Waters

Studies on the Selectivity in RPLC

Uwe Dieter Neue, Alberto Méndez and John E. O'Gara
Waters Corporation, Chemistry Operations, Milford, MA, USA

Introduction

The properties of stationary phases are not static, they change with the composition and nature of the mobile phase. Because of that we wanted to study chromatographic selectivity in a broader way than is possible with a single mobile phase test. In our study a set of 15 columns was tested in 6 mobile phase conditions with 70 probes of different functionalities and structures. We used gradients of the more commonly used organic modifiers, methanol and acetonitrile, and worked in the full range of pH that each column allowed. These conditions generated different degrees of ionization, which modified the characteristics of the compounds and created changes in the selectivity of the stationary phases.

Experimental

Stationary phases

Column dimensions 4.6x50mm **Particle size** 5 µm
Temperature 30ºC.

XTerra® MS C_{18}, MS C_8, RP_{18}, RP_8, Phenyl
Symmetry® C_{18}, C_8, C_4, C_1, SymmetryShield® RP_{18}
Atlantis® dC_{18}
Hybrid Pentafluorophenyl (PFP), Tridecafluorooctyl (TDFO), Cyano, Adamantylethyl

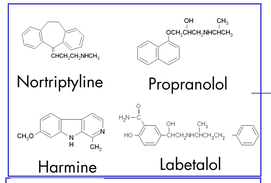
Flow 1ml/min (0.8 ml/min to UV and 0.2 ml/min to MS).
Organic modifiers MeOH and ACN.

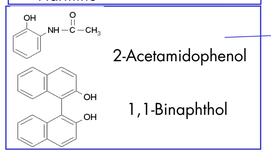
Buffers
- Ammonium formate pH 3.0
- Ammonium phosphate pH 7.0
- Ammonium bicarbonate pH 10.0

Gradient

Time	%A	%B	%C
0	5	90	5
20	5	0	95
22	5	0	95

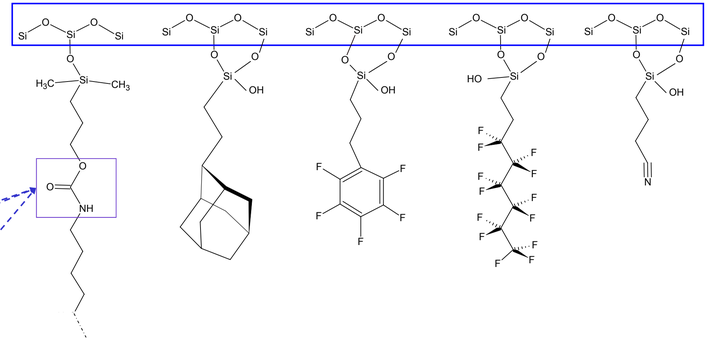
A 10mM Buffer B Water C Organic

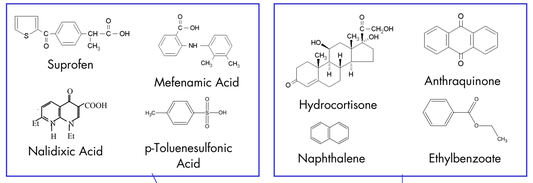




Uncommon stationary phases

EPG Embedded Polar Group
ADA Adamantylethyl
PFP Pentafluorophenyl
TDFO Tridecafluorooctyl
CN





Compounds

BASES
Amitriptyline
Imipramine
Nortriptyline

Doxepin
Alprenolol
Propranolol
Pindolol
N-Acetyl procainamide
Diphenhydramine
Hydroxizine
Terfenadine
Oxybutynin

Promazine

Clemastine
Ranitidine
Harmine
Labetalol HCl
2-Benzylamino 4-methylpyridine

Quinidine

MIXED FUNCTIONS
Furosemide
Norfloxacin
4-Aminobenzoic Acid

L-aspartic acid
L-arginine
Ciprofloxacin
Tolmetin
Caffeine

PHENOLS
4-Nitrophenol

4-Acetamidophenol

2-Acetamidophenol
Purpurin
2,7- Dihydroxynaphtalene
1,1-Binaphthol

(-) Epicatechin
2,4,6-Trihydroxyacetophenone

ACIDS
Ibuprofen
Suprofen
Ketoprofen

Indoprofen
Fenoprofen
Meclofenamic Acid
Mefenamic Acid
Nalidixic acid
L-Ascorbic Acid
1-Hexanesulfonic Acid
4-Chlorobenzenesulfonic Acid
p-Toluene Sulfonic Acid
meso-2,3-Dimercaptosuccinic Acid

4-Dodecyloxybenzoic Acid

QUATERNARY AMINES
Tetrabutylammonium bromide

Berberine (Chloride)

Bretylium (Tosylate)

SULFONAMIDES
Amiloride
Benzthiazide
Bendroflumethiazide
Furazolidine
Sulfamerazide

NON IONIZABLE
Prednisone
Hydrocortisone
Prednisolone

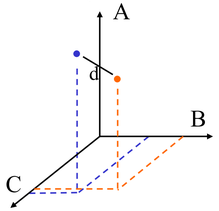
β-Estradiol
Toluene
Naphthalene
Antracene
Anthraquinone
Nabumetone
Propiophenone
Octanophenone
Ethylbenzoate

Acetanilide
n-Butyl-p-Aminobenzoate
Benzocaine
Maltose
alpha-D-Glucose

Analysis of the data

To establish the differences in selectivity between phases we calculated the distance between the representation of the retention of the compounds in a multidimensional space, where the dimensions are the different mobile phases used.
We averaged the differences of all the compounds for two given phases, getting an estimation of the differences in retention between these two phases.
Finally we normalized these averaged values between all the possible pairs of columns, getting a relative value of the difference in selectivity between the different stationary phases and allowing a comparison of the differences in selectivity between phases.
To see specific differences in the selectivity we repeated the same process with specific sets of compounds. A value of 1 represents the largest difference in selectivity.

Example



A, B and C: Retention times in one mobile phase
- Representation of the retention of compound X on column a
- Representation of the retention of compound X on column b

d Difference of the retention of X on column a and column b

Legend

Columns
- I XTerra MSC18
- II XTerra MSC8
- III XTerra RPC18
- IV XTerra RPC8
- V XTerra Phenyl
- VI Symmetry C18
- VII Symmetry C8
- VIII Symmetry 300 C4
- IX Atlantis dC18
- X Hybrid Cyano
- XI Hybrid pentafluorophenyl
- XII Hybrid Tridecafluorooctyl
- XIII Symmetry Shield
- XIV Hybrid Adamanthyl
- XV Symmetry C1

Hybrid base
Silica base

0,00
0,00-0,20
0,20-0,40
0,40-0,60
0,60-0,80
0,80-1,00
1,00

Results

The average values between the differences of all the compounds for each pair of columns are normalized and represented in the tables on the right. When we look at the table with all the compounds included, we see that the highest selectivity differences are found for the Hybrid Cyano column, but to see if this was a general behavior or if this is specific for some group of compounds we can look at the different groups of the compounds present in the group studied.
The Hybrid Cyano column shows the higher differences when neutral compounds are considered. But we can see other individual pairs of columns that show moderate differences in their selectivity. For these compounds the higher differences in selectivity are seen between Hybrid Cyano and XTerra Phenyl columns, instead of Hybrid PFP as in all the other cases. The fact that the highest differences are always between the Hybrid Cyano and an aromatic ring phase is related to $\pi-\pi$ interactions.
For the acidic compounds the Hybrid Cyano column showed again a high selectivity difference, while all the other columns gave lower values, all below 0.4. These differences indicate a specific interaction between acidic compounds and this phase.
Phenolic compounds show a similar behavior as acidic compounds, which is not surprising since they are deprotonated at high pH. They show however slightly higher differences in selectivity than the acids, especially for Symmetry 300 C_4 and Hybrid TDFO phases.
When basic compounds are analyzed the highest differences are obtained with the PFP phase compared to all the other columns. This behavior is observed to a lesser extent for the Hybrid Cyano and the Symmetry C1 phases. The higher differences in selectivity of the PFP column versus the others can be explained since this phase is negatively charged on the surface, even at acidic pH values, giving a specific interaction with the basic compounds which can be positively charged.

All compounds

Columns	I	II	III	IV	V	VI	VII	VIII	IX	X	XI	XII	XIII	XIV	XV	Columns
I	0,00	0,18	0,30	0,40	0,35	0,18	0,41	0,31	0,24	0,93	0,53	0,44	0,23	0,34	0,42	I
II	0,18	0,00	0,28	0,34	0,21	0,27	0,33	0,25	0,23	0,92	0,45	0,35	0,27	0,28	0,34	II
III	0,30	0,28	0,00	0,15	0,38	0,30	0,45	0,32	0,34	0,88	0,55	0,44	0,20	0,45	0,38	III
IV	0,40	0,34	0,15	0,00	0,40	0,41	0,48	0,33	0,41	0,88	0,57	0,46	0,31	0,53	0,43	IV
V	0,35	0,21	0,38	0,40	0,00	0,42	0,31	0,34	0,28	0,97	0,34	0,37	0,38	0,27	0,34	V
VI	0,18	0,27	0,30	0,41	0,42	0,00	0,43	0,43	0,29	0,61	0,52	0,38	0,21	0,36	0,44	VI
VII	0,41	0,33	0,45	0,48	0,31	0,43	0,00	0,53	0,35	0,79	0,40	0,39	0,40	0,33	0,38	VII
VIII	0,31	0,25	0,32	0,33	0,34	0,43	0,53	0,00	0,37	0,51	0,48	0,25	0,44	0,41	0,45	VIII
IX	0,24	0,23	0,34	0,41	0,28	0,29	0,35	0,37	0,00	0,66	0,35	0,33	0,30	0,23	0,36	IX
X	0,93	0,92	0,88	0,88	0,97	0,61	0,79	0,51	0,66	0,00	1,00	0,68	0,6	0,97	0,64	X
XI	0,53	0,45	0,55	0,57	0,34	0,52	0,40	0,48	0,35	1,00	0,00	0,42	0,45	0,36	0,39	XI
XII	0,44	0,35	0,44	0,46	0,37	0,38	0,39	0,25	0,33	0,68	0,42	0,00	0,35	0,40	0,35	XII
XIII	0,23	0,27	0,20	0,31	0,38	0,21	0,40	0,44	0,30	0,6	0,45	0,35	0,00	0,34	0,36	XIII
XIV	0,34	0,28	0,45	0,53	0,27	0,36	0,33	0,41	0,23	0,97	0,36	0,40	0,34	0,00	0,30	XIV
XV	0,42	0,34	0,38	0,43	0,34	0,44	0,38	0,45	0,36	0,64	0,39	0,35	0,36	0,30	0,00	XV
Columns	I	II	III	IV	V	VI	VII	VIII	IX	X	XI	XII	XIII	XIV	XV	Columns

Neutral compounds

Columns	I	II	III	IV	V	VI	VII	VIII	IX	X	XI	XII	XIII	XIV	XV	Columns
I	0,00	0,16	0,23	0,31	0,29	0,18	0,51	0,30	0,17	0,91	0,39	0,35	0,19	0,31	0,31	I
II	0,16	0,00	0,22	0,28	0,16	0,23	0,42	0,29	0,10	0,95	0,31	0,31	0,18	0,26	0,22	II
III	0,23	0,22	0,00	0,09	0,29	0,28	0,53	0,28	0,23	0,95	0,42	0,41	0,17	0,42	0,30	III
IV	0,31	0,28	0,09	0,00	0,31	0,34	0,54	0,29	0,27	0,95	0,45	0,44	0,22	0,47	0,31	IV
V	0,29	0,16	0,29	0,31	0,00	0,33	0,33	0,38	0,15	1,00	0,26	0,34	0,23	0,27	0,21	V
VI	0,18	0,23	0,28	0,34	0,33	0,00	0,53	0,40	0,23	0,55	0,37	0,28	0,19	0,26	0,35	VI
VII	0,51	0,42	0,53	0,54	0,33	0,53	0,00	0,68	0,37	0,86	0,30	0,42	0,46	0,38	0,42	VII
VIII	0,30	0,29	0,28	0,29	0,38	0,40	0,68	0,00	0,37	0,45	0,48	0,34	0,42	0,39	0,32	VIII
IX	0,17	0,10	0,23	0,27	0,15	0,23	0,37	0,37	0,00	0,59	0,21	0,18	0,17	0,15	0,25	IX
X	0,91	0,95	0,95	0,95	1,00	0,55	0,86	0,45	0,59	0,00	0,97	0,71	0,58	0,88	0,59	X
XI	0,39	0,31	0,42	0,45	0,26	0,37	0,30	0,48	0,21	0,97	0,00	0,30	0,25	0,26	0,29	XI
XII	0,35	0,31	0,41	0,44	0,34	0,28	0,42	0,34	0,18	0,71	0,30	0,00	0,24	0,27	0,25	XII
XIII	0,19	0,18	0,17	0,22	0,23	0,19	0,46	0,42	0,17	0,58	0,25	0,24	0,00	0,25	0,32	XIII
XIV	0,31	0,26	0,42	0,47	0,27	0,26	0,38	0,39	0,15	0,88	0,26	0,27	0,25	0,00	0,23	XIV
XV	0,31	0,22	0,30	0,31	0,21	0,35	0,42	0,32	0,25	0,59	0,29	0,25	0,32	0,23	0,00	XV
Columns	I	II	III	IV	V	VI	VII	VIII	IX	X	XI	XII	XIII	XIV	XV	Columns

Acidic compounds

Columns	I	II	III	IV	V	VI	VII	VIII	IX	X	XI	XII	XIII	XIV	XV	Columns
I	0,00	0,14	0,21	0,32	0,26	0,08	0,31	0,25	0,17	0,93	0,32	0,36	0,09	0,20	0,25	I
II	0,14	0,00	0,19	0,26	0,16	0,18	0,24	0,18	0,19	0,95	0,28	0,33	0,14	0,16	0,19	II
III	0,21	0,19	0,00	0,12	0,26	0,21	0,32	0,21	0,25	0,79	0,30	0,25	0,11	0,28	0,26	III
IV	0,32	0,26	0,12	0,00	0,30	0,30	0,34	0,25	0,33	0,76	0,34	0,27	0,19	0,36	0,30	IV
V	0,26	0,16	0,26	0,30	0,00	0,29	0,17	0,25	0,24	1,00	0,23	0,34	0,26	0,17	0,17	V
VI	0,08	0,18	0,21	0,30	0,29	0,00	0,33	0,30	0,20	0,50	0,31	0,26	0,14	0,20	0,27	VI
VII	0,31	0,24	0,32	0,34	0,17	0,33	0,00	0,36	0,30	0,66	0,21	0,26	0,31	0,18	0,21	VII
VIII	0,25	0,18	0,21	0,25	0,25	0,30	0,36	0,00	0,24	0,54	0,28	0,17	0,26	0,27	0,29	VIII
IX	0,17	0,19	0,25	0,33	0,24	0,20	0,30	0,24	0,00	0,59	0,23	0,26	0,21	0,15	0,22	IX
X	0,93	0,95	0,79	0,76	1,00	0,50	0,66	0,54	0,59	0,00	0,92	0,69	0,41	0,99	0,58	X
XI	0,32	0,28	0,30	0,34	0,23	0,31	0,24	0,28	0,23	0,92	0,00	0,26	0,27	0,22	0,16	XI
XII	0,36	0,33	0,25	0,27	0,34	0,26	0,26	0,17	0,26	0,69	0,26	0,00	0,19	0,36	0,22	XII
XIII	0,09	0,14	0,11	0,19	0,26	0,14	0,31	0,26	0,21	0,41	0,27	0,19	0,00	0,19	0,26	XIII
XIV	0,20	0,16	0,28	0,36	0,17	0,20	0,18	0,27	0,15	0,99	0,22	0,36	0,19	0,00	0,15	XIV
XV	0,25	0,19	0,26	0,30	0,17	0,27	0,21	0,29	0,22	0,58	0,16	0,22	0,26	0,15	0,00	XV
Columns	I	II	III	IV	V	VI	VII	VIII	IX	X	XI	XII	XIII	XIV	XV	Columns

Phenolic compounds

Columns	I	II	III	IV	V	VI	VII	VIII	IX	X	XI	XII	XIII	XIV	XV	Columns
I	0,00	0,13	0,27	0,35	0,23	0,11	0,38	0,21	0,21	0,76	0,35	0,34	0,31	0,18	0,31	I
II	0,13	0,00	0,22	0,28	0,13	0,16	0,34	0,18	0,20	0,78	0,31	0,30	0,29	0,16	0,26	II
III	0,27	0,22	0,00	0,11	0,20	0,21	0,28	0,32	0,17	0,93	0,22	0,45	0,17	0,23	0,20	III
IV	0,35	0,28	0,11	0,00	0,21	0,29	0,28	0,37	0,25	0,96	0,22	0,47	0,21	0,29	0,23	IV
V	0,23	0,13	0,20	0,21	0,00	0,23	0,28	0,27	0,23	0,84	0,29	0,32	0,28	0,18	0,24	V
VI	0,11	0,16	0,21	0,29	0,23	0,00	0,34	0,30	0,17	0,62	0,29	0,27	0,23	0,16	0,29	VI
VII	0,38	0,34	0,28	0,28	0,28	0,34	0,00	0,50	0,22	0,87	0,19	0,42	0,20	0,24	0,23	VII
VIII	0,21	0,18	0,32	0,37	0,27	0,30	0,50	0,00	0,38	0,40	0,44	0,14	0,48	0,30	0,40	VIII
IX	0,21	0,20	0,17	0,25	0,23	0,17	0,22	0,38	0,00	0,72	0,18	0,33	0,18	0,13	0,17	IX
X	0,76	0,78	0,93	0,96	0,84	0,62	0,87	0,40	0,72	0,00	1,00	0,56	0,81	0,86	0,77	X
XI	0,35	0,31	0,22	0,22	0,29	0,29	0,19	0,44	0,18	1,00	0,00	0,48	0,15	0,24	0,17	XI
XII	0,34	0,30	0,45	0,47	0,32	0,27	0,42	0,14	0,33	0,56	0,48	0,00	0,41	0,37	0,35	XII
XIII	0,31	0,29	0,17	0,21	0,28	0,23	0,20	0,46	0,18	0,81	0,15	0,41	0,00	0,24	0,23	XIII
XIV	0,18	0,16	0,23	0,29	0,18	0,16	0,24	0,30	0,13	0,86	0,24	0,37	0,24	0,00	0,22	XIV
XV	0,31	0,26	0,20	0,23	0,24	0,29	0,23	0,40	0,17	0,77	0,17	0,35	0,23	0,22	0,00	XV
Columns	I	II	III	IV	V	VI	VII	VIII	IX	X	XI	XII	XIII	XIV	XV	Columns

Basic compounds

Columns	I	II	III	IV	V	VI	VII	VIII	IX	X	XI	XII	XIII	XIV	XV	Columns
I	0,00	0,25	0,38	0,46	0,48	0,28	0,28	0,36	0,32	0,76	0,80	0,45	0,32	0,58	0,56	I
II	0,25	0,00	0,38	0,37	0,28	0,43	0,22	0,21	0,31	0,67	0,67	0,26	0,42	0,46	0,48	II
III	0,38	0,38	0,00	0,20	0,62	0,39	0,48	0,41	0,54	0,61	0,98	0,47	0,27	0,73	0,49	III
IV	0,46	0,37	0,20	0,00	0,59	0,53	0,50	0,34	0,58	0,63	0,85	0,46	0,44	0,76	0,56	IV
V	0,48	0,28	0,62	0,59	0,00	0,65	0,29	0,32	0,37	0,77	0,48	0,32	0,64	0,35	0,56	V
VI	0,28	0,43	0,39	0,53	0,65	0,00	0,41	0,56	0,48	0,66	0,90	0,55	0,22	0,68	0,59	VI
VII	0,28	0,22	0,48	0,50	0,29	0,41	0,00	0,37	0,26	0,60	0,53	0,31	0,43	0,35	0,50	VII
VIII	0,36	0,21	0,41	0,34	0,32	0,56	0,37	0,00	0,44	0,50	0,60	0,19	0,53	0,48	0,50	VIII
IX	0,32	0,31	0,54	0,58	0,37	0,48	0,26	0,44	0,00	0,58	0,58	0,39	0,49	0,39	0,53	IX
X	0,76	0,67	0,61	0,63	0,77	0,66	0,60	0,50	0,58	0,00	1,00	0,53	0,57	0,76	0,43	X
XI	0,80	0,67	0,98	0,98	0,48	0,90	0,53	0,60	0,58	1,00	0,00	0,60	0,90	0,48	0,76	XI
XII	0,45	0,26	0,47	0,46	0,32	0,55	0,31	0,19	0,39	0,53	0,60	0,00	0,50	0,41	0,40	XII
XIII	0,32	0,42	0,27	0,44	0,64	0,22	0,43	0,53	0,49	0,57	0,90	0,50	0,00	0,66	0,48	XIII
XIV	0,58	0,46	0,73	0,76	0,35	0,68	0,35	0,48	0,39	0,76	0,48	0,41	0,66	0,00	0,47	XIV
XV	0,56	0,48	0,49	0,56	0,56	0,59	0,50	0,50	0,53	0,43	0,76	0,40	0,48	0,47	0,00	XV
Columns	I	II	III	IV	V	VI	VII	VIII	IX	X	XI	XII	XIII	XIV	XV	Columns