

Анализ трициклических антидепрессантов с использованием колонок Agilent Poroshell HPH C18

Методические рекомендации

Низкомолекулярные лекарственные препараты

Автор

Уильям Лонг (William Long)
Agilent Technologies, Inc.

Введение

Трициклические антидепрессанты были открыты в начале пятидесятих годов двадцатого века и появились на рынке спустя десятилетие. Их химическая структура включает три цикла. С ними тесно связана группа тетрациклических антидепрессантов, которые содержат четыре цикла.

Циклические антидепрессанты были одними из первых разработанных антидепрессантов. Зачастую они заменяются более новыми препаратами, которые вызывают меньше побочных эффектов, но по-прежнему хорошо подходят многим людям. Принцип действия циклических антидепрессантов состоит в повышении уровня нейромедиаторов, в частности серотонина и норадреналина, в мозге. Это улучшает коммуникацию клеток мозга, что, в свою очередь, положительно влияет на настроение. Трициклические антидепрессанты из группы третичных аминов, такие как доксепин и амитриптилин, являются более сильнодействующими ингибиторами обратного захвата серотонина, чем вторичные амины, например нортриптилин и дезипрамин [1,2,3].



Agilent Technologies

Трициклические амины также широко используются в качестве хроматографических тест-молекул. На рис. 1 показано, что эти соединения обладают высокими значениями рКа: от 9,2 до 9,6. При рН 7,0 силанольные группы силикагеля находятся в ионизированной форме, и основные зонды, такие как трициклические антидепрессанты, сильно протонированы. При нейтральном рН при контакте с силанольными группами силикагеля трициклические антидепрессанты вступают в ионообменные взаимодействия. Чем больше контакт с силанольными группами, тем сильнее проявляется размытие хвостов пиков. В качестве показателя активности силанольных групп используется коэффициент асимметрии пика амитриптилина [4].

В данной работе проводится сравнение рабочих характеристик колонок Agilent Poroshell HPH C18 и колонок другого производителя для анализа трициклических антидепрессантов.

Экспериментальная часть

Использовалась система ВЭЖХ Agilent 1260 Infinity, включающая следующие компоненты:

- бинарный насос серии Agilent 1260 Infinity SL, способный создавать давление до 600 бар (G1312B);
- термостат колоночного отделения Agilent 1260 Infinity (G1316C);
- высокоэффективный автосамплер Agilent 1260 Infinity SL Plus (G1376C);
- детектор на основе диодной матрицы Agilent 1260 Infinity (G4212A), оснащенный проточной кюветой объемом 1 мл с длиной оптического пути 10 мм (G4212-60008).

В данном исследовании применялись следующие колонки:

- Agilent Poroshell HPH C18, 3 × 100 мм, размер частиц сорбента 2,7 мкм (кат. № 695975-502);
- Agilent Poroshell HPH C18, 3 × 100 мм, размер частиц сорбента 4 мкм (кат. № 695970-502);
- новые колонки от другого производителя с пористыми сорбентами, устойчивые к высоким значениям рН, 3 × 100 мм, размер частиц сорбента 2,6 и 5 мкм.

Для управления прибором и обработки данных использовалось программное обеспечение Agilent ChemStation версии C.1.05.

Исследовали ряд соединений: урацил (50 мкг/мл), доксепина гидрохлорид (250 мкг/мл), нортриптилина гидрохлорид (500 мкг/мл), амитриптилина гидрохлорид (250 мкг/мл) и тримипрамина малаат (500 мкг/мл). Все препараты были приобретены у компании Sigma-Aldrich, Corp. и применялись в виде водных растворов. На рис. 1 показаны структуры и подробные сведения о соединениях. Дигидрат двухосновного фосфата натрия и дигидрат одноосновного фосфата натрия также были приобретены у компании Sigma-Aldrich. Из их приготовленных по отдельности растворов с концентрацией 20 мМ готовили буферную смесь с рН 7,0, контролируя рН посредством титрования. Ацетонитрил был приобретен у компании Honeywell

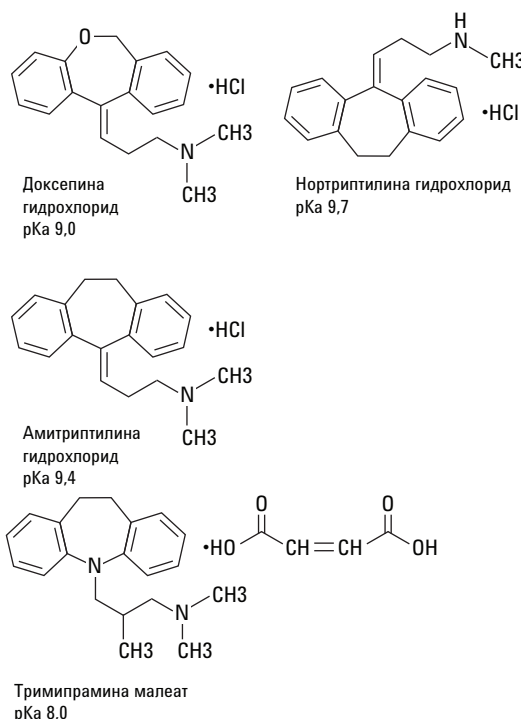


Рис. 1. Структуры трициклических аминов

(Burdick and Jackson). Фильтрация воды была проведена с помощью системы Milli-Q (Millipore) с фильтрами с размером пор 0,2 мкм и удельным сопротивлением воды на выходе 18 МОм·см. Для оценки колонок использовалась подвижная фаза, состоящая из предварительно подготовленной смеси 60% ацетонитрила и 40% натрий-фосфатного буфера с концентрацией 20 мМ. Перед тестированием колонки подогревались до 25 °С и уравнивались при скорости потока 1 мл/мин в течение 10 минут.

Результаты и обсуждение

Как показано на рис. 1, значения рКа трициклических антидепрессантов находятся в пределах между 8 и 10, что позволяет однозначно классифицировать их как основные соединения. Пробы, содержащие ионизируемые соединения, такие как основания, как правило, лучше разделяются при значениях рН подвижной фазы 3 или ниже. При таком рН возможные взаимодействия с силанольными группами колонки сводятся к минимуму. При рН 5,5 и выше остаточные силанольные группы на поверхности колонки могут присутствовать в виде О⁻. Эти отрицательно заряженные силанольные группы на поверхности могут участвовать в ионно-обменных взаимодействиях с положительно заряженными основными соединениями. Это порождает наиболее распространенный тип размытия хвостов пиков. Однако оптимальные результаты многих разделений достигаются при средних (4–8) и высоких значениях рН (>9), поскольку компоненты проб нестабильны при низких рН. Основные соединения протонируются при низком рН и элюируются слишком быстро, или же разрешение пиков при низком рН оказывается недостаточным.

Специалисты по хроматографии знают, что обычные колонки на основе силикагеля, как правило, не рекомендуется использовать для работы при высоких значениях pH (например, pH > 8) из-за возможного растворения силикагелевого носителя и последующего отказа колонки. Могут возникнуть проблемы с разделением, рассчитанными на работу в диапазоне pH 6–8. Растворимость силикагелевого носителя в этом диапазоне pH может быть весьма значительной, поэтому воспроизводимость разделения и срок службы колонки меньше ожидаемых значений. Было документально подтверждено, что разрушение колонок на основе силикагеля при средних (и высоких) значениях pH в значительной степени определяется растворением силикагелевой основы, а не потерей привитой органической фазы вследствие гидролиза [5]. Кроме того, было обнаружено, что растворимость силикагелевого носителя в диапазоне pH 6–8 значительно возрастает в присутствии фосфатных буферов, в частности при более высоких температурах и концентрациях буфера [6].

Как было показано, колонки Agilent Poroshell HPH C18 устойчивы в буферном растворе на основе гидрокарбоната аммония и в фосфатном буферном растворе, в результате чего эта колонка получила широкое распространение при работе со средними и высокими значениями pH. Опубликованы варианты использования этих колонок с фосфатным/боратным буферным раствором, триэтаноламиновым/фосфатным буферным раствором, а также фосфатным буфером и буферами на основе гидроксида аммония и гидрокарбоната аммония. Благодаря применению

Agilent Poroshell HPH C18 специалисты по хроматографии могут воспользоваться преимуществами высокой эффективности колонок с пористыми сорбентами и длительного срока службы при высоких значениях pH или температуры [7,8,9].

На рис. 2 показаны хроматограммы, полученные с использованием колонок Poroshell HPH C18, колонки (А) с размером частиц сорбента 4 мкм и колонки (В) с размером частиц сорбента 2,7 мкм. Размеры обеих колонок составляли 3 × 100 мм. Спрос на такие размеры растет, поскольку они позволяют использовать меньше растворителя, чем колонки с обычно использовавшимся ранее внутренним диаметром 4,6 мм. Меньшее количество растворителя означает снижение эксплуатационных расходов, связанных с его приобретением и утилизацией. Колонки размером 3 × 100 мм также часто используются в сочетании с масс-спектрометрией. Как видно из сводной таблицы и на хроматограмме, все пики имеют хорошую форму с минимальным коэффициентом асимметрии. Максимальная эффективность, измеренная по пику тримипрамина, на колонке с размером частиц 2,7 мкм составляет 15 679, а на колонке с размером частиц 4 мкм — 8 616. Обе колонки удобны в эксплуатации на приборах, работающих при давлении 400 бар, для колонки с размером частиц 2,7 мкм давление составило 280 бар, а для колонки с размером частиц 4 мкм — 143 бар. Время удерживания на колонке с размером частиц 4 мкм немного меньше, чем на колонке с размером частиц 2,7 мкм, но порядок элюирования и селективность в отношении рассмотренных соединений схожи, что свидетельствует о масштабируемости колонок.

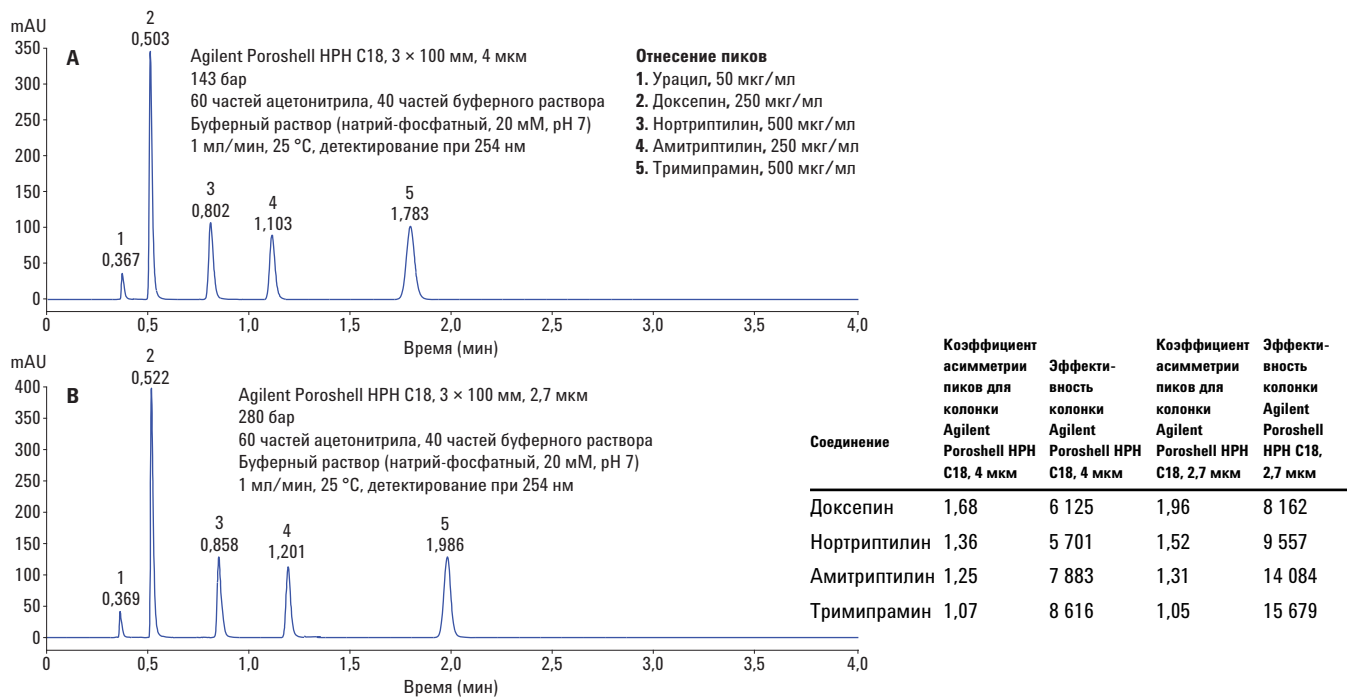


Рис. 2. Смесь трициклических антидепрессантов в фосфатном буферном растворе при pH 7 на колонках Agilent Poroshell HPH C18

На рис. 3 показаны хроматограммы, полученные с использованием двух колонок от другого производителя с поверхностно-пористыми сорбентами, устойчивых к высоким значениям pH. На хроматограммах видно, что форма пиков трициклических аминов уступает полученным на колонках Poroshell HPH C18 (см. рис. 2). Из-за худшей формы пиков основных соединений эффективность колонки от другого производителя с размером частиц 2,6 мкм ниже по сравнению с колонкой Poroshell HPH C18 с размером частиц 2,7 мкм. Хотя давление для колонки от другого производителя с размером частиц 5 мкм ниже, чем для колонки Poroshell HPH с размером частиц 4 мкм, различие несущественно.

Выводы

Было показано, что колонки Agilent Poroshell HPH C18 отличаются стойкостью в буферном растворе гидрокарбоната аммония и фосфатном буферном растворе при высоких и средних значениях pH, что делает их хорошим выбором для специалистов по хроматографии. В данном обзоре превосходная форма пиков на колонке Poroshell HPH C18 сравнивается с колонками другого изготовителя. Поскольку форма пиков влияет на эффективность колонки, не следует недооценивать ее значение, особенно при анализе основных фармацевтических препаратов.

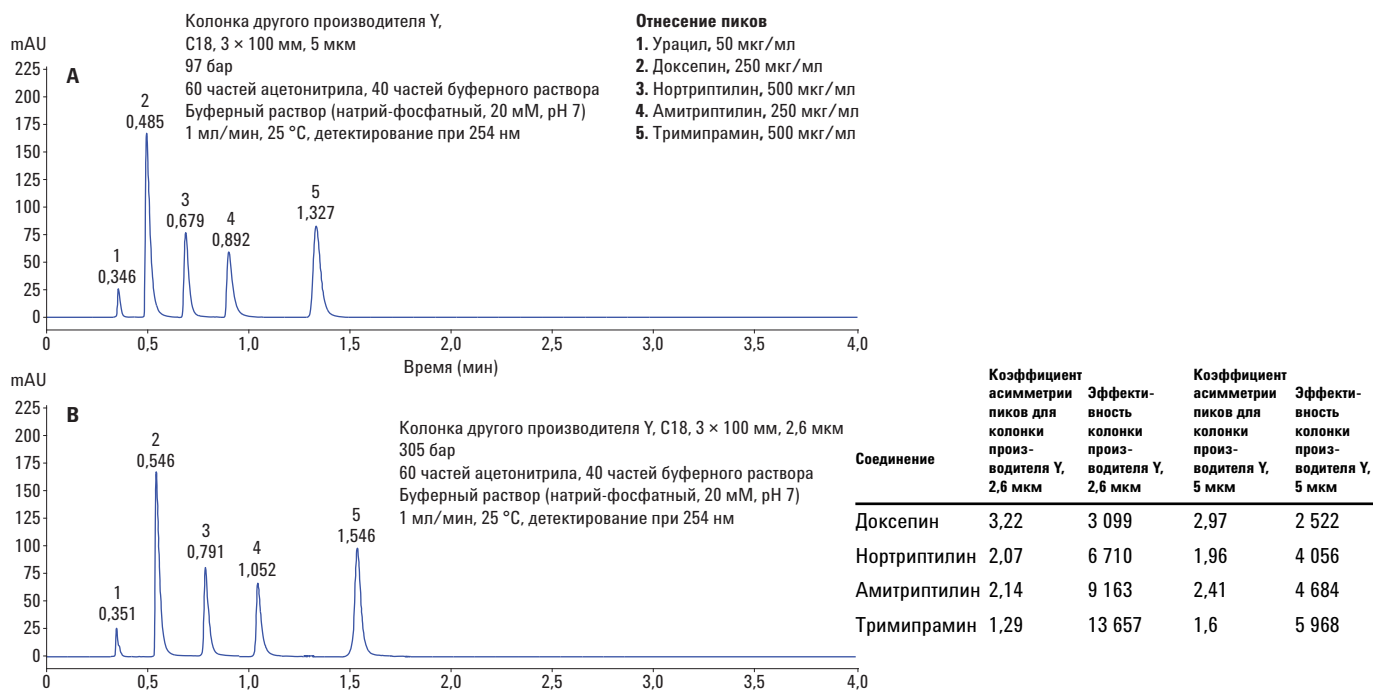


Рис. 3. Смесь трициклических антидепрессантов в фосфатном буферном растворе при pH 7 на колонках с поверхностно-пористыми сорбентами другого производителя

Литература

1. Tricyclic antidepressants and tetracyclic antidepressants (Трициклические и тетрациклические антидепрессанты). <http://www.mayoclinic.org/diseases-conditions/depression/in-depth/antidepressants/art-20046983>.
2. Tricyclic antidepressants (Трициклические антидепрессанты). https://en.wikipedia.org/wiki/Tricyclic_antidepressant
3. Doxepin (Доксепин). <http://www.drugbank.ca/drugs/DB01142>
4. Цзин Л. Л. (Jing, L. L.); Цзян Р. (Jiang, R.); Лю П. (Liu, P.); Ван П. (Wang, P.); Ши Т. (Shi, T. Y.); Сунь Кс. (Sun, X.) Selectivity differences between alkyl and polar modified alkyl phases in reversed phase high performance liquid chromatography (Различие в селективности алкильных привитых фаз и модифицированных полярными группами алкильных привитых фаз в обращенно-фазовой ВЭЖХ). *J. Sep. Sci.* **2009**, *32*, 212–220.
5. Киркланд Дж. Дж. (Kirkland, J. J.); Хендерсон Дж. В. (Henderson, J. W.); Дестефано Дж. Дж. (DeStefano, J. J.); ван Стратен М. А. (van Straten, M. A.); Классен Х. А. (Claessens, H. A.) Stability of silica-based, endcapped columns with pH 7 and 11 mobile phases for reversed-phase high-performance liquid chromatography (Устойчивость колонок на основе силикагеля с блокированием концевых групп для обращенно-фазовой ВЭЖХ при использовании подвижных фаз с рН 7 и 11). *J. Chromatogr. A* **1997**, *762*, 97–112.
6. Классен Х. (Claessens, H.); ван Стратен М. А. (van Straten, M. A.); Киркланд Дж. Дж. (Kirkland, J. J.) Effect of buffers on silica-based column stability in reversed-phase high-performance liquid chromatography (Влияние буферов на устойчивость колонок на основе силикагеля для обращенно-фазовой ВЭЖХ). *J. Chromatogr. A* **1996**, *728*, 259–270.
7. Лун В. Дж. (Long, W. J.); Мак А. Е. (Mack, A. E.); Сяньоли Вон (Xiaoli, Wang); Барбер В. Е. (Barber, W. E.) Selectivity and Sensitivity Improvements for Ionizable Analytes Using High-pH-Stable Superficially Porous Particles (Улучшенные селективность и чувствительность для ионизируемых аналитов с использованием поверхностно-пористых частиц, устойчивых к высоким значениям рН). *LCGC* **2015**, *33* (4).
8. В. Дж. Лун (W. J. Long). *Automated Amino Acid Analysis using an Agilent Poroshell HPH C18 column* (Автоматизированный анализ аминокислот с использованием колонки Agilent Poroshell HPH C18); Методическая информация, Agilent Technologies, номер публикации 5991-5571EN, **2015**.
9. Р. Фу (R. Fu), Кв. Лей (Q. Lei). *Fast Analysis of Oxidative Hair Dyes at High pH with Poroshell HPH C18 and Other Phases* (Скоростной анализ окислительных красок для волос при высоких значениях рН с использованием колонок Poroshell HPH C18 и других неподвижных фаз); Методическая информация, Agilent Technologies, номер публикации 5991-5263EN, **2014**.

Дополнительная информация

Представленные данные отражают типичные результаты.

Для получения дополнительной информации о наших продуктах и услугах посетите наш веб-сайт по адресу: www.agilent.com/chem.

www.agilent.com/chem

Только для исследовательских целей. Не для использования
в диагностических процедурах.

Компания Agilent не несет ответственности за возможные ошибки в настоящем документе, а также за убытки, связанные или являющиеся следствием получения настоящего документа, ознакомления с ним и его использования.

Информация, описания и спецификации в настоящем документе могут быть изменены без предупреждения.

© Agilent Technologies, Inc., 2015
Напечатано в США
7 декабря 2015 г.
5991-6512RU



Agilent Technologies