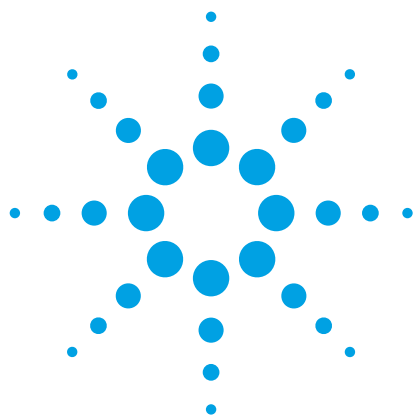




使用 Agilent Poroshell HPH C18 分析 三环抗抑郁药

应用简报

小分子制药

作者

William Long
安捷伦科技有限公司

前言

三环抗抑郁药 (TCA) 于 20 世纪 50 年代早期首次被发现，并于 50 年代后期进入市场。它们的化学结构中包含三个环。四环抗抑郁药包含四个环，是一类与三环抗抑郁药极为相似的抗抑郁化合物。

环状抗抑郁药为首批开发出的抗抑郁药之一。尽管这类药物目前经常被副作用更少的新药取代，但它们仍然是许多患者的良好选择。环状抗抑郁药通过增加血清素和去甲肾上腺素等大脑可用的神经递质来发挥作用。这一作用有助于改善脑细胞通讯，转而对情绪产生影响。与去甲替林和地昔帕明等仲胺类 TCA 相比，多塞平和阿米替林等叔胺类 TCA 是更有效的血清素再摄取抑制剂 [1,2,3]。



Agilent Technologies

三环胺类也是重要的色谱探针。图 1 显示了这些具有高 pKa 值 (9.2 - 9.6) 的化合物的结构。在 pH 为 7.0 的条件下, 硅醇基处于离子化形态, 此时 TCA 等碱性探针处于高度质子化状态。在中性 pH 条件下, 硅醇基解离暴露活性位点与 TCA 发生离子交换作用。如果暴露的硅醇基越多, 峰拖尾就会越严重。阿米替林的拖尾因子可用作硅醇基活性的衡量指标 [4]。

在本研究中, 我们比较了 Agilent Poroshell HPH C18 色谱柱和另一家供应商提供的色谱柱对三环抗抑郁药的分析性能。

实验部分

采用 Agilent 1260 Infinity 液相色谱, 该系统包括:

- Agilent 1260 Infinity SL 型二元泵, 可提供高达 600 bar 的压力 (G1312B)
- Agilent 1260 Infinity 柱温箱 (G1316C)
- Agilent 1260 Infinity SL Plus 型高性能自动进样器 (G1376C)
- Agilent 1260 Infinity 二极管阵列检测器 (G4212A), 配备 10 mm 光程的 1 μ L 流通池 (部件号 G4212-60008)

本研究采用下列色谱柱:

- Agilent Poroshell HPH C18, 3 $\times$ 100 mm, 2.7 μ m (部件号 695975-502)
- Agilent Poroshell HPH C18, 3 $\times$ 100 mm, 4 μ m (部件号 695970-502)
- 在高 pH 条件下可保持稳定的新型表面多孔色谱柱, 3 $\times$ 100 mm, 2.6 μ m 和 5 μ m, 来自另一家供应商

采用 Agilent ChemStation C.1.05 版控制仪器并处理数据。

测定的化合物包括尿嘧啶 (50 μ g/mL)、盐酸多塞平 (250 μ g/mL)、盐酸去甲替林 (500 μ g/mL)、盐酸阿米替林 (250 μ g/mL) 和马来酸曲米帕明 (500 μ g/mL)。以上所有化合物均购自 Sigma-Aldrich 公司, 并用水进行配制。图 1 显示了结构和详细信息。磷酸氢二钠二水合物和磷酸二氢钠二水合物也由 Sigma-Aldrich 提供, 分别配制为 20 mM 的溶液并滴定至 pH 7.0。乙腈购自 Honeywell

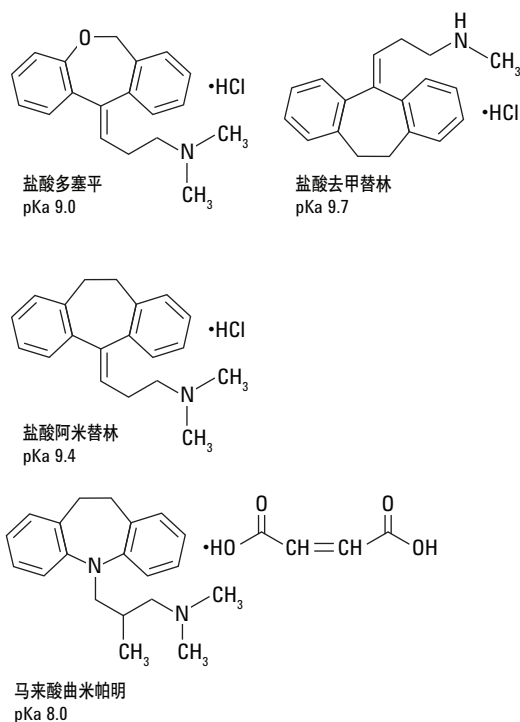


图 1. 三环胺结构

(Burdick and Jackson)。水经过 Milli-Q 系统 (Millipore) 0.2 μ m 滤膜过滤, 电阻率为 18 M Ω 。采用包含预混合的 60% 乙腈和 40% 20 mM 磷酸钠的流动相对色谱柱进行评估。在测试之前将色谱柱加热至 25 $^{\circ}$ C, 并在 1 mL/min 的流速下平衡 10 分钟。

结果与讨论

如图 1 所示, TCA 的 pKa 值处于 8 - 10 之间, 因此将这些化合物明确归类为碱。包含可电离化合物 (如碱) 的样品通常可在 pH 为 3 或更低的流动相中实现最佳分离。在该 pH 下, 色谱柱硅醇基的相互作用可能性将降至最低。在 pH 为 5.5 及更高的条件下, 色谱柱表面的残余硅醇基将以 O⁻ 的状态存在。这些带负电荷的表面硅醇基可与带正电荷的碱性化合物发生离子交换作用。这是最常见的一类峰拖尾。然而, 由于样品组分在低 pH 下不稳定, 因此许多分离更适合在中等 pH (4 - 8) 及较高 pH (> 9) 下进行。碱性化合物在低 pH 下发生质子化并被过快洗脱, 或在低 pH 下无法达到要求的峰间距。

多数色谱工作者都清楚传统硅胶型色谱柱通常不建议用于较高 pH (例如 pH > 8)，因为硅胶担体可能发生溶解并导致色谱柱失效。在专为 pH 6 - 8 范围设计的色谱柱中进行分离时可能会产生问题。硅胶担体在该 pH 范围内具有较高溶解性，使得分离重现性和色谱柱寿命均小于预期。研究证明，硅胶型色谱柱在中等（或更高）pH 下的降解主要与硅胶担体的溶解有关，而与水解引起的键合相损失关系不大 [5]。研究中还发现，硅胶担体在 pH 6 - 8 范围内的溶解度在磷酸盐缓冲液存在的情况下大大增加，在较高温度和较高缓冲液浓度下尤其如此 [6]。

Agilent Poroshell HPH C18 色谱柱已被证明能够在碳酸氢铵和磷酸盐缓冲液下保持稳定，并已成为中等 pH 到高 pH 应用中更常见的色谱柱。关于在磷酸盐/硼酸盐缓冲液、三乙醇胺/磷酸盐缓冲液以及磷酸盐、氢氧化铵和碳酸氢铵缓冲液中使用这些色谱柱的应用已见诸报道。色谱工作者可凭借这些色谱柱获得表面多孔色

谱柱的高柱效优势，并在较高 pH 或温度下获得较长的使用寿命 [7,8,9]。

图 2 显示了采用 Poroshell HPH C18, 4 μ m 色谱柱 (A) 和 2.7 μ m 色谱柱 (B) 得到的色谱图，两种色谱柱均为 3 $\times$ 100 mm 的规格。这些尺寸的色谱柱应用越来越广泛，因为其溶剂用量少于旧款 4.6 mm 规格色谱柱。使用较少的溶剂意味着采购和处置溶剂的成本均会降低。3 $\times$ 100 mm 的色谱柱还经常与质谱配套使用。如总结表和色谱图所示，所有色谱峰均表现出良好峰形，拖尾极小。根据曲米帕明色谱峰测得的峰效率对于 2.7 μ m 色谱柱为 15679，对于 4 μ m 色谱柱则为 8616。两种色谱柱均可在 400 bar 仪器上轻松运行，2.7 μ m 色谱柱的反压为 280 bar，而 4 μ m 色谱柱的反压为 143 bar。4 μ m 色谱柱上的保留时间略短于 2.7 μ m 色谱柱，但在两种色谱柱上得到的化合物洗脱顺序和选择性接近，表明了色谱柱具有可扩展性。

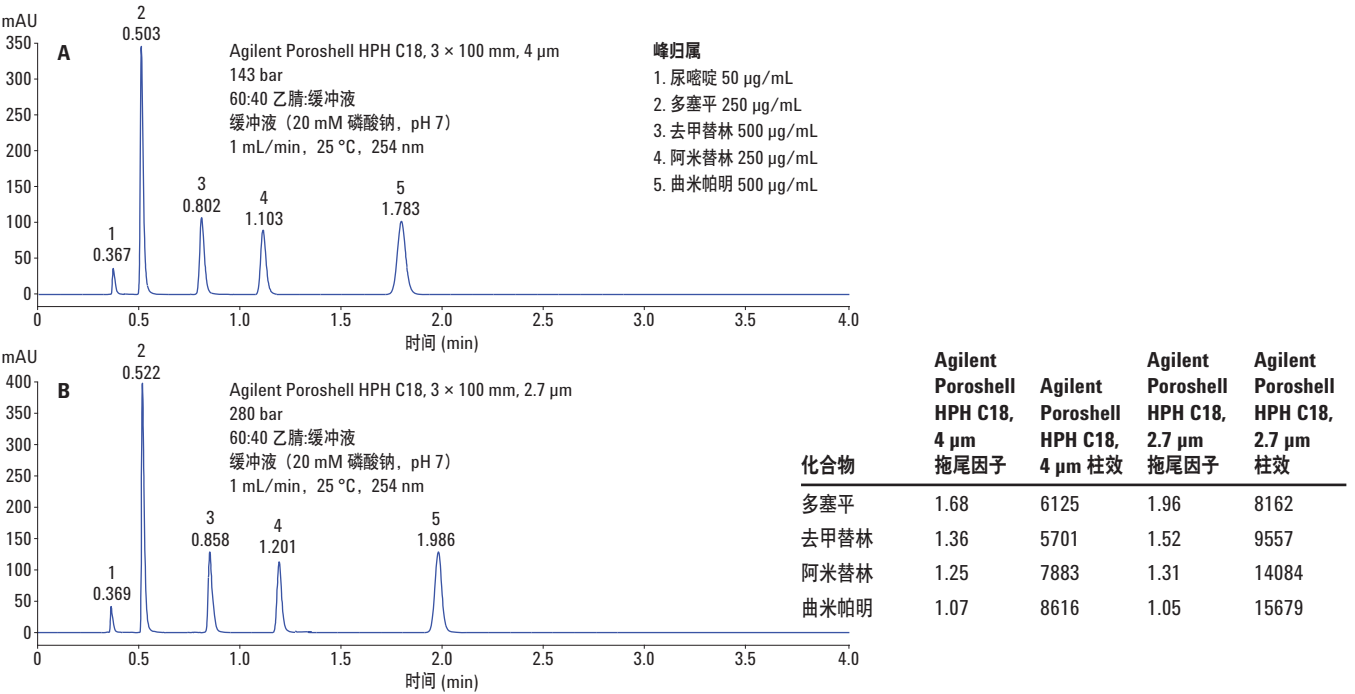


图 2. pH 为 7 的三环抗抑郁药混合物磷酸盐缓冲液溶液在 Agilent Poroshell HPH C18 色谱柱上的分离结果

图 3 显示了利用另一家供应商提供的两种在高 pH 条件下可保持稳定的表面多孔色谱柱所得到的色谱图。该色谱图显示的三环胺类峰形不如图 2 所示的采用 Poroshell HPH C18 色谱柱得到的结果。由于采用其他供应商提供的 2.6 μm 色谱柱得到的该碱类的峰形较差，因此该色谱柱的柱效低于 Poroshell HPH C18, 2.7 μm 色谱柱。尽管由其他供应商提供的 5 μm 色谱柱的反压低于 Poroshell HPH 4 μm 色谱柱，但二者的差别很小。

结论

Agilent Poroshell HPH C18 色谱柱已被证明在较高及中等 pH 下的碳酸氢铵和磷酸盐缓冲液中具有良好的耐用性，是色谱工作者的绝佳选择。在本应用简报中，与购自另一家供应商的色谱柱相比，Poroshell HPH C18 获得了更优异的峰形。由于峰形会影响柱效，因此尤其在分析碱性药物化合物时不应低估出色谱峰形的重要性。

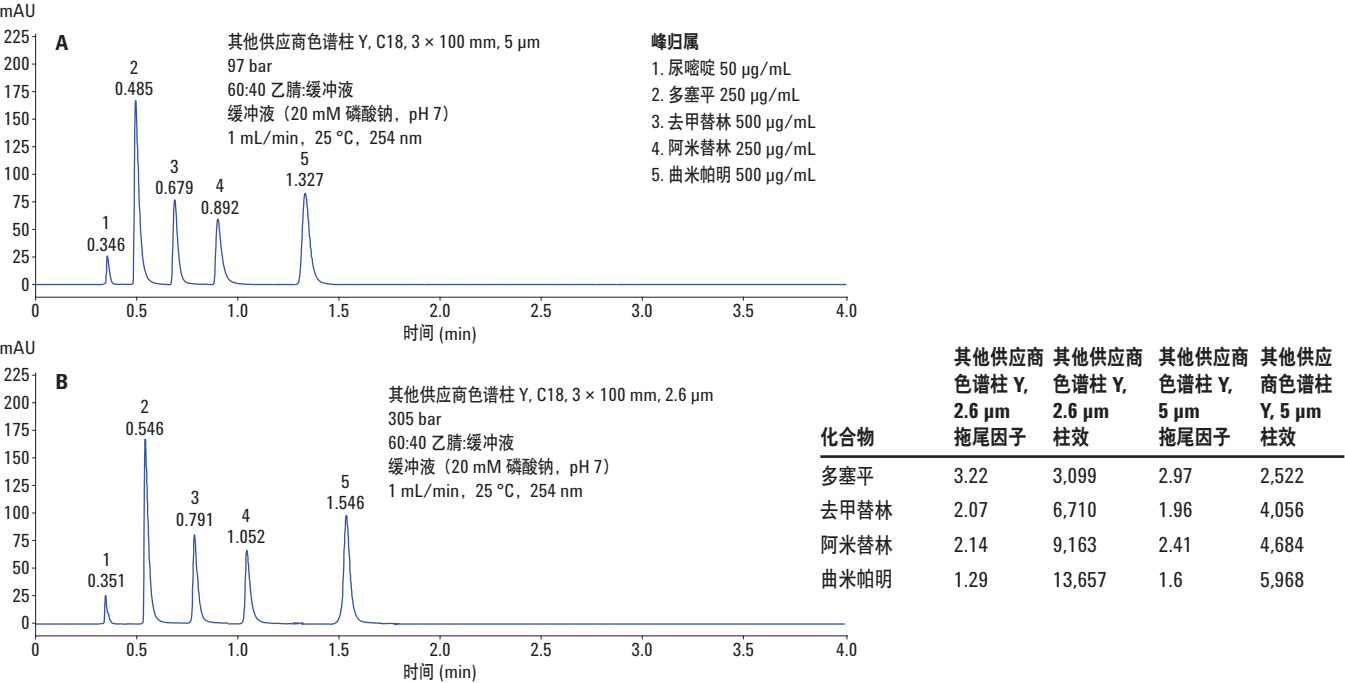


图 3. pH 为 7 的三环抗抑郁药混合物磷酸盐缓冲液溶液在另一家供应商提供的表面多孔色谱柱上的分离结果

参考文献

1. 三环抗抑郁药与四环抗抑郁药:
<http://www.mayoclinic.org/diseases-conditions/depression/in-depth/antidepressants/art-20046983>
2. 三环抗抑郁药:
https://en.wikipedia.org/wiki/Tricyclic_antidepressant
3. 多塞平: <http://www.drugbank.ca/drugs/DB01142>
4. Jing, L. L.; Jiang, R.; Liu, P.; Wang, P.; Shi, T. Y.; Sun, X. Selectivity differences between alkyl and polar modified alkyl phases in reversed phase high performance liquid chromatography. *J. Sep. Sci.* **2009**, *32*, 212-220
5. Kirkland, J. J.; Henderson, J. W.; DeStefano, J. J.; van Straten, M. A.; Claessens, H. A. Stability of silica-based, endcapped columns with pH 7 and 11 mobile phases for reversed-phase high-performance liquid chromatography. *J. Chromatog. A.* **1997**, *762*, 97-112
6. Claessens, H.; van Straten, M. A.; Kirkland, J. J. Effect of buffers on silica-based column stability in reversed-phase high-performance liquid chromatography. *J. Chromatogr. A* **1996**, *728*, 259-270
7. Long, W. J.; Mack, A. E.; Xiaoli, Wang; Barber, W. E. Selectivity and Sensitivity Improvements for Ionizable Analytes Using High-pH-Stable Superficially Porous Particles. *LCGC* **2015**, *33* (4)
8. W. J. Long., *Automated Amino Acid Analysis using an Agilent Poroshell HPH C18 column* (使用 Agilent Poroshell HPH-C18 色谱柱进行自动氨基酸分析); 应用简报, 安捷伦科技公司, 出版号 5991-5571EN, **2015**
9. R. Fu, Q. Lei., *Fast Analysis of Oxidative Hair Dyes at High pH with Poroshell HPH C18 and Other Phases* (利用 Poroshell HPH C18 及其他固定相在高 pH 条件下快速分析氧化型染发剂); 应用简报, 安捷伦科技公司。出版号 5991-5263EN, **2014**

更多信息

这些数据仅代表典型的结果。有关我们的产品与服务的详细信息, 请访问我们的网站 www.agilent.com

查找当地的安捷伦客户中心：

www.agilent.com/chem/contactus-cn

免费专线：

800-820-3278, 400-820-3278 (手机用户)

联系我们：

LSCA-China_800@agilent.com

在线询价：

www.agilent.com/chem/erfq-cn

www.agilent.com

仅限研究使用。不可用作诊断方法。

安捷伦对本资料可能存在的错误或由于提供、展示或使用本资料所造成的间接损失不承担任何责任。

本文中的信息、说明和技术指标如有变更，恕不另行通知。

© 安捷伦科技（中国）有限公司，2015

2015 年 12 月 7 日，中国出版

5991-6512CHCN



Agilent Technologies