Agilent Poroshell HPH C18을 이용한 3환계 항우울제(TCA) 분석

응용 자료

저분자 의약품

저자

William Long

Agilent Technologies, Inc.

소개

3환계 항우울제(TCA: Tricyclic antidepressants)는 1950년대 초에 처음 발견되었으며 1950년대 말에 시장에 출시되었습니다. 그 화학 구조에는 3개의 원자 링이 포함되어 있으며, 4개의 원자 링이 있는 4환계 항우울제(Tetracyclic antidepressants)는 삼환계 항우울제와 아주 유사한 항우울제 화합물입니다.

고리형 항우울제(Cyclic antidepressants)는 최초 개발된 항우울제 중 하나입니다. 종종 부작용이 적은 신약으로 대체되지만, 이 항우울제는 여전히 많은 사람들이 선호하는 의약품입니다. 고리형 항우울제는 뇌에 작용하는 세로토닌 및 노르에피네프린과 같은 신경전달물질의 생성을 촉진하여 그 효과를 발휘합니다. 이 항우울제는 뇌 세포의 소통을 개선함으로써 정서에 영향을 미칩니다. 독세핀 및 아미트립틸린과 같은 3차 아민 TCA는 노르트립틸린 및 데시프라민 [1,2,3]과 같은 2차 아민 TCA보다 더 강한 세로토닌 재흡수 억제제입니다.

Agilent Technologies

3차 아민은 중요한 크로마토그래피 프로브이기도 합니다. 그림 1은 높은 pKa 값(9.2 - 9.6)을 가지는 화합물들을 보여줍니다. pH 7.0에서, 실리카 실라놀은 이온화 상태로 존재하며 TCA와 같은 염기성 프로브는 고도로 양성자화된 상태에 있습니다. 중성 pH에서, TCA는 실리카 실라놀에 노출될 때 이와 이온교환을 진행합니다. 노출된 실라놀이 많을 수록 더 많은 피크 테일링(tailing)을 관찰할 수 있습니다. 아미트립틸린의 테일링 인자는 실라놀 활성 측정의 척도로 사용됩니다[4].

본 실험을 통해, 3환계 항우울제의 분석에서의 Agilent Photocell HPH C18 컬럼과 타 브랜드 컬럼의 성능을 비교했습니다.

실험

Agilent 1260 Infinity LC가 사용되었으며, 그 구성 요소는 다음과 같습니다:

- Agilent 1260 Infinity Binary Pump SL, 최대 600bar 압력 제공 가능(G1312B)
- Agilent 1260 Infinity 항온 컬럼 장치(G1316C)
- Agilent 1260 Infinity 고성능 자동 시료 주입기 (Autosampler) SL Plus(G1376C)
- Agilent 1260 Infinity 다이오드 어레이 검출기(G4212A), 경로 길이가 10mm인 1µL 흐름 셀 장착(p/n G4212-60008)

이 연구에는 다음 컬럼이 사용되었습니다:

- Agilent Photocell HPH C18, 3 × 100mm, 2.7µm (p/n 695975-502)
- Agilent Photocell HPH C18, 3 × 100mm, 4µm (p/n 695970-502)
- 고 pH에서 안정적인 새로운 표면 다공성 컬럼 3 × 100mm, 2.6 및 5µm(타 브랜드 제품)

Agilent ChemStation(C.1.05 버전)을 사용하여 기기를 제어하고 데이터를 처리했습니다.

측정한 화합물로는 우라실(50µg/mL), 독세핀 하이드로클로라이드(250µg/mL), 노르트립틸린 하이드로클로라이드(500µg/mL), 아미트립틸린 하이드로클로라이드(250µg/mL) 및 트리미프라민 말레산염(500µg/mL) 등이 있습니다. 이는 모두 Sigma-Aldrich사의 제품이며 수용액상태의 시약을 사용하였습니다. 그림 1은 구조와 상세 정보를 보여줍니다. 인산나트륨 이염기 이수화물과 인산나트륨 일염기 이수화물 역시 Sigma-Aldrich 제품이며, 두 시약은 각각 20mM, pH 7.0으로 준비되었습니다. 아세토니트릴은

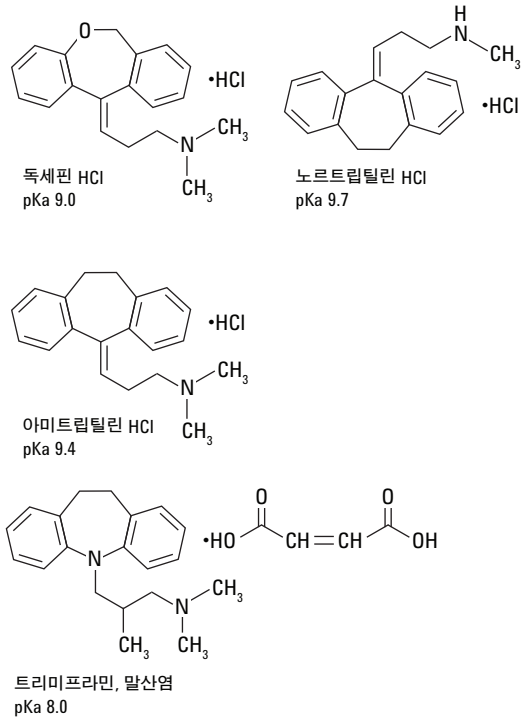


그림 1. 3차 아민 구조

Honeywell(Burdick and Jackson)에서 구매했으며, 물은 Milli-Q 시스템(Millipore)(18MW)에서 0.2µm 필터링 막으로 필터링되었습니다. 60% 아세토니트릴과 40% 20mM 인산나트륨으로 이루어진 사전에 혼합된 이동상을 사용해 컬럼을 평가했습니다. 분석 전, 컬럼 오븐 온도는 25°C로 가열하고 분당 1ml의 속도로 유량을 맞추어 10분간 안정화 하였습니다.

결과 및 토의

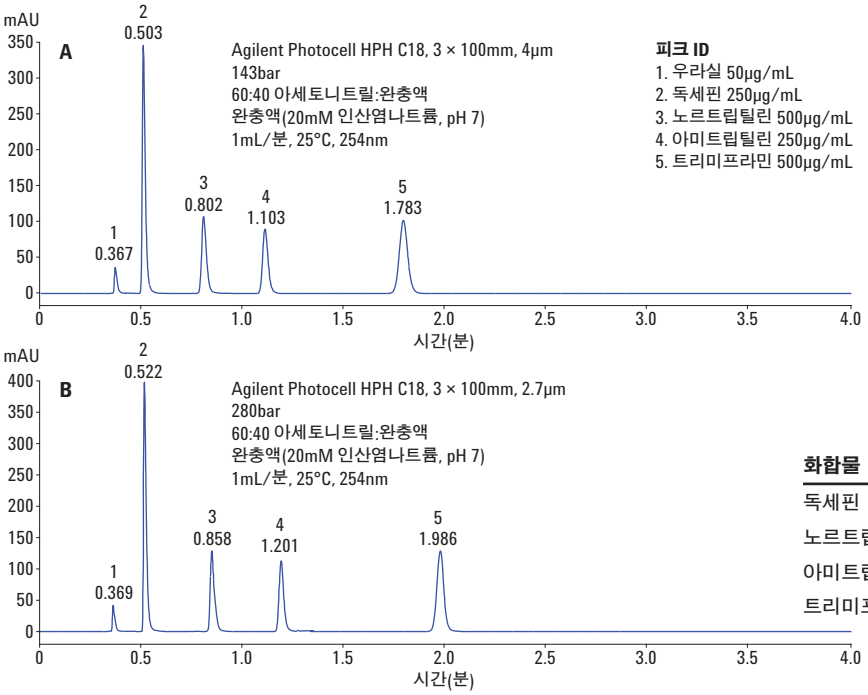
그림 1에 나열된 바와 같이, TCA의 pKa 값은 8 - 10 사이에 있으며, 이러한 화합물은 명확하게 염기로 분류됩니다. 염기와 같은 이온화 가능한 화합물을 포함하는 시료는 보통 pH 3 이하의 이동상으로 잘 분리됩니다. 이 pH에서 컬럼과 실라놀 사이의 상호작용 가능성이 최소화됩니다. pH 5.5 이상에서 컬럼 표면의 잔류 실라놀이 O- 상태로 존재할 수 있습니다. 이렇게 음전하를 띤 표면 실라놀은 양전하를 띤 염기성 화합물과 이온교환을 진행할수 있습니다. 이는 가장 일반적인 피크 테일링 유형입니다. 그러나 시료 성분이 낮은 pH에서 안정적이지 않기 때문에, 대부분의 분리는 중간 pH(4-8) 및 높은 pH(>9)에서 진행하는 것이 더 적합합니다. 염기성 화합물은 낮은 pH에서 양성자화되어 너무 빠르게 용출되거나, 낮은 pH에서 필요한 band spacings를 찾을 수 없습니다.

대부분의 크로마토그래피 전문가들은 높은 pH(예: pH >8)에서 전통적인 실리카 기반 컬럼을 사용하는 것을 권장하지 않습니다. 고 pH에서 실리카 서포트(silica support)가 용해될 수 있어 컬럼에 손상을 줄 수 있기 때문입니다. pH 6-8 범위에서 작동하도록 설정된 분리에서 문제가 발생할 수 있습니다. 이 pH 범위에서 실리카 서포트의 용해도가 상당히 높을 수 있기 때문에 분리능에 대한 재현성과 컬럼의 수명이 떨어지게 됩니다. 연구에 따르면, 중간(및 높은) pH에서 실리카 기반 컬럼의 변성은 가수분해로 인한 결합된 유기 기질의 손실보다는 실리카 서포트 용해의 영향을 많이 받는다는 것이 증명되었습니다[5]. 또한 pH 6-8 범위에서 특히 고온과 고농도의 인산염 완충액이 존재할 경우, 실리카 서포트 용해도는 크게 증가함이 밝혀졌습니다[6].

Agilent Photocell HPH C18 컬럼은 중탄산 암모늄 및 인산염 완충액에서 안정적인 것으로 증명되었으며 중간 pH로부터 높은 pH 사이의 분석 작업에서 점점 더 많이 사용하고 있습니다. 이러한 컬럼을 사용한 분석 작업은 인산염/붕산염 완충액, 트리에탄올아민/인산염 완충액 및 인산염, 수산화암모늄 및 중탄산 암모늄을 완충액으로 사용하였습니다.

이러한 컬럼을 이용하면, 크로마토그래피 전문가는 표면 다공성 컬럼의 높은 효율성의 이점을 얻을 수 있을 뿐만 아니라 높은 pH나 고온에서 긴 사용수명을 유지할 수 있습니다[7,8,9].

그림 2는 3 × 100mm 규격의 Photocell HPH C18, 4µm 컬럼(A)과 2.7µm 컬럼(B)을 이용하여 얻은 크로마토그램을 보여줍니다. 이 규격의 컬럼은 기존 4.6mm 컬럼에 비해 용매 사용량이 적기 때문에 점점 더 인기를 끌고 있습니다. 용매 사용량이 적다는 것은 용매의 구매 및 폐기를 위한 유지비가 낮다는 의미입니다. 3 × 100mm의 컬럼은 질량 분석법에도 자주 사용됩니다. 요약 표와 크로마토그램에 표시된 바와 같이, 모든 피크 모양은 아주 우수하며 테일링(tailing)이 적습니다. 트리미프라민 피크로 측정된 피크 효율은 2.7µm 컬럼에서 15,679, 4µm 컬럼에서 8,616이었습니다. 이 두 컬럼 모두 400bar 기기에서 쉽게 작동할 수 있으며, 2.7µm 컬럼의 압력은 280bar이고 4µm 컬럼의 압력은 143bar입니다. 4µm 컬럼의 머무름 시간은 2.7µm 컬럼보다 약간 짧지만, 화합물의 용리 순서와 선택성은 둘 모두 비슷해서 컬럼의 확장성을 보여줍니다.



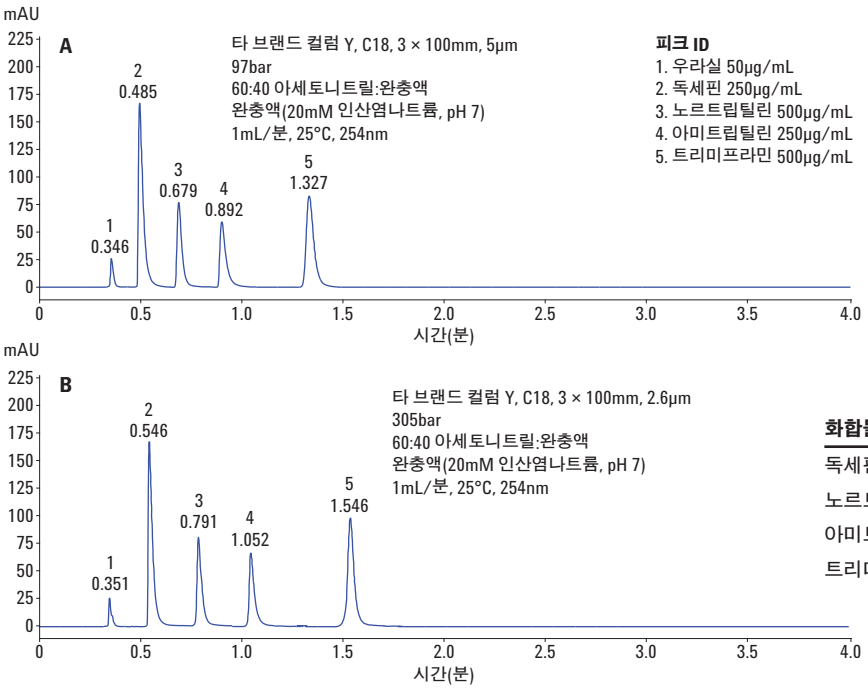
화합물	테일링 Agilent Photocell HPH C18 4µm	효율성 Agilent Photocell HPH C18 4µm	테일링 Agilent Photocell HPH C18 2.7µm	효율성 Agilent Photocell HPH C18 2.7µm
독세핀	1.68	6,125	1.96	8,162
노르트립틸린	1.36	5,701	1.52	9,557
아미트립틸린	1.25	7,883	1.31	14,084
트리미프라민	1.07	8,616	1.05	15,679

그림 2. Agilent Photocell HPH C18 컬럼의 pH 7 인산염 완충제에서의 3환계 항우울제 혼합물

그림 3은 높은 pH에 견디는 타 브랜드의 두 가지 표면 다공성 컬럼으로 얻은 크로마토그램을 보여줍니다. 이 크로마토그램이 보여주듯이, 이 두 컬럼을 통해 얻은 3차 아민의 피크 모양은 그림 2에서 Photocell HPH C18 컬럼으로 얻은 피크 모양 수준보다 낮습니다. 타 브랜드 2.6µm 컬럼을 통해 얻은 염기성 성분의 피크 모양이 불량이기에 그 효율성은 Photocell HPH C18, 2.7µm 컬럼에 비해 떨어집니다. 타 브랜드 5µm 컬럼의 압력은 Photocell HPH 4µm 컬럼보다 낮지만 그 차이는 크지 않습니다.

결론

Agilent Photocell HPH C18 컬럼은 중간 및 높은 pH의 중탄산암모늄 및 인산염 완충액에서 양호한 내구성을 가지는 것으로 입증되었기 때문에 크로마토그래피 전문가에게 아주 이상적입니다. 이 응용 자료에서, Photocell HPH C18 컬럼은 타 브랜드의 제품보다 훨씬 우수한 피크 모양을 보여주었습니다. 피크 모양이 컬럼 효율성에 영향을 미치기 때문에 양호한 피크 모양의 중요성을 절대 과소평가하지 말아야 합니다. 특히 염기성 의약품의 분석의 경우에는 더욱 그러합니다.



화합물	테일링 Y 브랜드 2.6µm	효율성 Y 브랜드 2.6µm	테일링 Y 브랜드 5µm	효율성 Y 브랜드 5µm
독세핀	3.22	3,099	2.97	2,522
노르트립틸린	2.07	6,710	1.96	4,056
아미트립틸린	2.14	9,163	2.41	4,684
트리미프라민	1.29	13,657	1.6	5,968

그림 3. 타 브랜드의 표면 다공성 컬럼의 pH 7 인산염 완충제에서의 3환계 항우울제 혼합물

참조 문헌

1. Tricyclic antidepressants and tetracyclic antidepressants. http://www.mayoclinic.org/diseases-conditions/depression/in-depth/antidepressants/art-20046983.
2. Tricyclic antidepressants. https://en.wikipedia.org/wiki/Tricyclic_antidepressant
3. Doxepin. 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*; Application Note, Agilent Technologies, Inc. Publication number 5991-5571EN, **2015**.
9. R. Fu, Q. Lei. *Fast Analysis of Oxidative Hair Dyes at High pH with Poroshell HPH C18 and Other Phases*; Application Note, Agilent Technologies, Inc. Publication number 5991-5263EN, **2014**.

추가 정보

이러한 데이터는 일반적인 결과를 나타냅니다. 애질런트 제품 및 서비스에 대한 더 자세한 정보는 웹 사이트 www.agilent.com/chem.에서 확인하실 수 있습니다

www.agilent.com/chem

연구 용도로만 사용하십시오. 진단 용도로는 사용하실 수 없습니다.

애질런트는 이 문서에 포함된 오류나 이 문서의 제공, 이행 또는 사용과 관련하여 발생한 부수적인 또는 결과적인 손해에 대해 책임을 지지 않습니다.

이 발행물의 정보, 설명 및 사양은 사전 공지 없이 변경될 수 있습니다.

© Agilent Technologies, Inc., 2015
한국에서 발행
2015년 12월 7일
5991-6512KO

서울시 용산구 한남대로 98, 일신빌딩 4층 우)04418
한국애질런트테크놀로지스(주) 생명과학/화학분석 사업부
고객지원센터 080-004-5090 www.agilent.co.kr



Agilent Technologies