this paper the thermal and chemical stabilities of these PMOS-SiO<sub>2</sub> stationary phase are evaluated at temperatures ranging from 23 °C to 60 °C using both soft and hard buffers, in neutral, alkaline and acidic mobile phases.

## Experimental

### Chemicals and reagents

The mobile phases were prepared with ultrapure water from a Millipore Direct-Q™ system (Billerica, USA). Methanol and isopropanol were from Tedia, (Fairfield, USA). Tetrahydrofuran was from J.T Baker (Phillipsburg, USA). Pentane was purchased from Merck (Darmstadt, Germany). Poly(methyloctylsiloxane) (PMOS), number-average molar mass, *M<sub>n</sub>*, 6200 and weight-average molar mass, *M<sub>w</sub>*, 16 000, was obtained from United Chemicals Technologies (Bristol, PA, USA). The potassium salts, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (98%), K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (99%) and KHCO<sub>3</sub> (99.7-100.5%) were purchased from Synth (Diadema, Brazil). Sodium borate was from Fisher (Fairlawn, USA). Triethylamine (TEA) (99%) and trifluoroacetic acid (TFA) (99.5%) were from Vetec (Duque de Caxias, Brazil). Ammonium hydroxide (28-30%) was from LabSynth (Diadema, Brazil).

The silica used was Kromasil, lot n<sup>o</sup> AT 1959, from Akzo Nobel (Bohus, Sweden), with 5 µm particle size, 11.1 nm pore size and 313 m<sup>2</sup>/g specific surface area. Kromasil is a type B silica that has only a small amount of contaminant metals.

The test solutes were: uracil (98%), HPLC grade toluene from Tedia, amitriptyline hydrochloride (ami) (99%) from Aldrich (Milwaukee, USA) and



nortriptyline hydrochloride (nor) (98%) and (-)-nicotine (ni) (98-100%) from Aldrich (Steinheim, Germany).

## **Preparation of the stationary phases**

Two stationary phases were prepared using different amounts of PMOS (g PMOS/g silica), and different times (hours) and temperatures (°C) of thermal treatment. The stationary phases used in this study, SP4 and SP5, had 20% and 30%, respectively, of PMOS effectually immobilized onto the silica surface. More details are presented in part I [9].

## **Mobile phase preparation**

All mobile phases were prepared volumetrically. The pH were measured in the aqueous phase with a calibrated pHmeter, Qualxtron model 8010 (Jundiaí, Brazil), before the addition of organic modifier. Low pH adjustments were made with hydrochloric acid, while potassium hydroxide solutions were used to adjust the pH for all basic buffers.

## **Stability evaluations**

Column stability tests were performed using a modular HPLC system from Shimadzu equipped with a LC-10AD LC pump, a SPD-10A UV-Vis detector, a CTO-10AS column oven, a SIL-10AD automatic injector and a SCL-10A system controller. Data were acquired and processed using the CLASSVP program (Shimadzu). The columns under test were continuously purged with fresh mobile phase, not recycled, at 0.5 mL/min. Detection was at 254 nm.

Throughout this work the mobile phase volume that passed through the column is expressed in column volumes ( $V_c$ ), calculated from the retention volume of an unretained solute (uracil). For the columns used in this work  $V_c$  is  $\sim 0.50$  mL. The effects of highly alkaline mobile phases at ambient temperature were evaluated using PMOS-SiO<sub>2</sub> stationary phase SP5 (30 %PMOS) with four highly alkaline mobile phases: 50:50 (v/v) methanol:phosphate buffer (pH 11; 20 mmol/L), 50:50 (v/v) methanol:phosphate buffer (pH 12; 20 mmol/L), 80:20 (v/v) methanol:phosphate buffer (pH 12; 20 mmol/L) and 50:50 (v/v) methanol:triethylamine buffer (pH 11.5; 20 mmol/L). The tests were carried out at 23 °C and the test solutes used were toluene (T), nicotine (ni) and amitriptyline (ami).

The effects of pH and temperature with phosphate buffers were evaluated for PMOS-SiO<sub>2</sub> stationary phase SP4 (20 %PMOS) using two different phosphate buffered mobile phases: 65:35 (v/v) methanol:phosphate buffer (pH 7; 20 mmol/L) at 23 °C, 40 °C and 60 °C, and 65:35 (v/v) methanol:phosphate buffer (pH 11; 20 mmol/L) at 23 °C and 40 °C. The test solute was amitriptyline.

The effects of buffer concentrations, pH and temperature for ammonia and triethylamine were evaluated using PMOS-SiO<sub>2</sub> stationary phase SP4 with three mobile phases: 65:35 (v/v) methanol-triethylamine (pH 11.5; 20 mmol/L) at 23 °C and 60 °C, 65:35 (v/v) methanol:triethylamine (pH 11.5; 180 mmol/L) at 23 °C and 65:35 (v/v) methanol:ammonia (pH 10.5; 20 mmol/L) at 60 °C. The test solute was amitriptyline.

The effects of carbonate and borate buffers were evaluated using PMOS-SiO<sub>2</sub> stationary phase SP4 using two mobile phases: 65:35 (v/v) methanol:borate buffer (pH 10; 5 mmol/L) and 65:35 (v/v) methanol:carbonate buffer (pH 10; 5 mmol/L). Both buffers were used at 23 °C, 40 °C and 60 °C. The test solute was amitriptyline.

Stability at low pH was evaluated for PMOS-SiO<sub>2</sub> stationary phase SP4 using 50:50 (v/v) methanol-1% trifluoroacetic acid mobile phase at 60 °C. The test solutes were toluene and nortriptyline.

## Software

All graphs were constructed using OriginPro 7.5 SRO v7.5714(B714), (Northampton, USA).

## Results and discussion

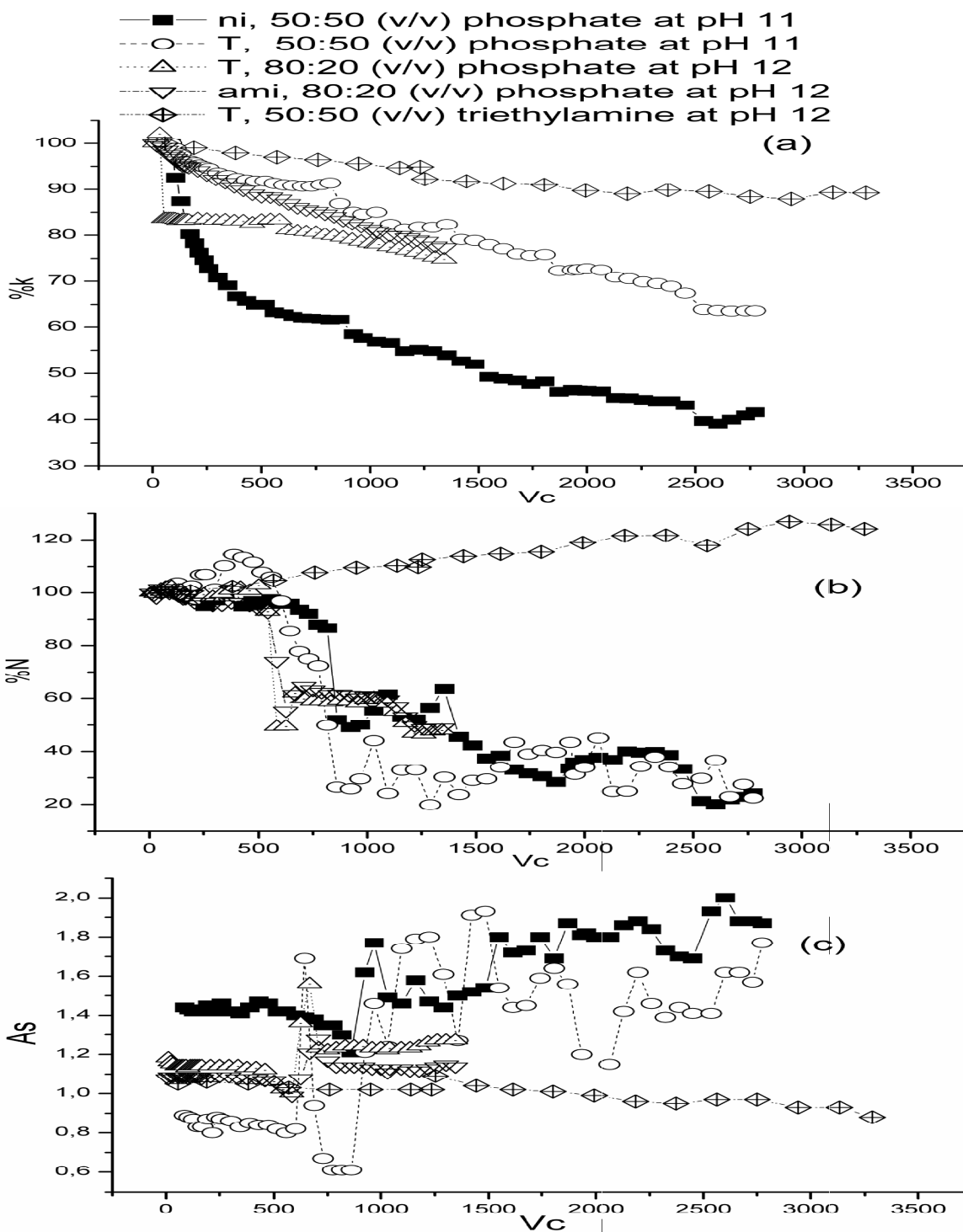
The effects of percent organic modifier, mobile phase pH, buffer type and buffer concentration on stationary phase degradation were measured by variations in retention factors, efficiencies and asymmetry factors of the basic test solutes.

### Effect of highly alkaline mobile phases at ambient temperature.

The PMOS-SiO<sub>2</sub> stationary phase SP5 presents the highest %C of the stationary phases prepared in this study and, for this reason, it was evaluated with highly alkaline mobile phases as shown in Figure 6.1.

The test carried out with 50:50 (v/v) methanol:phosphate buffer at pH 11 and 23 °C causes a rapid retention factor loss for the basic solute nicotine (ni), with a 45% loss after only 400 Vc. After this, the retention falls more slowly and closely parallels the decrease in that of toluene. The latter compound had only a 30% loss in retention factor by the end of the test. The efficiencies of both test solutes fall rapidly, 50% of their efficiencies have been lost by 800 Vc and 70% by the end of the test (2750 Vc). Surprisingly, the asymmetry factors remain in a acceptable range through out the test.

As expected, the test carried out with 50:50 (v/v) methanol:phosphate at pH 12 and 23 °C was even more aggressive than the test at pH 11. After the passage of 800 Vc the back pressure of the column increased from 45 bar to more than 400 bar, when the test was stopped.



**Figure 6.1:** The effects of highly alkaline mobile phases at 23 °C on the stability of high carbon content PMOS-SiO<sub>2</sub> stationary phase SP5 (30% PMOS). Percent variation of a) retention factor, b) efficiency and c) asymmetry factor as functions of the passage of 50:50 (v/v) and 80:20 (v/v) methanol:buffered mobile phases. The test solutes were nicotine (ni), toluene (T) and amitriptyline (ami)

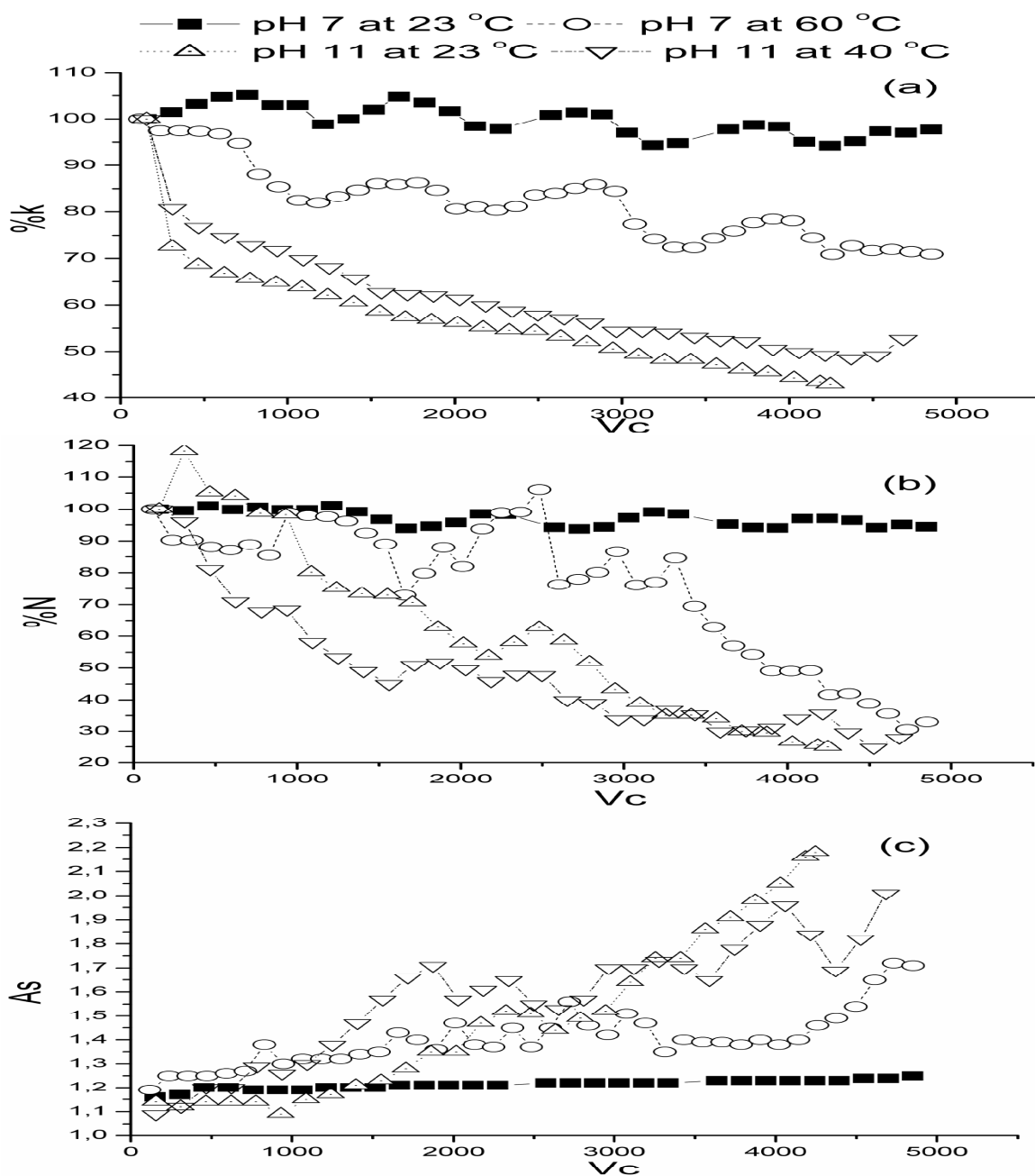
The test done with 80:20 (v/v) methanol:phosphate buffer at pH 12 and 23 °C was less aggressive than the test with 50% aqueous phase due to the reduced solubility of silica in a mobile phase with a higher amount of methanol. The effects of mobile phase passage on the retention factors, asymmetry factors and efficiencies were quite significant with amitriptyline but less significant with toluene. On the other hand, the test done 50:50 (v/v) methanol:triethylamine buffer (pH 11.5; 20 mmol/L) causes only a ~10% decrease in the retention and asymmetry factors, while the efficiency for toluene was actually slightly better at the end of the test than at the beginning.

The tests conducted at pH 11 and 12 with phosphate buffer show that highly alkaline mobile phases prepared with phosphate are not suitable to be used with PMOS-SiO<sub>2</sub> stationary phases due to silica dissolution and polymer loss. On the other hand, a highly alkaline mobile phase did not provide better separations with basic pharmaceuticals than did analyses carried out with phosphate at pH 7 [9]. In contrast, good peak shape, selectivity and stability were observed with triethylamine buffer at pH 11.5, as previously reported for bonded stationary phases by Claessens [5,6].

### **Effects of pH and temperature with phosphate buffers.**

Temperature and pH are both variables that affect selectivities for basic solutes, and both high pH mobile phases and higher temperatures rapidly degrade stationary phases, as shown in Figure 6.2. A test carried out at 23 °C using 65:35 (v/v) methanol:phosphate buffer at pH 7 did not cause any loss in retention, efficiency or asymmetry. A test carried out using the same pH 7 mobile phase at 60 °C resulted in a 25% retention loss, 80% efficiency loss and an increase in the amitriptyline asymmetry factor from 1.2 to 1.6. A test carried at 23 °C using phosphate buffer at pH 11 resulted in retention losses of 50%, efficiency losses of 80% and an amitriptyline asymmetry factor increase from 1.2 to 2.3. Slightly faster degradation occurs at 40 °C than at 23 °C. These results reinforce the impression

that phosphate buffered mobile phases should not be used at pH 11 or at temperatures of 60 °C or higher even at pH 7.



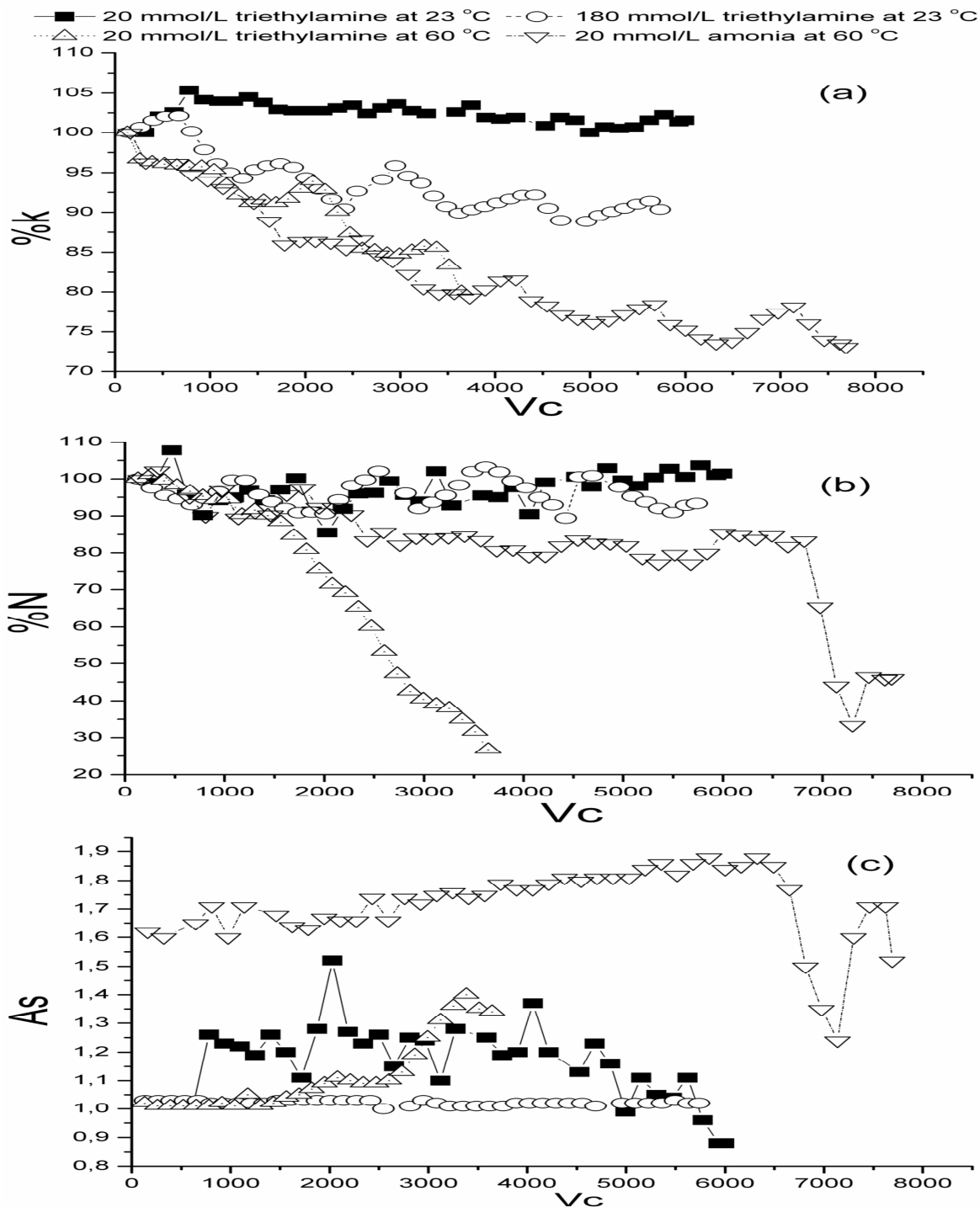
**Figure 6.2:** The effects of pH at higher temperatures using PMOS-SiO<sub>2</sub> stationary phase SP4 (20% PMOS). Percent variation of a) retention factor, b) efficiency and c) asymmetry factor as functions of the passage of 65:35 (v/v) methanol:phosphate buffered mobile phases. The test solute was amitriptyline (ami)

### ***Effects of ammonia and triethylamine buffer concentrations, pH and temperature.***

The effect of mobile phase pH and buffer type were evaluated using pH 10.5 ammonia and pH 11.5 triethylamine buffered mobile phases (Figure 6.3). The effect of buffer concentration was evaluated using 5 mmol/L and 180 mmol/L triethylamine mobile phases, while the effect of temperature was studied with triethylamine mobile phases at 23 °C and 60 °C.

The test carried out at 23 °C using 65:36 (v/v) methanol:triethylamine buffer at pH 11.5 caused only a 20% loss in retention factor, while efficiency and the asymmetry factor were unchanged up to the end of the test. When the same mobile phase was used at 60 °C, a 25% retention factor loss, an 80% efficiency loss and an increase in amitriptyline asymmetry factor from 1.0 to 1.3 was seen. A test carried out using a triethylamine concentration of 180 mmol/L at 23 °C caused a 10% retention loss and the efficiency and asymmetry factor were unchanged up to end of the test. The test carried out at 23 °C using 65:36 (v/v) methanol:ammonia buffer at pH 10.5 resulted in a 20% retention factor loss while the efficiency and asymmetry factor were unchanged up to the passage of 6500 Vc. After this volume the retention factor continued its slow decrease, indicating that the polymer was still present, but both the efficiency and asymmetry factor behaved erratically, suggesting some silica loss.

A temperature effect was again observed since tests carried out at 60 °C show some stationary phase degradation, while little stationary phase degradation was observed when the tests were carried out at 23 °C.



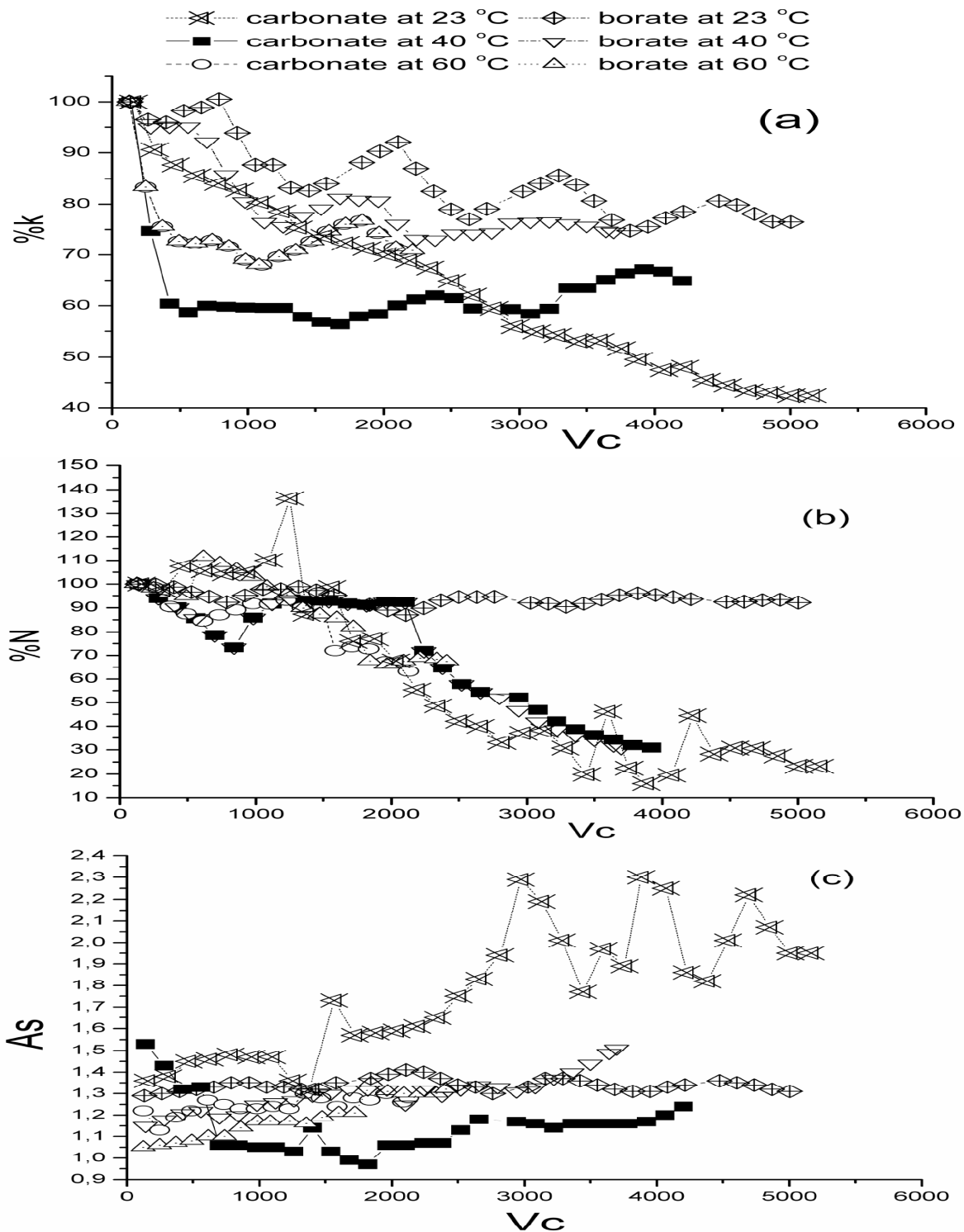
**Figure 6.3:** The effect of ammonia and triethylamine buffer concentrations, pH and temperature using PMOS-SiO<sub>2</sub> stationary phase SP4. Percent variation of a) retention factor, b) efficiency and c) asymmetry factor as functions of the passage of 65:35 (v/v) methanol:buffered mobile phases. The test solute was amitriptyline (ami).



## Effects of carbonate and borate buffers.

Claessens [5,6] showed that carbonate is more aggressive than phosphate and that both are much more aggressive than borate for chemically bonded phases. These results are confirmed in the present work. In addition the combined effects of temperature and buffer type were evaluated.

As shown in Figure 6.4 the tests carried out at 23 °C and 40 °C were carried out until the passage of 5000 Vc and 4000 Vc, respectively, while the test at 60 °C was stopped after 2500 Vc due to the column pressure increase. The tests carried out at 23 °C, 40 °C and 60 °C with methanol-borate buffer at pH 10 resulted in 25%, 30% and 30% retention factor losses, 10%, 70% and 35% efficiency losses and no significant variation in amitriptyline asymmetry factors. The tests carried out with carbonate mobile phases at 23 °C, 40 °C and 60 °C resulted in a 60%, 40% and 30% retention factor losses, 85%, 85% and 40% efficiency losses and increases in the amitriptyline asymmetry factors from 1.1 to 2.3. These results can be compared with those obtained with phosphate buffer (Figure 6.2), which causes a similar efficiency loss (85%) and a higher retention factor loss (65%) after the passage of 400 Vc



**Figure 6.4:** The effect of carbonate and borate buffers at several temperatures on PMOS-SiO<sub>2</sub> stationary phase SP4. Percent variation of a) retention factor, b) and efficiency c) asymmetry factor as functions of the passage of 65:35 (v/v) methanol:buffered mobile phases. The test solute was amitriptyline (ami)

## Stability at low pH.

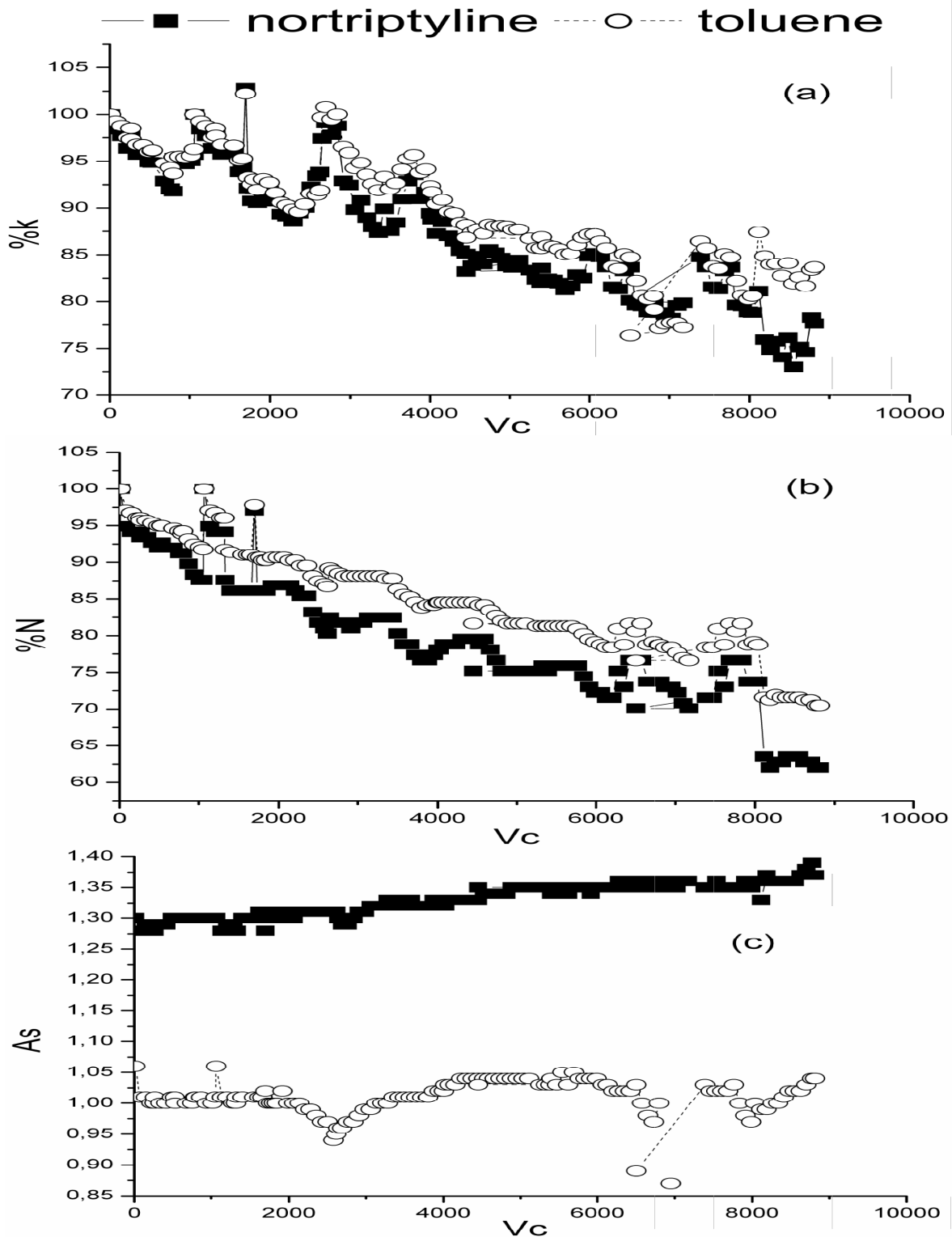
The PMOS-SiO<sub>2</sub> stationary phases present good peak shape in acidic mobile phases as do other stationary phases prepared by the immobilization of polysiloxanes onto silica surfaces [22,11]. The results of the low pH stability tests with TFA are shown in Figure 6.5, showing slow efficiency and retention factor losses for both toluene and nortriptyline, while the asymmetry factors of both test solutes were unchanged during the test.

The good stabilities presented for the PMOS-SiO<sub>2</sub> stationary phases at low pH and at 60 °C are probably due to the fact that the cleavage of Si-C bond in PMOS is more difficult than in chemically bonded phases due to steric hindrance while silica is highly stable in most acidic media.

## Conclusions

The PMOS-SiO<sub>2</sub> stationary phases are quite stable in acidic mobile phase even at 60 °C. These stationary phases also present high stability with highly alkaline mobile phases using ammonia, triethylamine and borate buffers and in neutral mobile phase using phosphate buffer at ambient temperature but are unstable in alkaline mobile phases even at ambient temperature using phosphate and carbonate buffers. Higher temperatures (60 °C) accelerate stationary phase degradation much more than buffer concentration.

Even though PMOS-SiO<sub>2</sub> stationary phase have poor stabilities in alkaline mobile phases using phosphate or carbonate buffers, the unique selectivities of these phases are enriched using mobile phases buffered with soft buffers such as tricine, tris, ammonia and triethylamine [9]. The use of mobile phases buffered with soft amino buffers gives these phases a unique selectivity and high stability as well as providing compatibility with mass spectrometric detectors, making them very promising for basic pharmaceutical analyses.



**Figure 6.5:** Stability at low pH using PMOS-SiO<sub>2</sub> stationary phase SP4. Percent variation of a) retention factor, b) efficiency and c) asymmetry factor as functions of the passage 50:50 (v/v) methanol:0.1% trifluoroacetic acid mobile phase at 60 °C. The test solutes were toluene (T) and nortriptyline (nor).

## References

1. McCalley DV (2010) *J. Chromatogr. A* 1217:858–880. doi:10.1016/j.chroma.2009.11.068
2. Borges EM, Bottoli CBG, Collins CH (2010) *Quim. Nova* 33:945-953. doi:10.1590/S0100-40422010000400033
3. Vanhoenacker G, Sandra P (2006) *J. Sep. Sci.* 29:1822 – 1835. doi:10.1002/jssc.200600160
4. Engelhardt H, Blay Ch, Saar J (2005) *Chromatographia Suppl.* 62:S19-S29. doi:10.1007/s10337-005-0573-0
5. Claessens HA (2001) *Trends Anal. Chem.* 20:563-583. doi:10.1016/S0165-9936(01)00098-X
6. Claessens HA, van Straten MA (2004) *J. Chromatogr. A* 1060:23–41. doi:10.1016/j.chroma.2004.08.098
7. Teutenberg T (2009) *Anal. Chim. Acta* 643:1–12. doi:10.1016/j.aca.2009.04.008
8. Heinisch S, Rocca J-L (2009) *J. Chromatogr. A* 1216:642–658. doi:10.1016/j.chroma.2008.11.079
9. Borges EM, Collins CH Part I, *Chromatographia*, Submitted.
10. Maldaner L, Jardim ICSF, Lourenço J, Fioravanti LMA, Collins CH (2010) *J. Sep. Sci.* 33:2917-2929. doi:10.1002/jssc.201000313
11. Maldaner L, Jardim ICSF (2010) *Chromatographia* 72:617-626. doi:10.1365/s10337-010-1726-3

## **Capítulo 7: Characterization of several stationary phases prepared by thermal immobilization of poly(methyltetradecylsiloxane) onto silica surfaces.**

### **Abstract**

Variations of a thermal immobilization procedure using poly(methyltetradecylsiloxane) and silica produced fourteen stationary phases with carbon contents of 4 to 18%. The stationary phases were chromatographically evaluated with the Engelhardt, SRM 870 and Tanaka tests. Classifications using USP and Euerby procedures indicate that the new immobilized phases are different from most commercial phases although there was some similarity with phases that have high ion-exchange interactions. The retention mechanism involved in the separation of basic solutes on several of the new stationary phases was studied by varying pH, type of Lewis base and the ionic strength of the eluent. The separations are strongly influenced by the chemistry of the accessible free silanols. The stationary phases present good selectivity at intermediate pH where the basic analytes were protonated, suggesting use of intermediate pH for these separations. Stability tests show that the stationary phases have poor stability at very high pH, even at 23 °C, but good stability in acidic mobile phases, even at 75 °C, as expected for a immobilized polymer stationary phase.

*Keywords:* Reversed-phase stationary phases, Poly(methyltetradecylsiloxane), Silanol activity, Chemical and thermal stability, Lewis acid–base interactions, Basic solutes.

## Introduction.

Reversed-phase high performance liquid chromatography (RP-HPLC) is a well-known technique for determination of many different types of compounds having different polarities, molar masses and functionalities, such as pharmaceuticals, pesticides and petrochemicals. RP-HPLC presents several advantages [1], including the use of less noxious and less expensive mobile phases, such as solutions of methanol or ethanol with water [2,3], fast equilibration of the column after changing the mobile phase, usefulness with gradient elution, high speed analyses and good repetitivity of retention times [4].

Stationary phases are the most important component of an HPLC system and, despite the large number of phases now available, the development of new stationary phases still occupies a prominent place in the literature [5]. Most commercially available stationary phases are prepared by chemical bonding C18 or C8 groups with the silanols of bare silica. However, novel phases can provide alternative and complementary separations for many analyses that are difficult to perform with C8 or C18 stationary phases. In many instances, the elution order of solutes differs on the novel phases, thus providing enhanced selectivity for difficult-to-separate compounds. This complementary approach can aid in identification, proof of purity, and quantitation [6]. Novel phases also offer chromatographers the flexibility to use simpler mobile phases, thereby avoiding ion pair reagents, exotic buffer systems, extreme pH conditions, and complex mobile phase preparations [7].

For a number of reasons, chromatographers also want to improve chemical and thermal stability, and thus the longevity of their stationary phases, and to adequately and quickly develop new analysis protocols by exploring all the experimentally available parameters, especially with respect to pH and temperature [28]. However, the range of these experimentally available parameters is very narrow since with silica-based stationary phases the support dissolves in alkaline mobile phases and the use of inorganic buffers (carbonate and phosphate)

and temperatures equal to or higher than 60 °C increases the rate of dissolution [28].

Some novel phases present high chemical and thermal stability making possible the use of extreme pH mobile phases and high temperatures [9]. Ethylene-bridged hybrid stationary phases [30] from Waters and polymer-coated zirconia stationary phases from ZirChrom [33-36] must be considered when highly alkaline mobile phases are required to change the selectivity of basic solutes or for solute stability reasons, especially when elevated temperatures are necessary to reduce analysis time [9]. These novel stationary phases show very different retention mechanisms. The former shows only hydrophobic interactions, while the latter has a mixed-mode separation mechanism. Although mixed-mode retention mechanisms in RP-HPLC are usually considered to be undesirable [37], good basic solute selectivities have been shown when polymer-coated zirconia columns are optimized for mixed-mode separations involving both hydrophobic and ionic interactions. It is possible to adjust selectivity by changing the type of buffer, the pH and the ionic strength of the eluent as well as the type and amount of organic modifier.

Similar to the approach taken by ZirChrom, another alternative for the preparation of stationary phases for HPLC consists of immobilizing linear polymer molecules into the silica pore system. Polysiloxanes are ideal for this application as the apparent distance between the monomeric units is nearly optimal for multipoint adsorption of the siloxane  $[(-Si-O-)_n]$  chain onto the silica surface [16,17]. Stationary phases prepared by the immobilization of polysiloxanes onto silica have been shown to separate multiresidues of pesticides and their metabolic/degradation products (weak acids and bases), benzodiazepines and basic pharmaceuticals [16]. Similar phases have also been used for concentration and clean-up procedures using solid phase extraction [17].

The present paper describes the preparation and chromatographic evaluation of stationary phases by thermal immobilization of poly(methyltetradecylsiloxane) (PMTDS) onto silica (PMTDS-SiO<sub>2</sub>). PMTDS was chosen as Szabo et al [18] have suggested that the fourteen carbon chain, with a



length intermediate between C8 and C18, should perform separations similar to those obtained with both these phases. The PMTDS-SiO<sub>2</sub> stationary phases were evaluated initially with some classical tests such as the Engelhardt [4], SRM 870 [6] and Tanaka tests [9]. These results were compared with literature data [44-25] for commercial phases to obtain an idea of their chromatographic behavior. One of the stationary phases with intermediate carbon content was evaluated with a in-house test that evaluated the effect of different pH, buffer type and buffer concentration on retention factors and asymmetry factors of several basic solutes (hydrophobic and hydrophilic) as proposed Carr and co-workers [33-36]. The importance of the ion exchange mechanism to the retention was evaluated using mobile phases with different phosphate buffer concentrations. Their chemical and thermal stability were also evaluated at both high [28] and low [14] pH. Finally, the applicability of the PMTDS-SiO<sub>2</sub> stationary phases was compared with that of a stationary phases with the same carbon content prepared by the thermal immobilization of poly(methyloctylsiloxane) onto the same silica using both isocratic and gradient mode.

## Experimental

### *Chemicals and reagents*

The mobile phases were prepared with ultrapure water from a Millipore Direct-Q™ system (Billerica, USA). Methanol and isopropanol were from Tedia (Fairfield, USA). Tetrahydrofuran was from J.T Baker (Phillipsburg, USA). Pentane was purchased from Merck (Darmstadt, Germany).

The reagents used to prepare the mobile phases were: KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (98%), K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (99%) and KHCO<sub>3</sub> (99.7-100.5%) from Synth (Diadema, Brazil), sodium citrate tribasic dihydrate (99%) and N-(2-Hydroxy-1,1-bis(hydroxymethyl)ethyl)glycine (99%) (tricine) from Sigma, (St. Louis, USA), sodium borate was from Fisher (Fairlawn, USA), triethylamine (99%) (TEA) and

trifluoroacetic acid (99.5%) (TFA) from Vetec (Duque de Caxias, Brazil). 2-Amino-2-hydroxymethyl-propane-1,3-diol (Tris) from Mallinckrodt (Paris, France), ammonium hydroxide (28-30%) from LabSynth (Diadema, Brazil).

The silica was Kromasil, lot n<sup>o</sup> AT 1959, from Akzo Nobel (Bohus, Sweden) with 5 µm particle size, 11.1 nm pore size and 313 m<sup>2</sup>/g specific surface area. Kromasil is a type B silica that has only a small amount of contaminant metals. The polysiloxanes used were poly(methyltetradecylsiloxane), average molar mass (*M*) 9500, from Petrarch/Huls America (Piscataway, USA) and poly(methyloctylsiloxane), number-average molar mass, *M<sub>n</sub>*, 6200, and weight-average molar mass, *M<sub>w</sub>*, 16 000, from United Chemicals Technologies (Bristol, USA)

The test solutes were: uracil (98%), butylbenzene (>99%) and amitriptyline hydrochloride (99%) from Aldrich (Milwaukee, USA), benzylamine (>99%), pentylbenzene (>98%) and o-terphenyl (> 99%) from Merck-Schuchardt (Hohenbrunn, Germany), caffeine from Medley (Campinas, Brazil), phenol (>99.5%), N,N-dimethylaniline ( $\geq 98$ ) and triphenylene ( $\geq 98.0\%$ ) from Fluka (Buchs, Switzerland), aniline (99,5%) from Merck, ethyl benzoate (99%) from Carlo Erba (Milan, Italy), HPLC grade toluene from Tedia (Rio de Janeiro, Brazil), and p-ethylaniline (98%), ethylbenzene (99%), quinizarin (96%), nortriptyline hydrochloride (98%), dextromethorphan hydrobromide, (-)-nicotine (98-100%) and ( $\pm$ )-chlorpheniramine maleate salt from Aldrich (Steinheim, Germany). Codeine sulfate, diphenhydramine hydrochloride, propranolol, salbutamol sulfate and methadone were kindly donated by Dr. Marcelo Ribani from TECPAR (Curitiba, Brazil) while the benzodiazepines and fluoxetine were kindly donated by Dr. Paulo César Pires Rosa of EMS (Hortolândia, Brazil).

### ***Preparation of the stationary phases***

The PMTDS-SiO<sub>2</sub> stationary phases were prepared using different amounts of PMTDS (g PMTDS/ g silica), and different times (hours) and temperatures (°C)

of thermal treatment, as summarized Table 7.1. The general procedure for preparation of these stationary phases consists in dissolving PMTDS in 20 mL of pentane, then adding 1 g of Kromasil silica and 20 mL more of pentane. This mixture is stirred for 30 minutes at room temperature and then placed in a fume hood for evaporation of the solvent at room temperature. The dried materials are then placed individually in an oven at the specified temperature for immobilization under an air atmosphere. The PMOS-SiO<sub>2</sub> stationary phase with carbon content of 18% was prepared as described elsewhere [27]

**Table 7.1:** Percentage of PMTDS per gram of silica (%PMTDS), time (t) and temperature (T) of immobilization used to prepare the stationary phases, %C from elemental analysis, and the final percentage of PMTDS per gram of silica after thermal immobilization (%PMTDS<sub>f</sub>)

<i>Code</i>	<i>%PMTDS</i>	<i>t (hours)</i>	<i>T (°C)</i>	<i>%C</i>	<i>%PMTDS<sub>f</sub></i>
<b>SP1</b>	30	4	100	4	6
<b>SP2</b>	60	4	100	5	7
<b>SP3</b>	30	8	100	6	9
<b>SP4</b>	60	8	100	15	21
<b>SP5</b>	30	4	130	9	13
<b>SP6</b>	60	4	130	10	14
<b>SP7</b>	30	8	130	18	26
<b>SP8</b>	60	8	130	19	27
<b>SP9</b>	20	6	115	8	11
<b>SP10</b>	70	6	115	9	13
<b>SP15</b>	45	6	115	8	11
<b>SP16</b>	45	6	115	9	13
<b>SP17</b>	45	6	115	11	16
<b>SP18</b>	45	6	115	10	14

The stationary phases were slurry packed (0.8 g of stationary phase in 20 mL of 20:80 (v/v) isopropanol-tetrahydrofuran) into previously polished 50 x 4 mm columns [26] made from 316 stainless steel tubing at a constant packing pressure of 40 MPa, using a Haskel Packing Pump (Burbank, USA) with methanol as propulsion solvent. The pressure was maintained until the passage of 200 mL methanol to assure a good packing and removal of excess polysiloxanes [51]

The PMTDS-SiO<sub>2</sub> stationary phases SP1-SP10, SP15 and SP16 were packed two months after the immobilization procedure, while SP17 and SP18 were packed three months after the immobilization procedure. All columns were conditioned for at least 2 hours with mobile phase at 0.5 mL/min before the chromatographic evaluations.

### ***Physical characterization of the stationary phases.***

#### *Percent carbon*

Elemental analyses were carried out on the material recovered after the column packing with a Model CHN-2400 PerkinElmer Analyzer (Shelton, CT, USA). The final percentages of PMTDS per gram of silica after the thermal immobilization (PMTDS<sub>f</sub>) were determined using the formula %PMTDS<sub>f</sub> = (%C/0.7) since 70% of the PMTDS refers to carbon.

#### *Solid-state <sup>29</sup>Si CP-MAS NMR spectroscopy*

Solid-state <sup>29</sup>Si NMR measurements were performed on an INOVA spectrometer (Varian, Palo Alto, USA) using cross polarization and magic angle spinning (CP-MAS). The contact time and pulse interval time were 5 ms and 1.5 s, respectively. A frequency of 59.6 MHz was used. Representative samples of 200–300 mg were spun at 4 kHz using 7 mm double ZrO rotors. Typically, 1.5 k free induction decays (FIDs) with an acquisition time of 35 ms were accumulated in 1 kb data points, zero-filling to 8 kb prior to Fourier transformation. The line broadening used was 30 Hz and the spectral width for all spectra was about 25 kHz.

#### *Surface area and porosity—BET/BJH*

Full adsorption–desorption isotherms of nitrogen at –195.8 °C on dried samples were measured at various partial pressures with a Micromeritics model

ASAP-2010 apparatus (Norcross, USA). Specific surface areas ( $S_{\text{BET}}$ ) and pore-size distributions (PSD) were determined with the Brunauer–Emmett–Teller (BET) and Barret–Joyner–Hallenda (BJH) methods, respectively. BET surface areas were obtained from the adsorption data points, whereas the PSD were derived from the desorption isotherm. Prior to the BET/BJH measurements, the samples were degassed for 3 h at 120 °C in the out-gassing station of the adsorption apparatus.

### ***Mobile phase preparation***

All mobile phases were prepared volumetrically. The pH were measured in the aqueous phase with a calibrated pHmeter, Qualxtron model 8010 (Jundiaí, Brazil), before the addition of organic modifier. pH adjustments were made with hydrochloric acid solutions for organic buffers and phosphoric acid solutions for phosphate buffers, while potassium hydroxide solutions were used to adjust the pH with both kind of buffers.

### ***Chromatographic Evaluations***

All the chromatographic evaluations were performed using a modular HPLC system with a Shimadzu LC 10AD pump (Kyoto, Japan), a Rheodyne model 8120i injection valve (Cotati, USA) with 5  $\mu\text{L}$  loop, a Shimadzu CTO-10AC column oven and a Shimadzu Model SPD-10 AV UV–VIS detector. Data were processed using ChromPerfect software Justice Innovations (Mountain View, USA). All tests were conducted at a flow rate of 0.5 mL/min. Van Deemter plots obtained using naphthalene as test solute in a 70:30 (v/v) mobile phase indicated an optimal flow rate of 0.3 mL/min but as the efficiency loss due to the use of a 0.5 mL/min flow rate was inferior to 10%, chromatographic evaluations and stability tests were carried out at this slightly faster flow rate. With flow rates of 0.5 mL/min for the 50 x 3.9 mm columns used in this work the retention time of uracil is near to one minute,

which indicates a flow rate of one column volume per minute. Some analyses were also carried out at flow rates of 1.0 and 1.5 mL/min without resolution loss.

Retention factors ( $k$ ) were calculated using the relation  $k = (t_R - t_M)/t_M$ , where  $t_R$  is the retention time for the solute and  $t_M$  is the retention time of the unretained component, uracil. Asymmetry factor ( $As$ ) was calculated using the relation  $As = rw_{10\%}/lw_{10\%}$  and the USP tailing factor ( $Tf$ ) was calculated as  $w_{5\%}/2 lw_{5\%}$ , where  $rw_{10\%}$ ,  $lw_{10\%}$  and  $lw_{5\%}$  are the right width and the left width, respectively, measured horizontally from the right or left edge of the peak to a vertical line from the peak apex, at the 5% or 10% level and  $w_{5\%}$  is the total peak width at 5% of the peak height. Efficiency was calculated using  $N = 5.54(t_R/w_h)^2$ , where  $w_h$  is the peak width at 50% of the peak height.

#### *Engelhardt test [4].*

The two principal parameters, reflecting different chromatographic conditions, were: retention factor for ethylbenzene ( $k_E$ ) that reflects the surface coverage or ligand density; and asymmetry factor of p-ethylaniline ( $As_{p-E}$ ) that reflects the silanol activity.

Additionally, eleven other parameters were considered: the retention factors of phenol, aniline, p-ethylaniline, ethyl benzoate, N,N-dimethylaniline, toluene and ethylbenzene ( $k_P$ ,  $k_A$ ,  $k_{p-E}$ ,  $k_N$ ,  $k_T$  and  $k_E$ ) were used as selectivity parameters, while the asymmetry factors of aniline and N,N-dimethylaniline ( $As_A$  and  $As_N$ ), the asymmetry factor ratio between aniline and phenol ( $As_A/As_P$ ) and the retention factor ratio between aniline and phenol ( $k_A/k_P$ ) were used to measure silanol activity.

The test was carried out at a column temperature of 40 °C with a 55:45 (v/v) methanol-water mobile phase. Detection was done at 254 nm.

#### *SRM 870 test [6,25].*

The four parameters, reflecting different chromatographic conditions, were: retention factor for ethylbenzene ( $k_E$ ) that reflects the surface coverage or ligand density; tailing factor of quinizarin ( $Tf_Q$ ) that indicates activity toward metal

chelators; retention factor for amitriptyline ( $k_{ami}$ ) that reflects the ion-exchange properties of the stationary phase; and tailing factor of amitriptyline ( $Tf_{ami}$ ) that indicates silanol activity.

Additionally, six other parameters were considered: retention factors of toluene and quinizarin ( $k_T$  and  $k_Q$ ), efficiency in plates per meter of column of ethylbenzene and amitriptyline ( $N_E/m$  and  $N_{ami}/m$ ) and the asymmetry factors of quinizarin and amitriptyline ( $As_Q$  and  $As_{ami}$ ).

The test was carried out at a column temperature of 23 °C with a 80:20 (v/v) methanol-phosphate buffer (pH 7; 20 mmol/L) mobile phase. Detection was at 254 nm.

#### *Tanaka test [9].*

The six parameters, using different chromatographic conditions, were: retention factor for pentylbenzene ( $k_{PeB}$ ) that reflects the ligand density; hydrophobicity or hydrophobic selectivity ( $CH_2$ ) that is the retention factor ratio between pentylbenzene and butylbenzene and is a measure of the surface coverage of the phase as the selectivity between the alkylbenzenes differentiated by one methylene group also depends on the ligand density; shape selectivity ( $T/O$ ), the retention factor ratio between triphenylene and o-terphenyl, which is influenced by the spacing of the ligands; hydrogen bonding capacity ( $C/P$ ), the retention factor ratio between caffeine and phenol, which is a measure of the number of available silanol groups and the degree of end capping; total ion-exchange capacity ( $B/P$  7.6), the retention factor ratio between benzylamine and phenol at pH 7.6, which is an estimate of the total silanol activity; and total ion-exchange capacity ( $B/P$  2.7), which is the retention factor ratio between benzylamine and phenol at pH 2.7, an estimate of the acid activity of the silanol groups.

Additionally, five other parameters were considered: the efficiency per meter for pentylbenzene ( $N_{PeB}/m$ ), the asymmetry factors of caffeine in an unbuffered mobile phase and of benzylamine at both pH 2.7 and 7.6 ( $As_C$ ,  $As_{B2.7}$  and  $As_{B7.6}$ ), and aromatic selectivity, ( $PeB/O$ ) which is the retention factor ratio between n-

pentylbenzene and o-terphenyl. This descriptor is believed to be a measure of the aromatic selectivity, which is influenced by the density of aromatic character on the stationary phase.

The tests were carried out at a column temperature of 40 °C,  $k_{PeB}$ ,  $CH_2$ ,  $T/O$ ,  $N_{PeB}$  and  $PeB/O$  were evaluated using a 80:20 (v/v) methanol-water mobile phase.  $C/P$  and  $As_C$  were evaluated using a 70:30 (v/v) methanol-water mobile phase.  $B/P$  7.6 and  $As_{B7.6}$  were evaluated using a 70:30 (v/v) methanol-phosphate buffer (pH 7.6; 20 mmol/L) mobile phase.  $B/P$  2.7 and  $As_{B2.7}$  were evaluated using a 70:30 (v/v) methanol-phosphate buffer (pH 2.7; 20 mmol/L) mobile phase. Detection was at 254 nm.

### ***Effect of mobile phase pH and buffer type on retentions and asymmetry factors.***

The retention factors and asymmetry factors of nine basic solutes were evaluated using 80:20 (v/v) methanol-buffer solutions. For pH 6, 7, 8, 11 phosphate buffers were used, for pH 8.5, Tris buffer, for pH 9 and 10 borate buffer, for pH 10.5 ammonium buffer and for pH 11.5 triethylamine buffer. The buffer solutions were 20 mmol/L, except for the borate buffers that were 5 mmol/L. The test was carried out at a column temperature of 23 °C. Detection was at 220 nm.

### ***Effect of buffer concentration***

The retention factors and asymmetry factors of eight basic solutes were evaluated using 65:35 (v/v) methanol-buffer solutions at pH 7 at concentrations of 10 mmol/L, 50 mmol/L and 100 mmol/L. The analyses were performed at 23 °C. Detection was at 220 nm.



## ***Stability evaluations***

The column stability tests were performed using a modular HPLC system from Shimadzu equipped with a LC-10AD LC pump, a SPD- 10A UV-Vis detector, a CTO-10AS column oven, a SIL-10AD automatic injector and a SCL-10A system controller. Data were acquired and processed using the CLASSVP program (Shimadzu). The columns under test were continuously purged with fresh mobile phase, not recycled, at 0.5 mL/min.

Throughout this work the mobile phase volume that passed through the column is expressed in column volumes ( $V_c$ ), as is commonly done in the literature. The column volume was calculated from the retention volume of an unretained solute (uracil). For the columns used in this work  $V_c$  is 0.50 mL. The PMTDS-SiO<sub>2</sub> column used for the stability tests was SP 7.

### *Acidic mobile phase*

The acid test was done using 50:50 (v/v) methanol-0.2% trifluoroacetic acid mobile phase at 75 °C. The test solutes were toluene, ethylbenzene and propranolol.

### *Basic mobile phase.*

The basic test was done using 65:35 (v/v) methanol-phosphate buffer (pH 11; 20 mmol/L) mobile phase at 23 °C. The test solutes were toluene, ethylbenzene and amitriptyline.

## ***The applicability of some PMTDS-SiO<sub>2</sub> stationary phases***

The gradient separations were performed using a modular HPLC system from Shimadzu LC having a 10AT VP pump, SIL-10AF auto injector, a CTO-10AS VP column oven, a SPD-M10A VP diode array detector and a SCL-10A VP system

controller. The solvents were degassed with a DGU-2A degasser using helium at 50 kPa. The amounts of each solvent were determined by a FCV-10AL VP programmer. Data were processed using Class VP software. All tests were conducted at a flow rate of 0.5 mL/min.

### ***Data analysis***

Hierarchical cluster analyses (HCA) were performed using Pirouette Version 3.11 from Infometrix, Inc. (Woodinville, USA). The data from the present study were combined with the data from Euerby et al. [46] and from The United States Pharmacopeia [25]. To give all variables the same importance, they were “auto scaled”, i.e., the average was subtracted from each variable and each variable was divided by its standard deviation, before applying the HCA. For the HCA, Euclidian distances and centroid linkages were used. All graphs were constructed using OriginPro 7.5 SRO v7.5714(B714) (Northampton, USA). The correlations and basic statistics were calculated with STATISTICA 6.0 from STatSoft (Tulsa, USA).

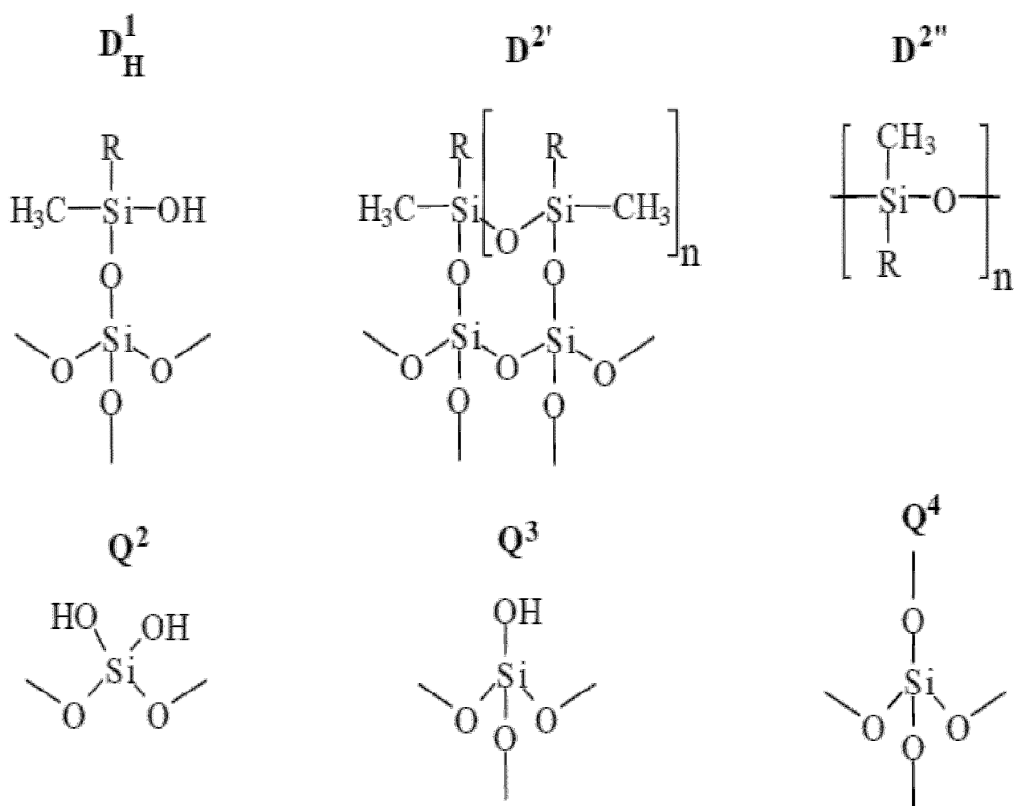
## **Results and discussion**

### ***Physical characterizations of the stationary phase***

As shown in Table 7.1 the use of a larger amount of PMTDS, longer times and/or higher temperatures of immobilization lead to larger amounts of PMTDS being immobilized onto the silica. The carbon content (%C) were higher than those obtained for zirconized [30] and titanized Kromasil silica [31] and similar to that obtained with unmodified Kromasil silica [32] for similar PMTDS loadings.

The  $^{29}\text{Si}$  NMR spectra of SP7 and SP8 (data not shown) indicate the existence of  $\text{D}^1_{\text{H}}$ ,  $\text{D}^2$  and  $\text{D}^2$  groups from PMTDS on  $\text{PMTDS-SiO}_2$  stationary phase and  $\text{Q}^2$ ,  $\text{Q}^3$  and  $\text{Q}^4$  from silica.  $\text{Q}^2$  indicates geminal silanols, the  $\text{Q}^3$  signals are isolated or vicinal silanols and  $\text{Q}^4$  are tetrasiloxane in the silica backbone. A

$D^1_H$  signal represents the breaking of some Si–O–Si bonds of the siloxane chain during the thermal immobilization processes,  $D^{2'}$  indicates that the PMTDS chains are loosely attached to or physically adsorbed onto the silica, while  $D^{2''}$  represents chemical bonding between the PMTDS and the silica surface [33,34]. The  $D^1_H$ ,  $D^{2'}$ ,  $D^{2''}$ ,  $Q^2$ ,  $Q^3$  and  $Q^4$  groups mentioned here are shown in Figure 7.1. The NMR spectra confirm the presence of some bonds linking the polysiloxane to the silica surface [34].



**Figure 7.1:** Different silicon species occurring in the PMTDS-SiO<sub>2</sub> stationary phases, R = C<sub>14</sub>H<sub>29</sub>.

Comparison of some textural and physical-chemical properties of Kromasil silica with those of SP8, which is the PMTDS-SiO<sub>2</sub> stationary phase with the highest %C, indicate significantly reduced surface area (301 to 87 m<sup>2</sup>/g) and pore volume (0.85 to 0.24 cm<sup>3</sup>/g) while the mean pore diameter was almost unchanged (11.2 to 10.8 nm).

## Chromatographic evaluations

### Engelhardt test.

The results of the Engelhardt test are shown in **Table 7.2**. The retention factors of the poorly retained test solutes aniline and phenol and the asymmetry factors of the basic test solutes (aniline, p-ethylaniline and N,N-dimethylaniline) had no correlation with the other test parameters, while the retention factors of the retained test solutes (ethyl benzoate, toluene and ethylbenzene, N,N-dimethylaniline and p-ethylaniline) were highly correlated, results that are in concordance with the work of Schmitz et al. [5]. On the PMTDS-SiO<sub>2</sub> stationary phase ethyl benzoate elutes after N,N-dimethylaniline, while toluene elutes before N,N-dimethylaniline, as usually observed for immobilized polymer phases [5].

Table 7.2: Data obtained with the Engelhardt test for some PMTDS-SiO<sub>2</sub> stationary phases.

SP	$k_P$	$k_{EB}$	$k_T$	$k_E$	$k_A$	$k_{p-E}$	$k_N$	$As_A$	$As_{p-E}$	$As_N$	$As_A/As_P$	$k_A/k_P$	$(N_E/m) \times 10^{-3}$
1	0.1	1.2	2.1	3.7	0.3	1.0	1.9	2.6	5.9	3.2	1.5	2.5	55
2	0.1	1.3	2.3	4.0	0.3	0.8	1.7	1.9	3.1	1.7	0.9	2.0	47
3	0.1	1.4	3.0	5.3	0.3	1.1	2.1	2.0	2.2	3.0	1.2	2.9	13
4	0.7	4.9	9.8	17.3	0.8	2.3	5.7	2.7	4.3	1.4	1.7	1.2	36
5	0.5	3.6	6.9	12	0.6	1.5	3.5	1.8	1.3	0.9	1.3	1.1	22
6	0.5	3.5	6.6	11.6	0.6	1.6	3.6	2.3	2.0	1.2	1.2	1.1	30
7	0.5	4.0	8.6	15.2	0.6	1.9	4.8	2.0	3.0	1.2	1.3	1.3	37
8	0.6	4.8	9.6	16.8	0.8	2.7	5.9	3.1	4.5	1.1	2.3	1.3	74
9	0.2	1.8	3.5	6.2	0.3	0.9	2.1	1.5	1.6	1.2	0.7	1.4	49
10	0.3	2.4	4.5	8.0	0.4	1.2	2.6	1.9	2.2	1.5	1.3	1.2	27
15	0.5	2.8	5.1	9.0	0.6	1.5	3.2	1.6	2.4	1.4	1.4	1.3	20
16	0.3	2.4	4.5	8.0	0.4	1.2	2.7	1.7	1.8	1.1	1.3	1.4	19
17	0.5	3.1	5.8	10.2	0.8	1.9	3.8	1.6	1.8	1.1	1.2	1.6	20
18	0.3	2.4	4.6	8.1	0.6	1.5	3.2	2.2	2.2	1.4	1.5	1.9	19

When aniline is more retained than phenol, it indicates that the stationary phase strongly interacts with basic solutes. Also, the asymmetry of the aniline peak divided by that of phenol should be less than 1.3. Engelhardt and Jungheim [3] explain that calculating the ratio of asymmetries allows being independent of the extra-column effects that can alter peak width and that aniline should elute after phenol.

With all the PMTDS-SiO<sub>2</sub> stationary phases aniline elutes after phenol and the ratio  $A_{sA}/A_{sP}$  was near to 1.3, except for SP8. The asymmetry factors of p-ethylaniline were smaller than 2.5, showing intermediate silanol activity, except for SP1 and SP8, which had the lowest and the highest %C. N,N-dimethylaniline presents good peak shapes for PMTDS-SiO<sub>2</sub> stationary phases, except for SP1 and SP3, while aniline presents poor peak shapes with all the phases, possibly due to an extra-column effect, as it elutes very close to the dead time.

#### SRM 870 test.

The results of the SRM 870 test are shown in Table 7.3. The PMTDS-SiO<sub>2</sub> stationary phases prepared with smaller amounts of PMTDS and lower times and temperatures of immobilization had hydrophobicity ( $k_E$ ) lower than the lower quartile of the commercial phases ( $k_E < 1.3$ ), while phases prepared with higher amounts of PMTDS and longer times and higher temperatures of immobilization had hydrophobicity higher than the upper quartile of commercial phases ( $k_E > 2.2$ ).

**Table 7.3:** Data obtained with the SRM 870 test for some PMTDS-SiO<sub>2</sub> stationary phases.

SP	$k_T$	$k_E$	$A_{sQ}$	$k_Q$	$A_{sami}$	$k_{ami}$	$(N_E/m) \times 10^3$	$(N_{ami}/m) \times 10^3$	$Tf_{ami}$	$Tf_Q$
1	0.3	0.5	1.4	0.9	1.5	7.8	41	39	1.2	1.3
2	0.4	0.6	1.6	1.1	1.5	7.4	28	30	1.3	1.3
3	0.5	0.7	1.3	1.0	1.5	8.2	12	7	1.3	1.1
4	1.4	2.0	1.5	4.1	1.3	22.6	27	9	1.1	1.3
5	0.8	1.2	1.2	2.0	1.1	10.5	42	32	0.9	1.1
6	0.9	1.3	1.4	2.2	1.3	13.0	31	22	1.2	1.3
7	1.7	2.4	1.2	4.3	1.0	26.9	49	22	1.0	1.1
8	1.9	2.6	1.3	4.7	1.2	28.0	43	13	1.1	1.2
9	0.7	1.1	1.5	1.8	1.2	11.3	37	32	1.0	1.3
10	0.8	1.2	1.6	2.2	1.2	16.6	28	23	1.1	1.4
15	0.8	1.1	1.5	2.1	1.3	15.4	35	32	1.1	1.3
16	0.9	1.2	1.2	2.1	1.2	15.7	43	35	1.1	1.2
17	1.0	1.4	1.2	2.4	1.2	18.7	48	31	1.0	1.2
18	0.9	1.3	1.3	2.3	1.2	17.3	39	27	1.2	1.3

With PMTDS-SiO<sub>2</sub> stationary phases the retention factors of all the test solutes were highly related but presented large variations, measured as relative standard deviation (RSD). As expected, those stationary phases with high %C

were highly retentive for amitriptyline while even the PMTDS-SiO<sub>2</sub> stationary phases with lower %C had retention factors for amitriptyline higher than the upper quartile of commercial phases ( $k_{ami} > 7.5$ ). SP4, SP7 and SP8, with high %C, were more retentive for amitriptyline than the most retentive commercial phases, Alltima HP C18 AQ and Prevail C10, both from Grace Davison, and Aquasil C18 from Thermo Science, on the USP test [25]. The high retention for amitriptyline and the different %C with PMTDS-SiO<sub>2</sub> stationary phases were not reflected in the asymmetry factors of quinizarin and amitriptyline, which are smaller than the lower quartile of commercial stationary phases ( $As_Q < 1.5$  and  $As_{ami} < 2.5$ , respectively).

#### Tanaka test.

The results obtained with the Tanaka test are shown in Table 7.4. With most of the PMTDS-SiO<sub>2</sub> stationary phases, caffeine elutes after phenol with **C/P** values between 1.4 and 2, independent of the %C, and benzylamine elutes after phenol at pH 7.6, with **B/P 7.6** values between 8 and 11, also independent of the %C. On SP8 caffeine elutes before phenol and this phase also presents the highest **B/P 7.6** value (24.8). The PMTDS-SiO<sub>2</sub> stationary phases with higher %C present higher  $k_{PeB}$ , while **T/O**, **CH<sub>2</sub>** and **B/P 2.7** were similar for all the stationary phases

**Table 7.4:** Data obtained with the Tanaka test for some PMTDS-SiO<sub>2</sub> stationary phases.

<b>SP</b>	$k_{PeB}$	<b>CH<sub>2</sub></b>	<b>T/O</b>	<b>C/P</b>	<b>B/P 7.6</b>	<b>B/P 2.7</b>	$(N_{PeB}/m) \times 10^3$	<b>PeB/O</b>	$A_{sC}$	$A_{sB} 7.6$	$A_{sB} 2.7$
<b>7</b>	6.3	1.6	1.6	1.4	10.9	0.0	59	1.0	0.6	2.2	3.6
<b>8</b>	8.7	1.8	1.8	0.5	24.8	0.0	59	1.0	1.6	4.6	2
<b>9</b>	2.7	1.4	1.5	2.0	7.4	0.0	48	1.0	1.4	1.8	3.4
<b>10</b>	3.1	1.4	1.6	1.8	9.9	0.0	29	0.9	1.5	1.5	2.7
<b>15</b>	3.0	1.4	1.5	1.6	9.1	0.0	51	1.0	1.4	2.8	1.5
<b>16</b>	3.9	1.5	1.4	1.6	7.7	0.0	52	1.0	1.2	1.7	3.7
<b>17</b>	3.4	1.4	1.5	1.6	8.9	0.0	54	1.0	1.2	2.3	1.5
<b>18</b>	3.0	1.4	1.5	1.6	9.8	0.0	42	0.9	1.3	2.7	2.6

At pH 2.7 benzylamine was not retained with the PMTDS-SiO<sub>2</sub> stationary phases, as expected for new generation stationary phases based on type B silica [20]. On the other hand, at pH 7.6 the PMTDS-SiO<sub>2</sub> stationary phases show significant ion exchange properties and present **B/P 7.6** values higher than those

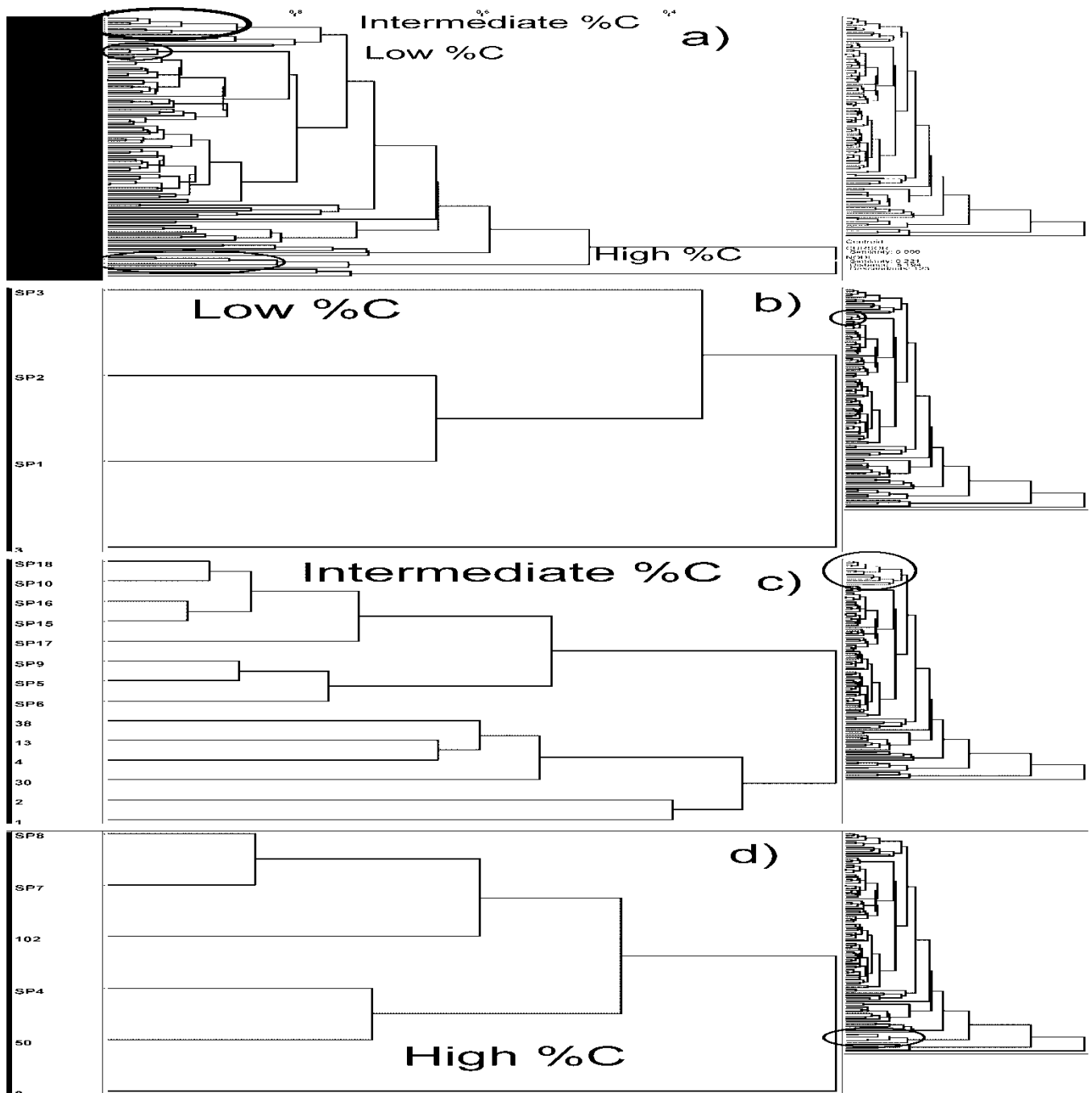
observed for almost all of the new generation stationary phases [20]. SP8 presents higher ion exchange values at pH 7.6 than any of 229 commercial stationary phases.

Another characteristic of new generation phases are good peak shapes for benzylamine at both pH values [20]. Most of the PMTDS-SiO<sub>2</sub> stationary phases present poor peak shapes for benzylamine at both pH values. Poor peak shapes at pH 2.7 can be attributed to extra-column effects that affect the peak width, since benzylamine is not retained at this mobile phase pH. However, the poor peak shapes for benzylamine at pH 7.6 is a surprisingly result since the PMTDS-SiO<sub>2</sub> stationary phases present good peak shapes for amitriptyline with the SRM 870 test. This poor peak shape for benzylamine may be attributed to the mobile phase used in the Tanaka test [1].

### ***Classifications using HCA.***

#### *Classifications using HCA and literature data for the SRM 870 test.*

Extensive study by the United States Pharmacopoeia on the characterization of stationary phases using the SRM 870 test [25] has provided a database with the characterization of 111 stationary phases, which was used for comparison with the PMTDS-SiO<sub>2</sub> stationary phases. The data from the PMTDS-SiO<sub>2</sub> stationary phases obtained with the SRM 870 test were submitted to HCA together with the literature data presented by USP [25] for these commercial phases, excluding Resolve C8 and Spherisorb ODS1, based on type A silica and unable to elute quinizarim due to their high metal contents.



**Figure 7.2:** HCA using data from SRM 870 test of the new PMTDS-SiO<sub>2</sub> stationary phases and data from the literature [2425] a) Complete HCA of the commercial phases and the PMTDS-SiO<sub>2</sub> stationary phases, b) PMTDS-SiO<sub>2</sub> stationary phases with low %C, c) PMTDS-SiO<sub>2</sub> stationary phases with intermediate %C d) PMTDS-SiO<sub>2</sub> stationary phases with high %C. The ovals indicate the location of the PMTDS-SiO<sub>2</sub> stationary phases. The dendrogram of figure a) is seen reduced at the right side of the other figures.



**Table 7.5:** Identification and chromatographic properties of the commercial stationary phases cited in Figure 7.2

<i>number</i>	<i>stationary phase</i>	<i>k<sub>E</sub></i>	<i>Tf<sub>Q</sub></i>	<i>k<sub>ami</sub></i>	<i>Tf<sub>ami</sub></i>	<i>Supplier</i>
1	Hypersil PAH	1.2	2.2	12	2.6	Thermo Scientific
2	Allure	1.4	1.9	12.7	4.4	Restek
3	Alltima HP C18 EPS	0.4	1	8.4	1.2	Grace Davison
4	YMC ODS-AL	1.8	1.5	13.6	2.8	YMC
8	Aquasil C18	1.5	1.9	23	2.8	Thermo Scientific
30	ProntoSil 120-5-C18-SH	2.2	1.8	10.2	2.2	Bischoff
38	Cosmosil 5C18-AR-II	2.4	1.2	14.4	2.3	Nacalai Tesque
50	Prevail C18	2	1	23	2	Grace Davison
102	Alltima HP C18 AQ	3.1	1	26.1	1.5	Grace Davison

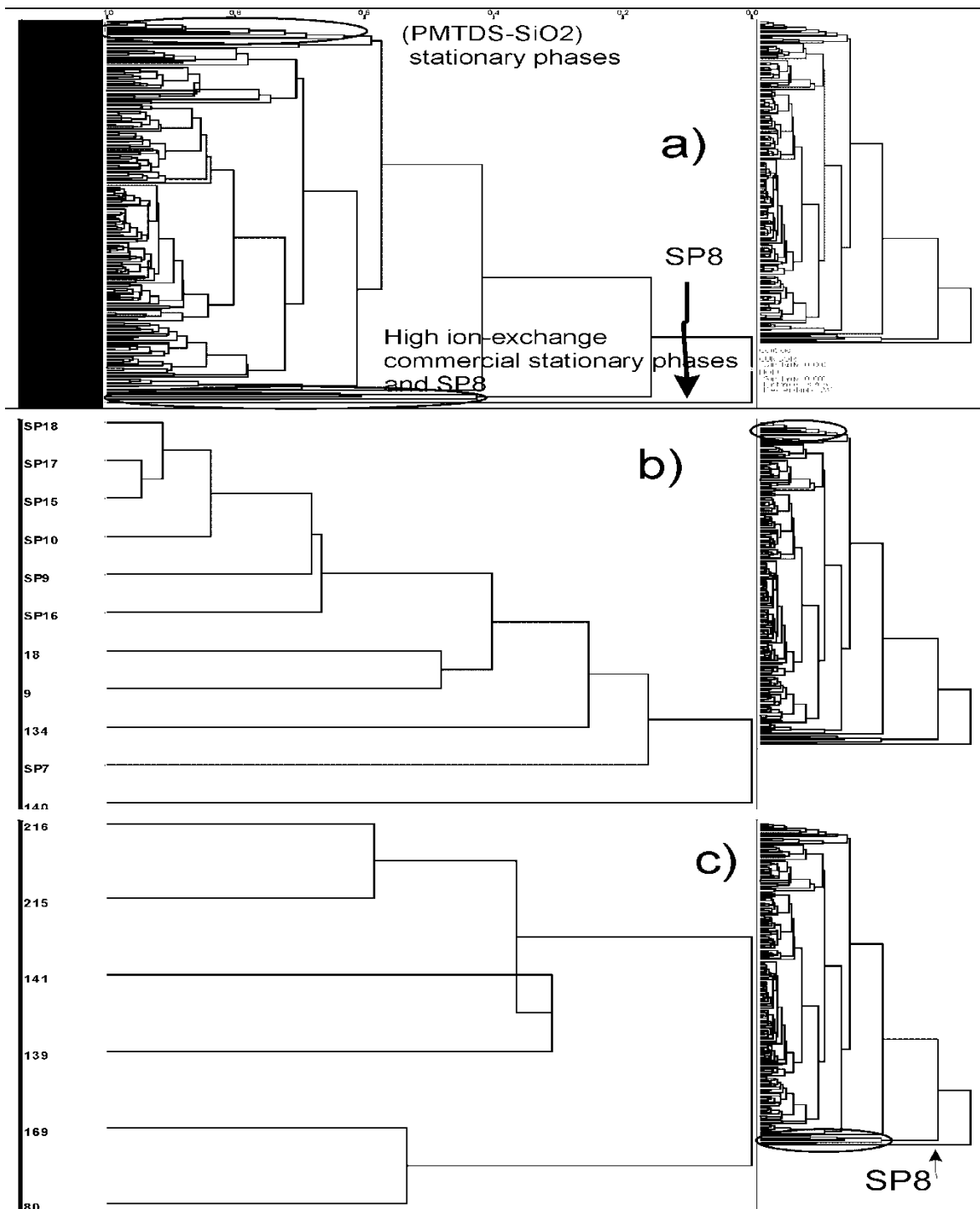
The variables were  $k_E$ ,  $Tf_Q$ ,  $k_{ami}$  and  $Tf_{ami}$ . The HCA is shown in Figure 7.2 and the commercial stationary phases mentioned are described in **Erro! Auto-referência de indicador não válida..** In this HCA PMTDS-SiO<sub>2</sub> stationary phases with high %C (SP4, SP7 and SP8) are placed near to Prevail C18 and Alltima HP C18 AQ, both from Grace Davison, and to Aquasil C18 from Thermo Scientific, which are commercial “aqua” phases with high %C and that possess significant ion-exchange properties due to their polar end-capping. The PMTDS-SiO<sub>2</sub> stationary phases with a intermediate %C (SP5, SP6, SP9, SP10, SP15, SP16, SP17 and SP18) are located near commercial stationary phases Cosmosil 5C18-AR-II from Nacalai Tesque, YMC ODS-AL from YMC, ProntoSil 120-5-C18-AQ Plus and ProntoSil 120-5-C18-SH, both from Bischoff, Alltima HP C18 EPS from Grace Davison, Allure from Restek, and Hypersil PAH from Thermo Scientific, while PMTDS-SiO<sub>2</sub> stationary phases with low %C (SP1, SP2 and SP3) are located near the with commercial stationary phase Alltima HP C18 EPS (from Grace Davison), a phase with extended polar selectivity and low carbon content (~ 4%). All the commercial phases that are near the PMTDS-SiO<sub>2</sub> stationary phases present similar retention factors for ethylbenzene and amitriptyline as well as similar tailing factors for quinizarim, but higher tailing factors for amitriptyline than do the relevant PMTDS-SiO<sub>2</sub> stationary phases.

*Classifications using HCA and literature data for the Tanaka test.*

Euerby et al. [44-46] have done extensive studies on the characterization of stationary phases using the Tanaka test. They have provided a freely available database with the characterization parameters of 229 stationary phases [46] for making comparison with new stationary phases. The PMTDS-SiO<sub>2</sub> stationary phases were also submitted to HCA together with the literature data [46] for commercial stationary phases evaluated with the Tanaka test.

**Table 7.6:** Identification and chromatographic properties of the commercial stationary phases cited in **Figure 7.3**.

number	name	k <sub>PeB</sub>	CH2	T/O	C/P	B/P 7.6	B/P 2.7	Supplier
9	Acquity HSS C18 SB	1.96	1.37	1.9	1.53	4.64	0.15	Grace Davison
18	Altima HP C18 EPS	0.61	1.34	1.95	2.25	4.35	0.2	Grace Davison
80	Hypersil Duet Cation	1.98	1.48	1.55	1.28	7.36	13.63	Thermo Scientific
134	Platinum C18 EPS	0.97	1.31	1.98	2.62	10.11	0.26	Grace Davison
139	Primesep 100	1.78	1.28	1.92	0.88	9.6	7.83	SIELC
140	Primesep 200	1.79	1.26	2.27	0.8	11.12	2.12	SIELC
141	Primesep A	1.63	1.26	1.89	1.03	16.3	12.11	SIELC
169	Spherisorb A5Y	0.73	1.41	1.71	0.84	1.44	13.39	Waters
215	ZiChrom MS	2.02	1.43	1.62	0.27	20	6.28	Zirchrom
216	ZirChrom PBD	1.28	1.41	2.08	0.32	18.77	9.2	Zirchrom



**Figure 7.3:** HCA using data from Tanaka test of the new PMTDS-SiO<sub>2</sub> stationary phases and data from the literature [24], a) Complete HCA of the commercial phases and the PMTDS-SiO<sub>2</sub> stationary phases, b) PMTDS-SiO<sub>2</sub> stationary phases and commercial phases with similar properties, c) commercial phases with high ion-exchange properties and SP 8. The ovals indicate the location of the PMTDS-

SiO<sub>2</sub> stationary phases. The dendrogram of figure a) is seen reduced at the right side of the other figures.

The variables used were **k<sub>PeB</sub>**, **CH<sub>2</sub>**, **T/O**, **C/P**, **B/P 7.6** and **B/P 2.7**. **CH<sub>2</sub>** and **T/O** have small relative standard deviations (RSD), while **C/P**, **B/P 7.6** and **B/P 2.7** have high RSD. However since Euerby et al. [44-46] considered all the variables determined by the Tanaka test [9], all the variables were included in this work. The HCA was performed without the type A silica phases Resolve C18, Spherisorb ODS1 and Spherisorb phenyl from Waters and Hypersil phenyl from Hypersil as well as the polar phases that do not retain pentylbenzene (**k<sub>PeB</sub>** ~ 0), Luna NH2 from Phenomenex and MonoChrome Diol from Varian.

The HCA constructed using the Tanaka test (see Figure 7.3 and Table 7.6) places SP8, which is the phase with the highest **B/P 7.6** (higher than those of Zirchrom MS and Zirchrom PDB (zirconium oxide stationary phases) from ZirChrom and Primesep A, Primesep 100 and Primesep 200 (that have carboxylic embedded groups) from SIELC Primesep™, a **B/P 2.7** lower than the lower quartile (~ 0.1) and **C/P** near the upper quartile (~ 0.8), far from all other commercial phases and even from the other PMTDS-SiO<sub>2</sub> stationary phases (SP7, SP9, SP10, SP15, SP16, SP17 and SP18) that are placed near to Altima HP C18 EPS and Platinum C18 EPS, both from Grace Davison, and Acquity HSS C18 SB from Waters, which are all stationary phases with extended polar selectivity, as well as Primesep 200 (carboxylic groups with pKa 2). These commercial stationary phases have **C/P** and **B/P 7.6** values similar to the indicated PMTDS-SiO<sub>2</sub> stationary phases, but present lower %C and higher **B/P 2.7** values than the PMTDS-SiO<sub>2</sub> stationary phases.

The commercial phases ZirChrom MS and ZirChrom PDB, the aluminum oxide-based phase Spherisorb A5Y from Waters, which has the highest **B/P 2.7** value, the phases with embedded carboxylic groups, Primesep 100 (carboxylic groups with pKa 1) and Primesep A (carboxylic groups with pKa 0), and the mixed-mode phase containing discrete C18 and cation-exchange particles, Hypersil Duet from Thermo Scientific, have all been described as highly retentive for basic pharmaceutical solutes due to ion exchange interactions but give high efficiencies

and good peak shapes for basic solutes [33,35-37]. These commercial phases have high **C/P**, **B/P 7.6** and **B/P 2.7** values (see Table 7.6). Although the PMTDS-SiO<sub>2</sub> stationary phases have relatively high **C/P** and **B/P 7.6** values, SP8, with high **B/P 7.6** and low **C/P** and **B/P 2.7** values, is placed far from all commercial phases and even from other PMTDS-SiO<sub>2</sub> stationary phases (see Figure 7.3).

*Comparison between the classifications obtained using the SRM 870 test and Tanaka test.*

The HCA with the SRM 870 test and with Tanaka test reveal how the choice of the test can affect the final classification. For example, Platinum C18 EPS was not placed near the PMTDS-SiO<sub>2</sub> stationary phases in the HCA using SRM 870 test, as it presents poor peak shape for amitriptyline (3.5) and poor retention for ethylbenzene (0.4) while, using the Tanaka test, this phase is placed quite near to some PMTDS-SiO<sub>2</sub> stationary phases. The phases Aquasil C18 and Altima HP C18 AQ, which were placed near to SP8 and SP7 using the HCA with SRM 870, are placed far from the PMTDS-SiO<sub>2</sub> stationary phases in the HCA based using the Tanaka test, as they present much smaller **B/P 7.6** values than SP8 and SP7. Thus the choice of the classification test can be very important, depending on the goals of the classification process.

***Effect of mobile phase pH and buffer type on retention and asymmetry factor.***

As the pH is changed, all the chromatographic parameters for the basic solutes also change. Normally a mobile phase buffered at a pH value higher than the pKa of the solutes is used with chemically bonded phases [1,10], to ensure that the solute is unprotonated, avoiding ion exchange interactions and enriching the hydrophobic interactions. This results in better peak shapes and increased retentions for the solutes than when the separation is conducted in mobile phases buffered at pH equal to or less than the pKa of the solutes.

To understand the nature of the ion exchange interactions that take place with the PMTDS-SiO<sub>2</sub> stationary phases, SP9 was evaluated with nine basic solutes in 80:20 (v/v) methanol-buffer mobile phases with the pH ranging from 6 to 11.5, using both organic and inorganic buffers, to verify the influence of pH and the nature of the buffer on both the retention and asymmetry factors. The results are shown in Table 7.7.

The PMTDS-SiO<sub>2</sub> stationary phases present exponential increases in the retention factors for basic solutes with the increase in %C. Thus SP9, with an intermediate %C, was chosen for these tests. Mobile phase pH before the addition of organic modifier are functions of buffer type and concentration as well as the type of organic modifier used in the mobile phase [39]. Different kinds of buffer result in different selectivities. Thus the same buffer type must be used to evaluate the effect of mobile phase pH on chromatographic performance [40]. Table 7.7. shows that, for mobile phases buffered with phosphate at pH 6, 7, 8 and 11, the retention factors of nortriptyline, methadone, salbutamol and propranolol increase, while the retention factors of methadone, nicotine, codeine, amitriptyline, chlorpheniramine and diphenhydramine decrease as the mobile phase pH increases from 6 to 7, probably due to the better ion-exchange interactions of these solutes with the stationary phase surface at a mobile phase pH of 6. However the retention factors of all test solutes decrease as the pH increases from 7 to 11. The peak shapes also are better as the pH goes from 6 to 7, remaining similar as the pH goes from 7 to 11 except for salbutamol whose peak shapes worsen as the mobile phase pH increases. At pH 6-8 with phosphate buffer the test solutes were almost 100% protonated and at pH 11 almost 100% unprotonated [41], showing that a predominant ion exchange mechanism occurs with this PMTDS-SiO<sub>2</sub> stationary phase at the intermediate pH while the use of a highly alkaline mobile phase with phosphate buffer (pH 11) suppresses these effects, resulting in decreased retention, although slightly better peak shape. In all mobile phases above pH 6 nortriptyline eluted after amitriptyline, which is “anti-reversed phase” retention behavior [36]. In contrast, at pH below 7, nortriptyline eluted before amitriptyline, indicating that the ion exchange interactions are not the dominant

retention mechanism in acidic mobile phases where both the free silanols and the test solutes are protonated.

Different elution orders were observed with each mobile phase used. Some solutes have better peak shapes at one pH and other solutes at another pH, as previously observed by McCalley [40], who has suggested that more than one solute and mobile phase pH must be evaluated in any stationary phase evaluation. Also, higher retention factors were observed with tricine buffer at pH 8, tris buffer at pH 8.5, borate buffer at pH 9 and with ammonium buffer at pH 10.5 than with phosphate buffer at pH 7. Phosphate is a harder Lewis base than tricine, tris, and borate, and these soft buffers interact better with the soft ion-exchange sites ( $\text{SiOH}$ ) on the PMTDS- $\text{SiO}_2$  stationary phase surfaces, making the PMTDS- $\text{SiO}_2$  stationary phases stronger cation exchangers. This results in longer retention times for the basic solutes since ion exchange interactions are stronger than hydrophobic interactions. At high pH both the solutes and the free silanols are unprotonated ( $\text{SiO}^-$ ) and ion exchange interactions are suppressed. The retention factors with borate at pH 9 are greater than with phosphate at pH 7, while the retention factors with borate at pH 10 are lower than with phosphate at pH 7 and near to those obtained with phosphate at pH 11, due the suppression of ion exchange interactions at high pH. Some of these differences may result from the fact that the actual pH of the mobile phase is not the pH of the aqueous phase, since the pH changes after the addition of the organic constituent [39].

**Table 7.7:** Influence of mobile phase pH and buffer type used on retention factors (*k*) and asymmetry factors (*As*) of basic solutes on PMTDS-SiO<sub>2</sub> stationary phase SP9. The tests done at pH 6 to 11 were carried out in a 80:20 methanol:buffer mobile phase. Buffer identification is showed in section. The letter after the mobile phase pH means the buffer used; P = phosphate buffer, B = borate buffer, A = ammonia buffer and T = triethylamine buffer. Solute identifications: sa = salbutamol; D = diphenidramine; me = methadone; pr = propranolol; ami = amitriptyline; nor = nortriptyline; ni = nicotine; co = codeine; and Ch = chlopheniramine. n.d. not determined

<i>solutes</i>	<i>sa</i>	<i>D</i>	<i>me</i>	<i>pr</i>	<i>ami</i>	<i>nor</i>	<i>ni</i>	<i>co</i>	<i>Ch</i>
<b>pH</b>				<b><i>k</i></b>					
<b>6 P</b>	1.2	4.4	6.3	2.0	7.2	6.7	1.1	4.2	10.0
<b>7 P</b>	1.7	3.0	8.8	2.8	6.2	12.9	0.6	2.3	6.1
<b>8 P</b>	1.2	2.4	6.9	2.2	5.3	10.4	0.4	1.9	4.8
<b>8 tricine</b>	2.0	5.2	5.6	10.8	5.6	11.2	1.3	2.6	7.3
<b>8.5 tris</b>	3.6	9.3	16.5	4.8	15.6	17.0	3.2	8.4	14.8
<b>9 B</b>	5.0	4.8	14.6	5.2	10.4	24.1	0.7	2.8	9.8
<b>10 B</b>	0.7	1.4	4.1	1.5	3.5	8.6	0.2	1.2	2.5
<b>10.5 A</b>	8.9	10.7	36.1	8.4	18.7	49.0	1.6	5.6	22.4
<b>11 P</b>	0.5	1.1	2.9	1.1	2.7	5.9	0.2	1.1	1.9
<b>11.5 T</b>	1.2	2.1	5.4	2.2	5.0	11.4	0.3	1.2	3.6
				<b><i>As</i></b>					
<b>6 P</b>	1.1	1.3	1.4	1.2	2.1	1.6	2.3	1.9	2.3
<b>7 P</b>	1.2	1.1	1.4	1.2	1.3	1.2	1.9	1.6	2.0
<b>8 P</b>	1.6	1.1	1.4	1.0	1.2	1.0	1.7	1.5	2.0
<b>8 trine</b>	1.7	1.8	2.1	1.1	0.9	1.4	1.3	1.3	1.1
<b>8.5 tris</b>	0.9	1.6	1.5	1.2	1.2	2.8	0.9	1.6	1.6
<b>9 B</b>	n.d.	0.5	1.6	1.2	0.8	1.0	1.8	1.5	1.9
<b>10 B</b>	n.d.	0.7	0.8	1.3	1.1	0.7	0.8	1.6	1.7
<b>10.5 A</b>	1.4	1.0	2.0	1.5	1.6	1.2	2.4	2.2	3.0
<b>11 P</b>	1.9	1.0	0.9	1.3	1.1	1.0	1.0	1.3	1.5
<b>11.5 T</b>	1.5	1.0	0.8	1.1	0.9	0.9	1.2	1.1	0.9

### Effect of buffer concentration

The mobile phase buffer concentration has a big impact on solute retention in ion-exchange chromatography but only a minor effect in RP-HPLC [36]. Thus, to examine how changes in buffer concentration can affect retention on PMTDS-SiO<sub>2</sub> stationary phases, 10, 50 and 100 mmol/L phosphate buffers were chosen to



ensure that any effect would be large enough to be detected. The mobile phases used were 65:35 (v/v) methanol-phosphate buffer because it is not possible to prepare 100 mmol of phosphate in a mobile phase with 80% methanol. Nortriptyline was taken out of the test solutes due to its extremely long retention time in this more aqueous mobile phase.

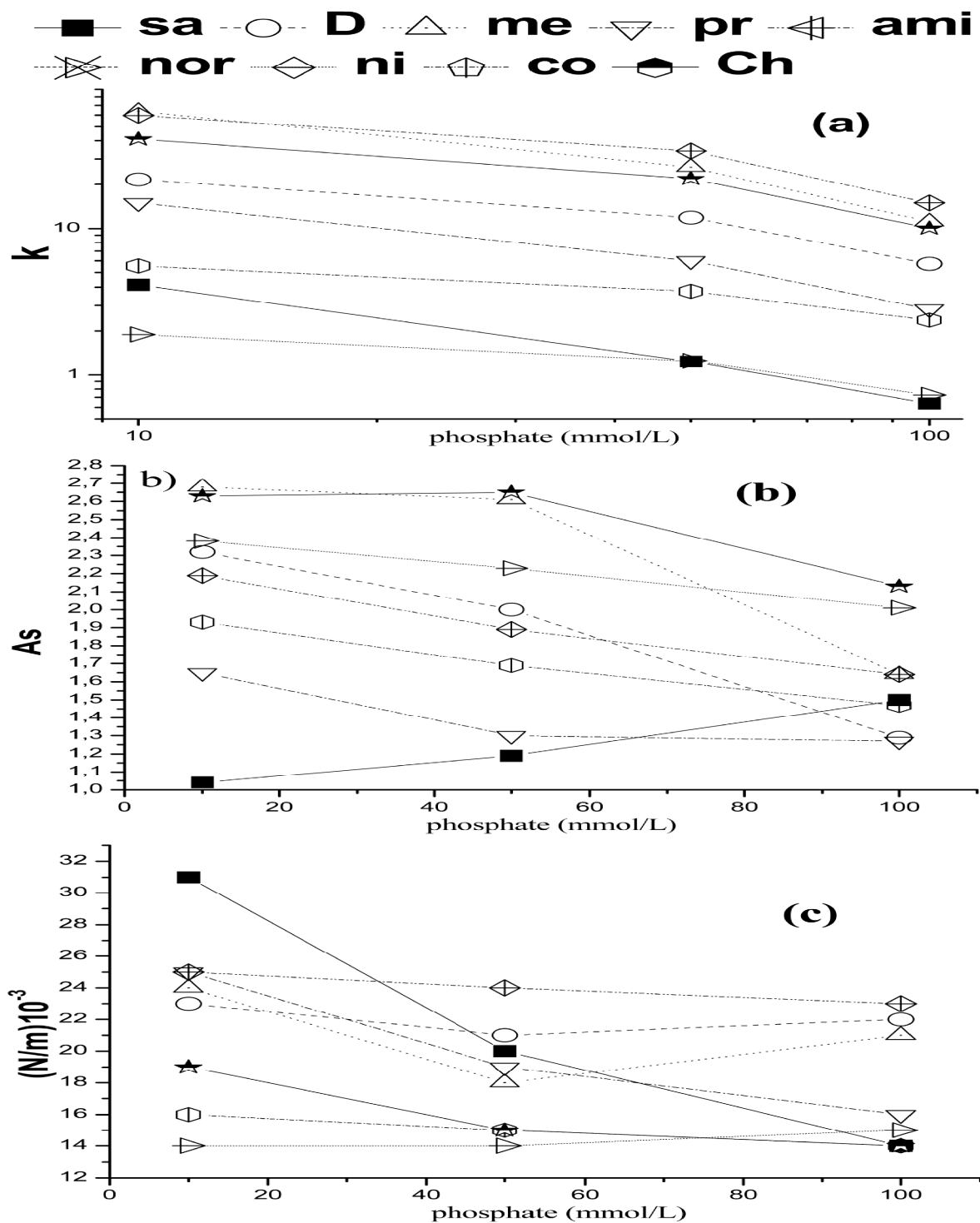
The effect of buffer concentration on the efficiencies, asymmetries and retention factors of the test solutes are shown in Figure 7.4. For all the solutes, non linear retention decreases are seen as the buffer concentration is increased. The variations in retention factors with the increase in buffer concentration for the different solutes are different. This means that when the concentration of the mobile phase additive changes, the retentions of the different solutes differ. Thus, the selectivity (band spacing) will vary as the buffer concentration is changed. The elution order of salbutamol and nicotine was changed as the buffer concentration increased. The increase in buffer concentration results in slightly better peak shapes and slightly worse efficiencies. This confirms that ion exchange interactions contribute substantially to retention on the PMTDS-SiO<sub>2</sub> stationary phases.

## ***Stability Evaluation***

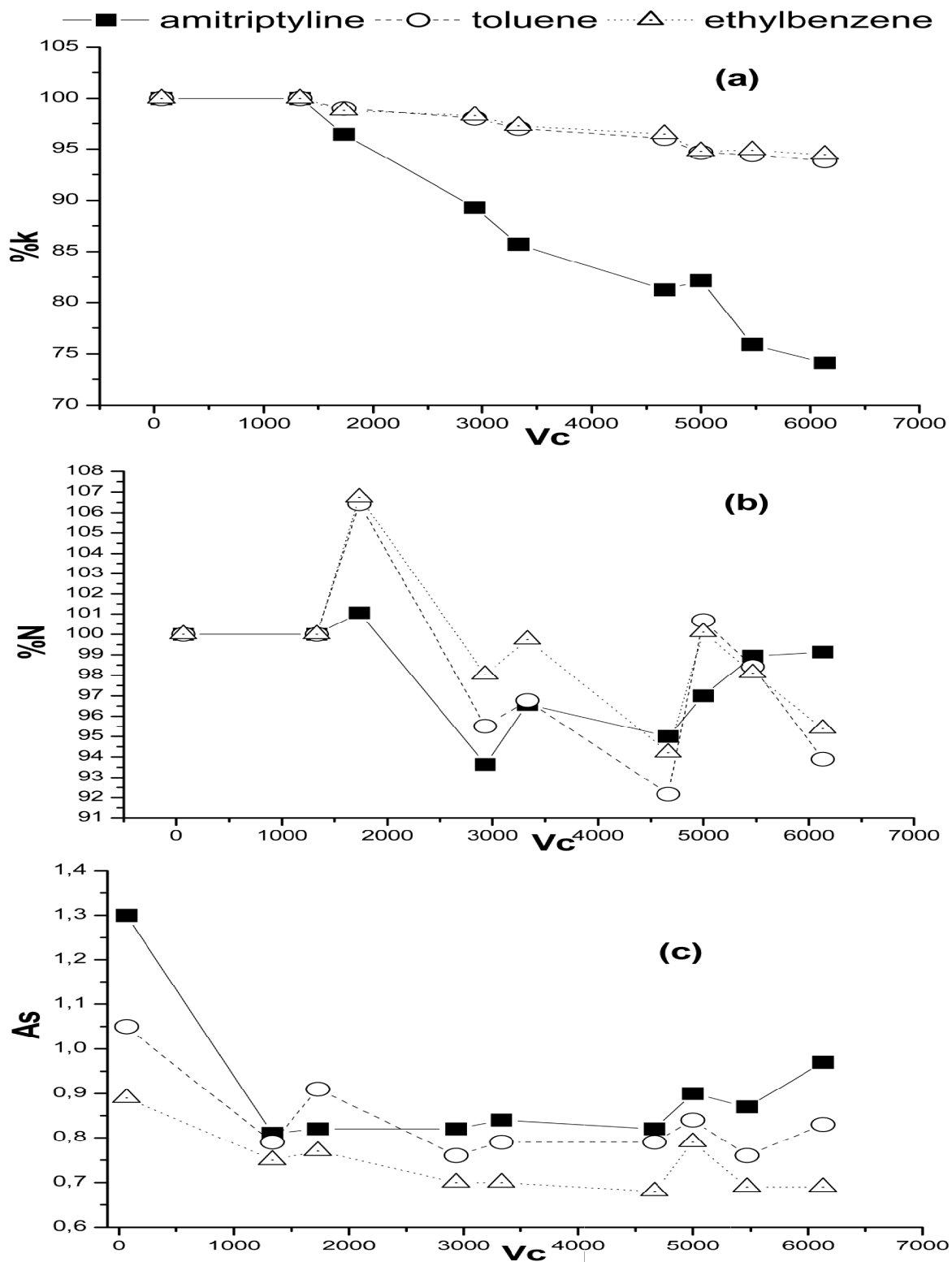
### *Acidic mobile phase*

A test with an acidic mobile phase (see Figure 7.5) was carried out until the passage of 6500 column volumes (V<sub>c</sub>) at 75 °C. The retention of toluene and ethylbenzene showed only a slight decrease by the end of the test, while the retention of propranolol fell by 25%. Also, only minor changes were observed in efficiencies and peak shapes at the end of the test.

The good stability presented for some PMTDS-SiO<sub>2</sub> stationary phases at low pH, even at high temperature are probably due to the fact that the cleavage of Si-C bond in PMTDS is harder than in chemically bonded phases due to steric hindrance and that silica is highly stable in most acid media.



**Figure 7.4:** Effect of buffer concentration on (a) retention factors ( $k$ ); (b) asymmetry factors ( $A_s$ ) and (c) efficiencies ( $N/m$ ) for basic solutes. Solute identifications in **Table 7.7**. Chromatographic conditions in section 0.

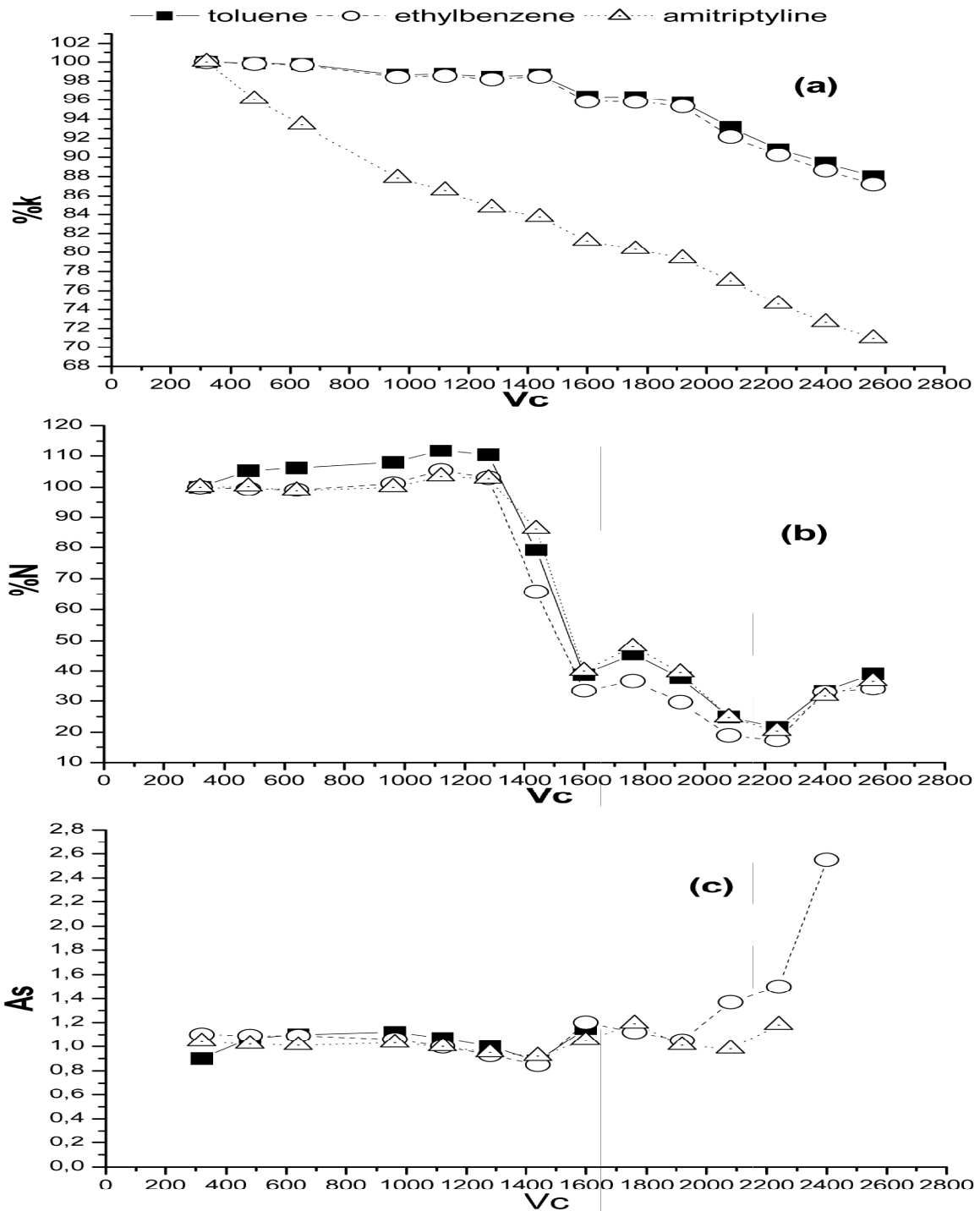


**Figure 7.5:** Stability at low pH with PMTDS-SiO<sub>2</sub> stationary phase SP7. Variation of a) retention factors b) efficiencies and c) asymmetry factors as functions of the passage 50:50 (v/v) methanol:0.2% trifluoroacetic acid mobile phase at 75 °C.

*Basic mobile phase.*

With the PMTDS-SiO<sub>2</sub> stationary phases the basic stability test showed that amitriptyline presents lower retentions since the ion exchange interactions are suppressed. The alkaline stability test evaluated the viability of the phases in conditions that suppress the ion exchange interactions, as shown in Figure 7.6. This test was carried out at pH 11 and at 23 °C until the passage of 2500 Vc. The retention factors of toluene and ethylbenzene had smaller decreases (10%) than did amitriptyline (30%). The efficiencies for the test solutes were unchanged up to the passage of 1200 Vc. After this volume the stationary phase loses 60% of its efficiency, although the asymmetry factors were essentially unchanged. These results are similar to a previous investigation [42], which showed that a stationary phase prepared by thermal immobilization of poly(methyloctylsiloxane) with high %C (23%) did not present any variation in retention factor, asymmetry factor and efficiency (naphthalene as test solute) until the passage of 1600 Vc of 70:30 (v/v) methanol-carbonate buffer (pH 10; 50 mmol/L) at 60 °C. After this volume the stationary phase lost 60% of its efficiency, while the asymmetry factors were again essentially unchanged.

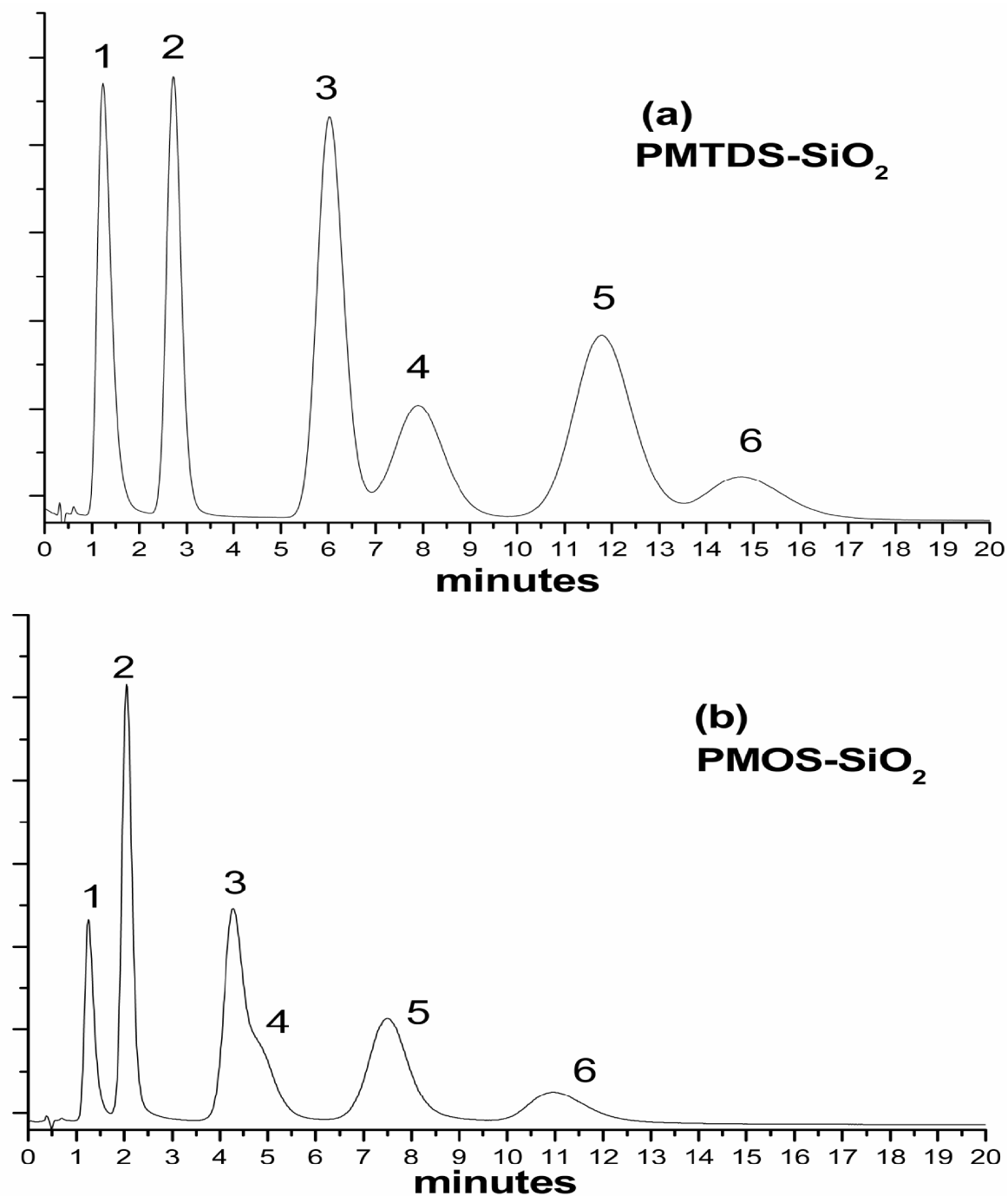
The lower stability presented for PMTDS-SiO<sub>2</sub> stationary phases at high pH, even at room temperature, is due to the dissolution of the silica back bone, confirming that the PMTDS is immobilized onto silica surface as plugs [17]. This gives these stationary phases high ion-exchange properties but also results instability in highly alkaline mobile phases. However these phases presents a unique selectivity using neutral mobile phases with amino buffers and relative high amounts of organic modifiers could be used to obtain rational retention factors. Under these conditions acceptable stationary phase lifetime can be achieved.



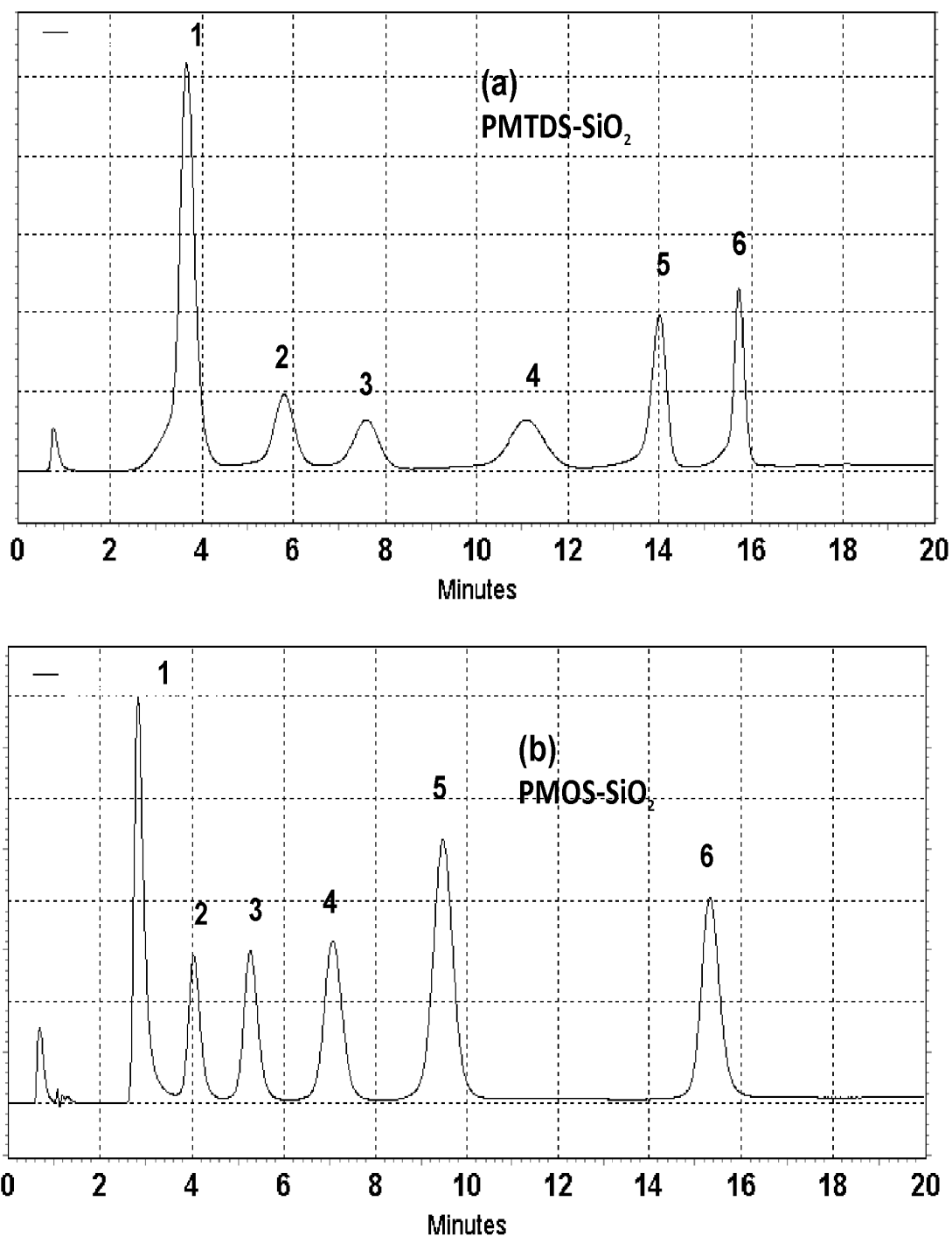
**Figure 7.6:** The effects of pH 11 with PMTDS-SiO<sub>2</sub> stationary phase SP7. Variation of a) retention factors b) efficiencies and c) asymmetry factors as functions of the passage 65:35 (v/v) methanol-phosphate buffer (pH 11; 20 mmol/L) mobile phase at 23 °C mobile phase.

## The applicability of some PMTDS-SiO<sub>2</sub> stationary phases

The Tanaka test indicated that the major difference between the PMTDS-SiO<sub>2</sub> stationary phase SP7 and a PMOS-SiO<sub>2</sub> stationary phase with the same %C are higher ion exchange properties at neutral mobile phases and higher shape selectivity for SP7 (Table 7.4). To understand what this implies in terms of selectivity and peak shape for basic solutes both phases were used to separate a mixture of basic solutes as shown in Figure 7.7. The higher ion-exchange properties of SP7 allow the separation of amitriptyline and fluoxetine, while this separation fails on the PMOS-SiO<sub>2</sub> stationary phase. Dextromethorphan was better resolved and has a slightly better asymmetry factor on the PMOS-SiO<sub>2</sub> stationary phase than on SP7. Figure 7.8 shows the separation of benzodiazepines on the same stationary phases, using ethanol as organic modifier. The benzodiazepines are weaker bases than the pharmaceuticals used in the example of Figure 7.7 but the differences in selectivity for the separations between these two stationary phases are significant. The asymmetry factors for the benzodiazepines with SP7 are close to 0.9, while the PMOS-SiO<sub>2</sub> stationary phase affords asymmetry factors nearer to 1.0. Also, the use of ethanol as organic modifier afforded a good separation without the generation of hazardous waste [2,3]. However since both phases have the same %C they provide almost the same selectivity for the separation of a mixture of neutral agrochemicals, as shown in Figure 7.9.

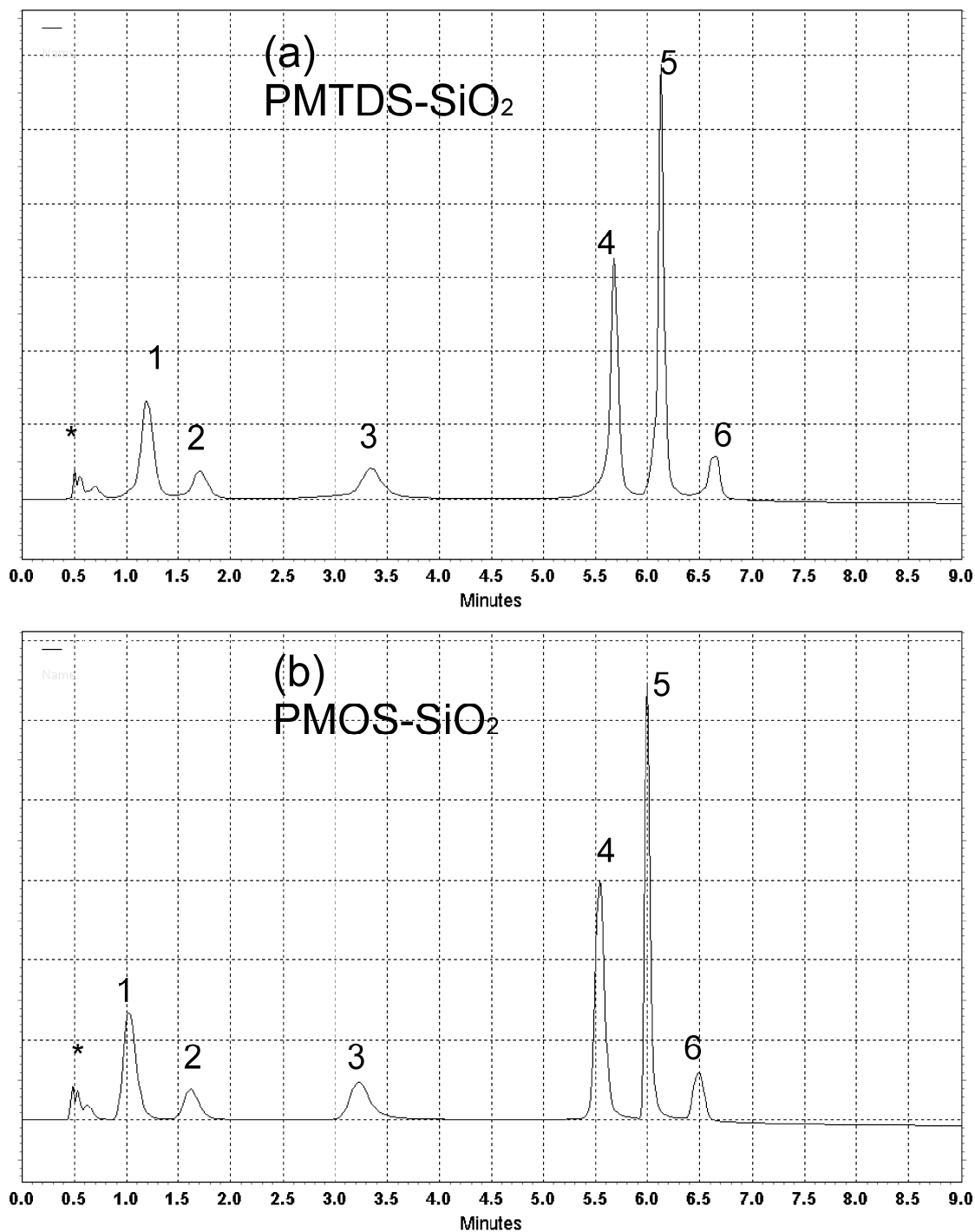


**Figure 7.7:** Chromatograms for the separations of some basic pharmaceuticals on (a) PMTDS-SiO<sub>2</sub> stationary phase SP7 and (b) PMOS-SiO<sub>2</sub> SP7 stationary phase. Mobile phase: 80:20 (v/v) ethanol-phosphate buffer (pH 7.5; 20 mmol/L); flow rate: 1.5 mL/min; detection: UV at 220 nm; injection volume: 5  $\mu$ L; temperature: 23  $^{\circ}$ C. Solutes: (a) 1 = codeine; 2 = diphenhydramine; 3 = fluoxetine; (b) 4 = amitriptyline; 5 = nortriptyline; 6 = dextromethorphan. Figure 7.7a asymmetry factors 1 = 1.8; 2 = 1.3; 3 = 1.4; 4 = 1.2; 5 = 1.2; 6 = 1.6. Figure 7.7b asymmetry factors 1 = 1.6; 2 = 1.2; 5 = 1.1; 6 = 1.4.



**Figure 7.8:** Chromatogram for a green separation of some benzodiazepines (a) on the PMTDS-SiO<sub>2</sub> stationary phase SP7 (b) on a PMOS-SiO<sub>2</sub> stationary phase. Mobile phase: A = ethanol; B = phosphate buffer (pH 7; 20 mmol/L). Step gradient: 30% A for 7 min, 55% A for 10 min, return to 30% A in 3 min; flow rate: 0.5 mL/min; detection: UV at 226 nm; injection volume: 10  $\mu$ L; temperature: 23  $^{\circ}$ C. Solutes: 1 = bromazepam; 2 = clonazepam; 3 = lorazepam; 4 = alprazolam; 5 = diazepam; 6 = midazolam.





**Figure 7.9:** Chromatogram for the separation of some agrochemicals on PMTDS-SiO<sub>2</sub> stationary phase SP7 and a PMOS-SiO<sub>2</sub> stationary phase with the same %C. Mobile phase: A = 90:10 (v/v) acetonitrile:water ; B = 10:90 (v/v) acetonitrile:water. Step gradient: 15% A for 2 min, 100 % A for 6 min, return to 15% A in 3 min; flow rate: 1 mL/min; detection: UV at 249 nm; injection volume: 10  $\mu$ L; temperature: 40

°C. Solutes: \* = degradation product of imidacloprid; 1 = aldicarb; 2 = carbendazim; 3 = 3,5-dichloroaniline, 4 = diuron; 5 = diflubenzuron; 6 = diphenconazol.

## Conclusion

The small RSD presented for some test parameters (such as asymmetry factor) and the high correlation of the retention factors obtained with the SRM 870 and Engelhardt tests leads to the conclusion that the Tanaka test is the best one to evaluate these PMTDS-SiO<sub>2</sub> stationary phases, since the variables were highly uncorrelated. Comparison of several PMTDS-SiO<sub>2</sub> stationary phases with commercial phases using the Tanaka test and literature data suggest that the PMTDS-SiO<sub>2</sub> stationary phases do not have ion exchange properties in acidic mobile phases but that ion exchange interactions are significant at neutral pH and that these stationary phases have different chromatographic properties than most commercial phases, while our in-house test adds evidences that ion-exchange interactions are increased in the presence of the soft buffers, which results in large variations in the retention factors of basic solutes with pH, buffer type and buffer concentration variations.

The PMTDS-SiO<sub>2</sub> stationary phases present reasonable stability with acidic mobile phases, as expected for immobilized polymer phases, although these phases were not stable in highly alkaline mobile phases. The use of highly basic mobile phases suppresses ion-exchange interactions, resulting in lower selectivities and slightly better peak shapes than those obtained with neutral mobile phases. However, better selectivities and adequate asymmetries are found in neutral mobile phases and using amino buffers, reducing the need for alkaline mobile phases, since neutral mobile phases may be used, avoiding possible negative consequences of using highly alkaline mobile phases on the instrument and permitting the use of mass spectrometric detection. The use of green mobile phases with the PMTDS-SiO<sub>2</sub> stationary phases merits further investigation.

## References

1. D.V. McCalley, *J. Chromatogr. A* 1217 (2010) 858–880.
2. C.J. Welch, T. Brkovic, W. Schafer, X. Gong, *Green Chem.*, 11 (2009) 1232–1238.
3. R.L.V. Ribeiro, C.G.G Botolli, K.E Collins, C.H. Collins, *J. Braz. Chem. Soc.*, 15 (2004) 300-306.
4. M. Kele, G. Guiochon, *J. Chromatogr. A* 960 (2002) 19–49
5. L.R. Snyder, P.W. Carr, J.W. Dolan, R.E. Majors, *LC-GC North America* 28 (2010) 418-430
6. R.E. Major, *LCGC Column Technology Supplement*, 26 (S4), April 2010, 8-19.
7. R.E. Major, *LCGC Column Technology Supplement*, 26 (S4), April 2006, 8-15.
8. H.A. Claessens, M.A. Van Straten, *J. Chromatogr. A*. 1060 (2004) 23-41.
9. T.Teutenberg, K.Hollebekkers, S.Wiese, A. Boergers. *J. Sep. Sci.* 32 (2009) 1262-1274
10. K.D. Wyndham, J.E. O’Gara, T.H. Walter, K.H. Glose, N.L. Lawrence, B.A. Alden, G.S. Izzo, C.J. Hudalla and P.C. Iraneta, *Anal. Chem.* 75 (2003), 6781.
11. J. Nawrocki, C. Dunlap, J. Li, J. Zhao, C.V. McNeff, A. McCormick, P.W. Carr, *J. Chromatogr. A* 1028 (2004) 1–30.
12. J. Nawrocki, C. Dunlap, J. Li, J. Zhao, C.V. McNeff, A. McCormick, P.W. Carr, *J. Chromatogr. A* 1028 (2004) 31–62.
13. J. Dai, X. Yang, P.W. Carr, *J. Chromatogr. A*. 1005 (2003) 63–82.
14. Y. Hu, X. Yang, P.W. Carr, *J. Chromatogr. A*. 968 (2002) 17-29.
15. N.H. Davies, M.R. Euerby, D.V. McCalley, *J. Chromatogr. A* 1138 (2007) 65–72.
16. A.M. Faria, C.H. Collins, I.C. S. F. Jardim, *J. Braz. Chem. Soc.*, 20 (2009) 1385-1398.
17. I.C.S.F. Jardim, K.E. Collins, C.H. Collins, *Microchem J.* 77 (2004) 191–198.
18. K. Szabó, N.L. Ha, P. Schneider, P. Zeltner and E.sz. Kováts, *Helv. Chim. Acta* 67 (1984) 2128–2142.
19. H. Engelhardt, M. Arangio, T. Lobert, , *LC–GC Int.* 10 (1997) 803-812.
20. L. Sander, S.A. Wise, *J. Sep. Sci.* 26 (2003) 283-294.
21. K. Kimata, K. Iwaguchi, S. Onishi, K. Jinno, R. Eksteen, K. Hosoya, M. Arki, N. Tanaka, *J. Chromatogr. Sci.* 27 (1989) 721-728.
22. M.R. Euerby, P. Petersson, *LC-GC Eur.* 13 (2000) 665-677.
23. M.R. Euerby, P. Petersson, *J. Chromatogr. A* 994 (2003) 13-36.
24. <http://www.acdlabs.com/resources/freeware/>. accessed in September of 2010.
25. <http://www.usp.org/USPNF/columnsDB.html>. accessed in September of 2010.

26. B.C. Trammell, C.A. Boissel, C. Carignan, D.J. O'Shea, C.J. Hudalla, U.D. Neue, P.C. Iraneta, *J. Chromatogr. A* 1060 (2004) 153–163.
27. E.M. Borges, C.G.A. Silva, C.H. Collins, *Microchem. J.* 96 (2010) 120–125.
28. K.E. Collins, A.C. Franchon, I.C.S.F. Jardim, E. Radanovic, M.C. Gonçalves, *LC–GC* 18 (2000) 106–117.
29. Kapor, M.A., Master thesis, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2001.  
<http://biq.igmm.unicamp.br/arquivos/teses/vtIs000237862.pdf>
30. A.M. Faria, K.E. Collins, C.H. Collins, *J. Chromatogr. A* 1122 (2006) 114–122.
31. A.M. Faria, K.E. Collins, C.H. Collins *Chromatographia* 67 (2008) 357–363
32. E. Tonhi, K.E. Collins, C.H. Collins *J. Chromatogr. A* 1119 (2006) 135–139
33. S. Bachmann, L.F.C. Melo, R.B. Silva, T.A. Anazawa, I.C.S.F. Jardim, K.E. Collins, C.H. Collins, K. Albert, *Chem. Mater.* 13 (2001) 1874–1879.
34. E. Tonhi, S. Bachmann, K. Albert, I.C.S.F. Jardim, K.E. Collins, C.H. Collins, *J. Chromatogr. A* 948 (2002) 97–107.
35. S.J. Schmitz, H. Zwanziger, H. Engelhardt, *J. Chromatogr.* 544 (1991) 381–391.
36. H. Engelhardt, M. Jungheim, *Chromatographia* 29 (1990) 59–68.
37. K. Okusa, Y. Suita, Y. Otsuka, M. Tahara, T. Ikegami, N. Tanaka, M. Ohira, M. Takahashi, *J. Sep. Sci.* 33 (2010) 348–358.
38. H. Engelhardt, Ch. Blay, J. Saar, *Chromatographia Suppl.* 62 (2005) S19–S29.
39. M. Rosés, X. Subirats, E. Bosch, *J. Chromatogr. A* 1216 (2009) 1756–1775.
40. D.V. McCalley, *Anal. Chem.* 75 (2003) 3404–3410.
41. S.M.C. Buckenmaier, D.V. McCalley, M.R. Euerby, *J. Chromatogr. A* 1060 (2004) 117–126.
42. E. Tonhi, K.E. Collins, C.H. Collins *J. Chromatogr. A* 987 (2003) 93–101
43. K.E. Collins, M.L.M.M. Granja, R.G. Pereira Filho, T.A. Anazawa, I.C.S.F. Jardim, *Chromatographia* 45 (1997) 99–103.
44. R.B. Silva, C.R. Silva, C. Airoidi, C.H. Collins, I. C.S.F. Jardim, *Microchem. J.* 82 (2006) 150–158.



## Capítulo 8: Conclusões e propostas futuras.

### Conclusões dos capítulos

**Capítulo 3:** Conclusões referentes ao artigo intitulado “**Chromatographic evaluation of some stationary phases based on poly(methyloctylsiloxane) immobilized onto sílica**”: Mediante aos resultados obtidos com o teste de Tanaka, observou-se que estas fases estacionárias possuem altas propriedades de troca iônica em fase móvel neutra e baixa capacidade de troca iônica em meio ácido, o que confere a estas fases estacionárias propriedades cromatográficas distintas de qualquer outra fase estacionária disponível comercialmente, mesmo as fases estacionárias ZirChrom, que realizam interações sinérgicas entre os zirconóis e o polímero com solutos básicos, enquanto nas fases estacionárias PMOS-SiO<sub>2</sub> e PMTDS-SiO<sub>2</sub> também ocorrem interações sinérgicas dos silanois com o polissiloxano imobilizado sobre a sílica, mas a seletividade destas fases é distinta, embora as interações dos solutos com a fase estacionária sejam similares. Adicionalmente, verificou-se uma das fases estacionárias desenvolvidas com percentagem intermediária de carbono foi útil na separação de compostos farmacêuticos e benzodiazepínicos

**Capítulo 4:** Conclusões referentes ao artigo intitulado “**Chromatographic evaluation using basic solutes of the silanol activity of stationary phases based on poly(methyloctylsiloxane) immobilized onto sílica**”. Os testes iniciais realizados, analisando-se a amitriptilina e a nortriptilina como solutos-teste em fases móveis ácidas ou neutras, reforçaram as conclusões do Capítulo 3, mostrando que estas fases estacionárias possuem altas propriedades de troca iônica em fase móvel neutra e baixa capacidade de troca iônica em meio ácido, uma vez que a amitriptilina, que contém uma metila a mais no nitrogênio básico que a nortriptilina, elui antes da nortriptilina em fase móvel neutra, enquanto que a amitriptilina elui após a nortriptilina em fase móvel ácida, além do fato de que

estes dois solutos são muito mais retidos em fase móvel neutra do que em fase móvel ácida.

Em uma fase estacionária PMOS-SiO<sub>2</sub> com percentagem intermediária de %C, o aumento do pH de 6 para 7 (utilizando-se tampão fosfato) ocasiona um aumento dos fatores de retenção, devido ao aumento do grau de ionização dos silanóis residuais. O aumento do pH da fase móvel (utilizando-se tampão fosfato) de 7 a 11,0 ocasionou a redução dos fatores de retenção devido a redução do grau de ionização dos solutos. Os fatores de retenção obtidos em fases móveis com pH > 7 com tampões mais moles que o fosfato (tampões borato e tricina) foram maiores que os valores obtidos a pH 7 com tampão fosfato, devido a melhores interação dos silanóis residuais com tampões que são bases de Lewis mais fracas que o fosfato. Estes resultados mostram que a retenção de compostos básicos na fase estacionária PMOS-SiO<sub>2</sub> é governada por fenômenos de troca iônica onde o grau de ionização dos silanóis residuais, o pH e o tipo e a concentração de tampão utilizado alteram de maneira significativa os fatores de retenção e a seletividade de solutos básicos, uma vez que o grau de ionização dos silanóis e dos solutos variam conforme o pH da fase móvel e as interações dos silanóis residuais com os solutos também variam conforme o tipo de tampão utilizado.

Com as fases estacionárias comerciais, o aumento do pH da fase móvel de 6 a 8 ocasionou o aumento dos fatores de retenção, que se mantiveram constantes até pH 10, independentemente do tipo de tampão utilizado. Em fase móvel com pH 8, os fatores de retenção obtidos com tampão tricina foram ligeiramente menores que os obtidos com tampão fosfato, mostrando que a retenção de compostos básicos com as fases estacionárias comerciais também envolve fenômenos de troca-iônica com os silanóis residuais. Porém, estes fenômenos são muito mais intensos e importantes, para a retenção de solutos básicos, na fase PMOS-SiO<sub>2</sub> do que com as fases estacionárias comerciais.

O aumento da concentração de tampão de 20 a 100 mmol/L causou a reduções dos fatores de retenção dos solutos básicos na fase estacionária PMOS-SiO<sub>2</sub> de 50-70%, e de apenas 5-15% nas fases estacionárias comerciais,

confirmando as afirmações anteriores de que os fenômenos de troca iônica são muito mais intensos para a retenção na fase PMOS-SiO<sub>2</sub> do que com as fases estacionárias comerciais.

Neste artigo foram mostrados alguns exemplos de como uma fase estacionária PMOS-SiO<sub>2</sub> pode ser útil para separar compostos básicos, onde a sua seletividade única e a forte contribuição dos fenômenos de troca iônica permitem separações de alguns solutos básicos que anteriormente não eram possíveis em meio ácido (devido a supressão dos fenômenos de troca iônica), ocorressem em fase móvel neutra.

**Capítulo 5:** Conclusões referentes ao artigo intitulado “**Evaluation of new immobilized stationary phases. Part I: Effect of pH, temperature, buffer type and buffer concentration on chromatographic performance**”. Verificou-se que, independentemente da quantidade de polissiloxano imobilizada sobre a superfície da sílica, estas fases estacionárias apresentam grande quantidade de silanóis residuais que se combinam com as cadeias hidrofóbicas do polissiloxano de maneira sinérgica conforme o modelo de Neue et al., [1] onde estes sítios são os principais responsáveis pela retenção dos solutos básicos. Além disso, quanto maior a quantidade de PMOS imobilizado sobre a sílica, maior é a retenção da fase estacionária para solutos básicos. Se os fenômenos de troca iônica ocorressem separadamente e não de maneira sinérgica, o aumento da quantidade de PMOS imobilizado sobre a superfície da sílica resultaria em menores fatores de retenção para os solutos básicos, que são retidos essencialmente por fenômenos de troca iônica, pois o aumento da quantidade de PMOS imobilizado sobre a superfície da sílica diminui a quantidade de silanóis residuais. No entanto, a retenção dos solutos básicos aumenta com o aumento da quantidade de PMOS imobilizado sobre a superfície da sílica, não porque as fases estacionárias com maior percentagem de carbono possam reter mais os solutos básicos (uma vez que, em fases móveis neutras, os solutos-teste utilizados ( $pK_a > 9$ ) estão 100% ionizados e são pouco retidos por interações hidrofóbicas) mas porque o aumento da quantidade de PMOS imobilizado sobre a superfície da sílica cria mais sítios capazes de realizar interações sinérgicas com os silanóis residuais.



As quatro fases estacionárias estudadas, que apresentam quantidades de carbono baixa, média e alta, apresentaram comportamento cromatográfico semelhante ao observado para uma fase estacionária com percentagem intermediária de carbono estudada no capítulo 4 e em ambos os casos foram obtidos fatores de assimetria próximos a unidade para solutos básicos, enquanto o aumento do pH não resultou em nenhuma melhoria expressiva nos fatores de assimetria. Também se verificou que a seletividade destas fases pode ser fortemente alteradas com o pH da fase móvel, tipo e concentração de tampão utilizado e com a variação de temperatura.

**Capítulo 6:** Conclusões referentes ao artigo intitulado “**Evaluation of some immobilized stationary phases. Part II: Effect of pH, temperature, buffer type and buffer concentration on stability**”. Os estudos conduzidos neste artigo mostram que as fases estacionárias PMOS-SiO<sub>2</sub> são instáveis em fase móvel alcalina com tampões inorgânicos como fosfato e carbonato, devido à grande quantidade de silanóis residuais na superfície destas fases estacionárias. No entanto, estas fases estacionárias podem ser utilizados seguramente com fases móveis a pH 11,5 com tampão trietilamina, a pH 10 com borato e com tampão fosfato a pH 7 a temperatura ambiente. O aumento da concentração de tampão, do pH da fase móvel e da temperatura aumentam a degradação da fase estacionária, onde o aumento da temperatura é mais importante que o aumento da concentração de tampão ou até mesmo do pH, sendo que as fases estacionárias PMOS-SiO<sub>2</sub> se degradam em fase móvel a pH 7 com tampão fosfato a 60 °C tão rapidamente quanto a pH 11 com tampão fosfato a 23 °C e fases móveis a pH 10 com tampão borato a 40 e 60 °C são tão agressivas quanto fases móveis a pH 10 com tampão carbonato a 40 e 60 °C.

Como foi discutido extensivamente ao longo dos capítulos 3, 4 e 5, as fases estacionárias PMOS-SiO<sub>2</sub> apresentam uma grande quantidade de silanóis livres que tornam as mesmas instáveis em meio alcalino. No entanto a instabilidade destas fases estacionárias em meio alcalino não é um fator agravante uma vez que o uso de fases móveis neutras é mais apropriado com estas fases estacionárias (veja capítulo 5). Adicionalmente, as fases estacionárias PMOS-SiO<sub>2</sub> apresentam alta estabilidade em fases móveis ácidas uma vez que as ligações Si-

C no PMOS são protegidas por impedimento estérico e a sílica é extremamente estável em meio ácido na ausência de fluoreto.

**Capítulo 7:** Conclusões referentes ao artigo intitulado “**Characterization of several stationary phases prepared by thermal immobilization of poly(methyltetradecylsiloxane) onto silica surfaces**” A avaliação das fases estacionárias preparadas pela imobilização térmica do poli(metiltetradecilsiloxano) (fases PMTDS-SiO<sub>2</sub>) com o teste de Engelhardt não apresentou nenhuma informação útil a respeito das propriedades cromatográficas destas fases. A avaliação com o teste de Tanaka mostrou que estas fases estacionárias possuem altas propriedades de troca iônica em fase móvel neutra e baixa capacidade de troca iônica em meio ácido, como acontece com as fases estacionárias PMOS-SiO<sub>2</sub>. A comparação entre os valores obtidos com os valores da literatura para fases estacionárias comerciais mostrou que as propriedades cromatográficas das fases estacionárias PMTDS-SiO<sub>2</sub> são distintas das propriedades de qualquer outra fase estacionária disponível comercialmente, como foi mostrado para as fases PMOS-SiO<sub>2</sub> no capítulo 3. As fases estacionárias comerciais ZirChrom PDB e Primesep apresentam altas propriedades de troca iônica a pH 7,6 e 2,7, enquanto as fases estacionárias PMOS-SiO<sub>2</sub> e PMTDS-SiO<sub>2</sub> apresentam altas propriedades de troca iônica apenas a pH 7,6. A avaliação com o teste SRM 870 mostrou que, apesar da participação de fenômenos de troca iônica na retenção de solutos básicos, estas fases estacionárias fornecem fatores de assimetria próximos a unidade para amitriptilina. A comparação dos valores obtidos com o teste SRM 870 com os valores da literatura para fases estacionárias comerciais não foi útil para entender as diferenças de seletividade entre as fases estacionárias PMTDS-SiO<sub>2</sub> e as comerciais.

A exemplo do que foi observado nos Capítulos 4 e 5, este capítulo mostrou que a fase estacionária PMTDS-SiO<sub>2</sub> também apresenta alta contribuição de fenômenos de troca-iônica na retenção de solutos básicos devido a interações sinérgicas dos silanóis livres com o PMTDS imobilizado na superfície da sílica e como já mostrado com as fases estacionárias PMOS-SiO<sub>2</sub>, o pH e o tipo de tampão utilizado alteram de maneira significativa os fatores de retenção e a

seletividade de solutos básicos, onde, o aumento da concentração de tampão na fase móvel ocasionam reduções nos fatores de retenção dos solutos básicos de 50 a 75%, devido a importância dos fenômenos de troca iônica na retenção de solutos básicos com estas fases estacionárias, por sua vez, a concentração de tampão mostrou um pequeno efeito na retenção de solutos básicos com as fases estacionárias comerciais, que retêm solutos básicos principalmente por interação hidrofóbicas (Capítulo 3)

A comparação de uma fase estacionária PMTDS-SiO<sub>2</sub>, com 17% de carbono com uma fase estacionária PMOS-SiO<sub>2</sub> com a mesma percentagem de carbono, ambas preparadas com o mesmo tipo de sílica, foi feita utilizando misturas de fármacos, agroquímicos e de compostos benzodiazepínicos. Ambas as fases estacionárias apresentaram seletividades distintas na separação de fármacos básicos e compostos diazepínicos devido às diferentes interações sinérgicas que ocorrem entre os silanóis livres com o polissiloxano imobilizado sobre a sílica. Já a separação dos agroquímicos, que são solutos neutros não ionizáveis, foi praticamente idêntica em ambas as fases estacionárias. Adicionalmente, as fases estacionárias PMTDS-SiO<sub>2</sub> também apresentaram alta estabilidade em fase móvel ácida e baixa estabilidade em fase móvel alcalina, como foi mostrado para as fases estacionárias PMOS-SiO<sub>2</sub> no Capítulo 6, o que já era esperado uma vez que as ligações Si-C no PMTDS ou em qualquer outro polissiloxano são estericamente protegidas, além do fato dos serem imobilizados sobre a superfície da sílica na forma de gotas [2], deixando vários dos silanóis desprotegidos

## **Conclusões gerais e propostas futuras**

As fases estacionárias preparadas pela imobilização térmica do poli(metiloctilsiloxano) (PMOS) ou do poli(metiltetradecilsiloxano) (PMTDS) sobre a superfície da sílica (PMOS-SiO<sub>2</sub> e PMTDS-SiO<sub>2</sub>, respectivamente) apresentaram altas propriedades de troca-iônica em fase móvel neutra para solutos básicos devido a interações sinérgicas entre o polímero depositado sobre a superfície da

sílica com os silanóis residuais, formando sítios altamente retentivos, uma vez que, a intensidade das interações iônicas são multiplicadas pelas interações hidrofóbicas nestes sítios conforme o modelo de Neue et al., [1]. Com isso, o aumento da quantidade de polissiloxano imobilizado sobre a superfície da sílica ocasiona um aumento exponencial dos fatores de retenção dos solutos básicos (devido ao aumento da quantidade destes sítios) já que os polissiloxanos se depositam sobre a superfície da sílica na forma de gotas [2].

A alta participação de fenômenos de troca-iônica na retenção de solutos básicos em fases estacionárias PMOS-SiO<sub>2</sub> e PMTDS-SiO<sub>2</sub> não ocasiona formatos de picos assimétricos ou baixas eficiências na análise de solutos básicos. Porém, observou-se que estas fases estacionárias apresentaram fatores de assimetria próximos a unidade e alta eficiência para solutos básicos. Adicionalmente, a participação de fenômenos de troca-iônica na retenção de solutos básicos nestas fases faz com que variações no pH da fase móvel, o uso de diferentes tipos e concentrações de tampão causem grandes variações na retenção e na seletividade.

A comparação dos resultados obtidos com as fases estacionárias PMOS-SiO<sub>2</sub> e PMTDS-SiO<sub>2</sub> indicam que as PMTDS-SiO<sub>2</sub> são mais retentivas para solutos básicos que as PMOS-SiO<sub>2</sub>. Isso é devido, provavelmente, a interações sinérgicas mais intensas dos silanóis residuais com PMTDS do que com o PMOS. As diferentes interações sinérgicas que ocorrem nas fases estacionárias PMOS-SiO<sub>2</sub> e PMTDS-SiO<sub>2</sub> também conferem seletividades distintas para estas fases na análise de compostos básicos. Porém, as propriedades hidrofóbicas destas fases estacionárias parecem ser semelhantes, e ambas as fases estacionárias fornecem separações quase que idênticas para uma mistura de agroquímicos, como foi mostrado no capítulo 7.

A exposição dos silanóis residuais (que conferem altas propriedades de troca iônica às fases PMOS-SiO<sub>2</sub> e PMTDS-SiO<sub>2</sub>) também confere instabilidade às mesmas em meio alcalino com tampões fosfato e carbonato. Esta instabilidade em meio alcalino não é um fator agravante, pois o uso de fases móveis alcalinas suprime as interações de troca-iônica. Por isso, o uso de fases móveis alcalinas

não é interessante para as fases estacionárias desenvolvidas. No entanto, as fases PMOS-SiO<sub>2</sub> e PMTDS-SiO<sub>2</sub> podem ser utilizadas em meio alcalino com tampões amino devido ao menor pH<sub>w</sub><sup>s</sup> das fases móveis preparadas com este tampão (veja a Tabela 2.3). Ainda, as fases PMOS-SiO<sub>2</sub> e PMTDS-SiO<sub>2</sub> são altamente estáveis em meio ácido devido ao impedimento estérico das ligações Si-C nos polissiloxanos.

Como proposta futura, sugere-se a utilização de fases estacionárias com percentagem intermediária de carbono na análise de solutos básicos, evitando assim fatores de retenção excessivos e, conseqüentemente, tempos de análise elevados. Uma vez que mudanças no pH da fase móvel e o uso de diferentes tipos e concentrações de tampão causem grande variação na retenção e na seletividade de solutos básicos, estas variáveis devem ser exploradas para melhorar a qualidade das separações, respeitando o limite de estabilidade destas fases estacionárias, que abrange fases móveis ácidas e neutras à temperatura ambiente. Também é necessário estudar a aplicação destas fases estacionárias para resolver problemas reais, já que nosso grupo de pesquisa desenvolve fases estacionárias preparadas pela imobilização de polissiloxanos sobre a superfície da sílica há mais de 20 anos sem ter mostrado as suas versatilidades em realizar separações difíceis.

## Referências

1. U.D. Neue, K.V. Tran, A. Méndez, P.W. Carr, J.Chromatogr.A 1063 (2005) 35–45.
2. K. E. Collins, M. L. M. M. Granja, R. G. Pereira Filho, T. A. Anazawa, I. C. S. F. Jardim, Chromatographia 45 (1997) 99-103