Analyse trizyklischer Antidepressiva mit der Agilent Poroshell HPH C18-Säule

Application Note

Small Molecule Pharmaceuticals

Autor

William Long

Agilent Technologies, Inc.

Einführung

Trizyklische Antidepressiva wurden erstmals in den frühen 1950er Jahren entdeckt und am Ende dieses Jahrzehnts auf den Markt gebracht. Ihre chemische Struktur enthält ein dreigliedriges Ringsystem. Bei den tetrazyklischen Antidepressiva, die ein Vier-Ringsystem enthalten, handelt es sich um eine eng verwandte Gruppe antidepressiv wirkender Verbindungen.

Zyklische Antidepressiva waren mit die ersten Antidepressiva, die entwickelt wurden. Obwohl sie häufig durch neuere Arzneimittel, die weniger Nebenwirkungen verursachen, ersetzt werden, stellen sie immer noch eine gute Wahl für viele Menschen dar. Zyklische Antidepressiva wirken dadurch, dass sie mehr Neurotransmitter wie Serotonin und Noradrenalin im Gehirn verfügbar machen. Dies unterstützt die Gehirnzellen dabei, besser zu kommunizieren, was in Folge die Stimmung beeinflusst. Trizyklische Antidepressiva mit tertiärer Aminstruktur wie Doxepin und Amitriptylin sind wirkungsvollere Serotonin-Wiederaufnahme-Hemmer als trizyklische Antidepressiva mit sekundärer Aminstruktur wie Nortryptylin und Desipramin [1,2,3].

Agilent Technologies

Trizyklische Amine sind auch für chromatographische Untersuchungen von Bedeutung. In Abbildung 1 sind diese Verbindungen dargestellt und ihre hohen pKa-Werte im Bereich von 9,2 bis 9,6 angegeben. Bei einem pH-Wert von 7,0 liegen die Silanolgruppen des Silica in ihrer ionisierten Form vor und basische Testsubstanzen wie die trizyklischen Antidepressiva sind stark protoniert. Bei einem neutralen pH-Wert gehen die trizyklischen Antidepressiva Ionenaustauschwechselwirkungen mit den Silanolgruppen des Silica ein, wenn sie mit diesen in Kontakt kommen. Je mehr Silanolgruppen vorhanden sind, desto stärkeres Peaktailing kann beobachtet werden. Der Tailing-Faktor von Amitriptylin wird als Maß für die Aktivität der Silanolgruppen verwendet [4].

In dieser Studie wurden die Leistungen von Agilent Poroshell HPH C18-Säulen und von Säulen anderer Hersteller bei der Analyse von trizyklischen Antidepressiva verglichen.

Experimentelles

Es wurde ein Agilent 1260 Infinity LC-System verwendet, das aus folgenden Komponenten bestand:

- Agilent 1260 Infinity Binäre Pumpe SL, kann bis zu 600 bar liefern (G1312B)
- Agilent 1260 Infinity Thermostatierter Säulenofen (G1316C)
- Agilent 1260 Infinity Hochleistungsprobengeber SL Plus (G1376C)
- Agilent 1260 Infinity Diodenarray-Detektor (G4212A) mit 10 mm Schichtdicke und 1-µl-Durchflusszelle (Best.-Nr. G4212-60008)

In dieser Untersuchung wurden folgende Säulen verwendet:

- Agilent Poroshell HPH C18, 3 × 100 mm, 2,7 µm (Best.-Nr. 695975-502)
- Agilent Poroshell HPH C18, 3 × 100 mm, 4 µm (Best.-Nr. 695970-502)
- Neue, bei hohen pH-Werten stabile, oberflächenporöse Säulen, 3 × 100 mm, 2,6 und 5 µm, eines anderen Herstellers

Die Software Agilent ChemStation, Version C.1.05, wurde zur Steuerung der Geräte und zur Verarbeitung der Daten verwendet.

Die untersuchten Verbindungen waren Uracil (50 µg/ml), Doxepin-Hydrochlorid (250 µg/ml), Nortryptylin-Hydrochlorid (500 µg/ml), Amitriptylin-Hydrochlorid (250 µg/ml) und Trimipramin-Maleat (500 µg/ml). Sie wurden alle von Sigma Aldrich, Corp. gekauft und in Wasser gelöst verwendet. Abbildung 1 zeigt die Strukturen und Details an. Es wurden jeweils 20 mM Lösungen von Natriumdihydrogenphosphat-Dihydrat und Dinatriumhydrogenphosphat-Dihydrat, ebenfalls von Sigma-Aldrich, hergestellt und auf einen pH-Wert von

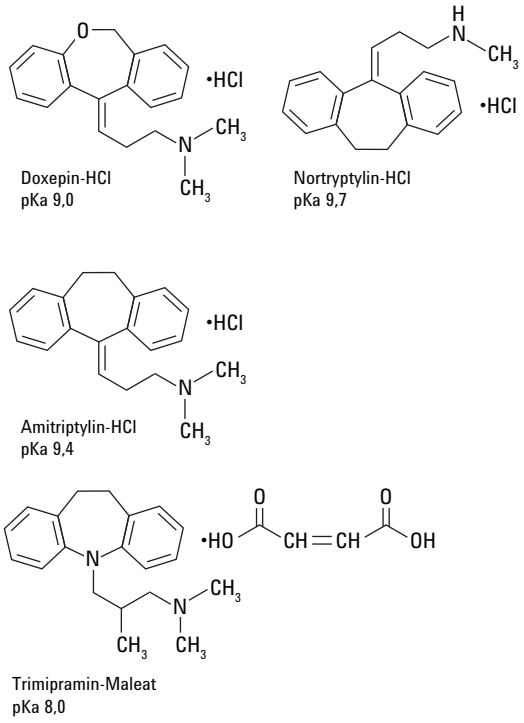


Abbildung 1: Struktur trizyklischer Amine.

7,0 titriert. Acetonitril wurde von Honeywell (Burdick and Jackson) gekauft. Das Wasser wurde mit einem Milli-Q-System (Millipore) filtriert (0,2 µm, 18 MΩ). Eine mobile Phase aus bereits vorgemischtem Acetonitril (60 %) und 20 mM Natriumphosphat (40 %) wurde verwendet, um die Säulen zu testen. Die Säulen wurden bei 25 °C temperiert und mit 1 ml/min 10 Minuten vor den Tests äquilibriert.

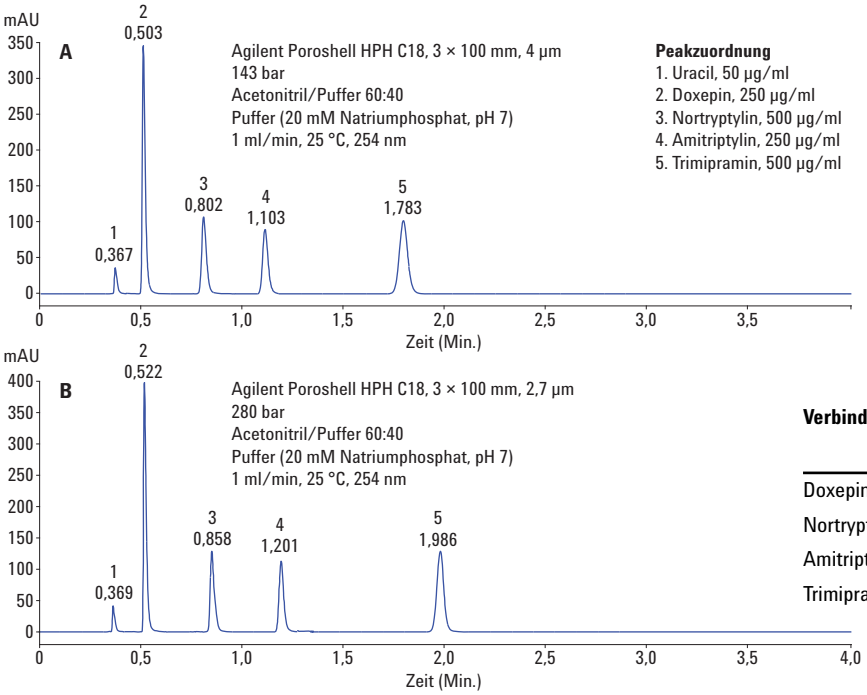
Ergebnisse und Diskussion

Wie in Abbildung 1 angegeben, liegen die pKa-Werte der trizyklischen Antidepressiva zwischen 8 und 10, d. h. es handelt sich bei diesen Verbindungen eindeutig um Basen. Proben, die ionisierbare Verbindungen wie z. B. Basen enthalten, lassen sich im Allgemeinen am besten mit mobilen Phasen mit einem pH-Wert von 3 oder darunter trennen. Bei diesen pH-Werten sind die möglichen Wechselwirkungen mit Silanolgruppen der Säule am geringsten. Bei einem pH-Wert mit 5,5 und darüber können Restsilanolgruppen auf der Säulenoberfläche als O^- vorliegen. Diese negativ geladenen Oberflächensilanolgruppen können Ionenaustauschwechselwirkungen mit positiv geladenen basischen Substanzen eingehen. Dies ist der häufigste Grund für Peaktailing. Viele Trennungen werden optimalerweise jedoch bei mittleren (4-8) oder höheren pH-Werten (>9) durchgeführt, da die Probenkomponenten bei einem niedrigen pH-Wert nicht stabil sind. Basische Substanzen sind bei niedrigen pH-Werten protoniert und eluieren zu schnell oder erfordern Bandenabstände, die bei niedrigen pH-Werten nicht gegeben sind.

Die meisten Chromatographieanwender sind sich darüber im Klaren, dass herkömmliche Kieselgel-basierte Säulen normalerweise aufgrund der möglichen Auflösung des Silica-Trägermaterials und dem damit einhergehenden Säulenversagen nicht für den Betrieb bei höheren pH-Werten (zum Beispiel pH >8) empfohlen werden. Bei Trennungen, die für eine Durchführung im pH-Bereich von 6-8 ausgelegt sind, können Probleme auftreten. Die Löslichkeit des Silica-Trägermaterials kann in diesem pH-Bereich erheblich sein, sodass die Reproduzierbarkeit der Trennungen und die Lebensdauer der Säule hinter den Erwartungen zurückbleiben. Es wurde bereits beschrieben, dass der Verschleiß von Kieselgel-basierten Säulen bei mittleren (und höheren) pH-Werten im Großen und Ganzen seine Ursache in der Auflösung des Silica-Trägermaterials hat und nicht im Verlust der gebundenen organischen Substrate durch Hydrolyse [5]. Außerdem wurde herausgefunden, dass die Löslichkeit des Silica-Trägermaterials im pH-Bereich von 6-8 durch einen vorhandenen Phosphatpuffer deutlich erhöht ist, insbesondere bei höheren Temperaturen und höheren Pufferkonzentrationen [6].

Es wurde gezeigt, dass die Agilent Poroshell HPH C18-Säule im Betrieb mit Ammoniumbicarbonat- und Phosphatpuffer stabil ist. Sie ist daher mittlerweile eine sehr gern gewählte Säule für Applikationen bei mittleren bis hohen pH-Werten. Es wurden Applikationen veröffentlicht, die diese Säulen mit Phosphat-/Boratpuffer, Triethanolamin-/Phosphatpuffer und Phosphat-, Ammoniumhydroxid- und Ammoniumbicarbonatpuffer verwenden. Chromatographieanwender können mit diesen Säulen die Vorteile der hohen Effizienz von oberflächenporösen Säulen und gleichzeitig eine lange Lebensdauer bei erhöhtem pH-Wert oder erhöhter Temperatur nutzen [7,8,9].

Abbildung 2 zeigt Chromatogramme von Poroshell HPH C18-Säulen, eine Säule mit 4-µm-Partikeln (A) und eine Säule mit 2,7-µm-Partikeln (B), beide im Format 3 × 100 mm. Säulen mit diesen Abmessungen werden immer gängiger, da sie weniger Lösemittel verbrauchen als die herkömmliche Größe mit 4,6 mm Durchmesser. Ein geringerer Lösemittelverbrauch ist gleichbedeutend mit geringeren Betriebskosten beim Einkauf und der Entsorgung der Lösemittel. Säulen der Abmessungen 3 × 100 mm werden auch häufig in Verbindung mit der Massenspektrometrie verwendet. Wie in der zusammenfassenden Tabelle und im Chromatogramm gezeigt, weisen alle Peaks eine gute Peakform mit minimalem Tailing auf. Die Peakeffizienz, bestimmt am Trimipramin-Peak, betrug bei der 2,7-µm-Säule 15679 und bei der 4-µm-Säule 8616. Beide Säulen können mit einem Gerät bis 400 bar gut betrieben werden. Der Druck liegt für die 2,7-µm-Säule bei 280 bar und für die 4-µm-Säule bei 143 bar. Die Retentionszeit auf der 4-µm-Säule ist geringfügig kürzer als bei der 2,7-µm-Säule, wobei die Elutionsreihenfolge und die Selektivität für die Verbindungen auf beiden Säulen ähnlich sind, d. h. die Säulen sind skalierbar.



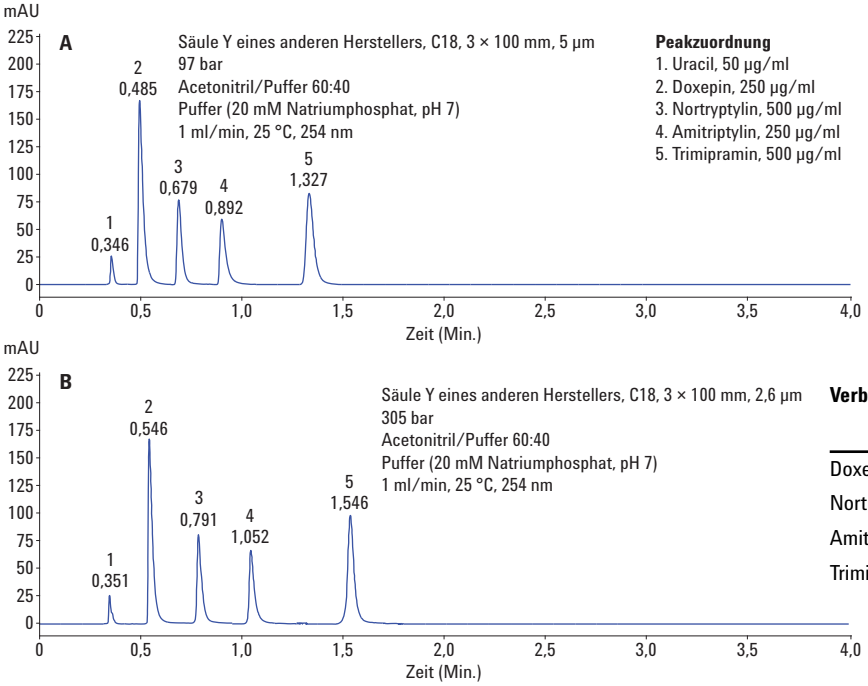
Verbindung	Tailing bei Agilent Poroshell HPH C18, 4 µm	Effizienz bei Agilent Poroshell HPH C18, 4 µm	Tailing bei Agilent Poroshell HPH C18, 2,7 µm	Effizienz bei Agilent Poroshell HPH C18, 2,7 µm
Doxepin	1,68	6125	1,96	8162
Nortryptylin	1,36	5701	1,52	9557
Amitriptylin	1,25	7883	1,31	14 084
Trimipramin	1,07	8616	1,05	15 679

Abbildung 2: Mischung trizyklischer Antidepressiva in Phosphatpuffer bei pH 7 auf Agilent Poroshell HPH C18-Säulen.

Abbildung 3 zeigt Chromatogramme von zwei bei hohen pH-Werten stabilen, oberflächenporösen Säulen eines anderen Herstellers. Die Chromatogramme zeigen, dass die Peakform der trizyklischen Amine schlechter ist als in den Chromatogrammen der Poroshell HPH C18-Säulen in Abbildung 2. Durch die schlechte Peakform für Basen ist die Effizienz der 2,6-µm-Säule eines anderen Herstellers niedriger als die der Poroshell HPH C18 2,7-µm-Säule. Der Druck bei der 5-µm-Säule eines anderen Herstellers ist niedriger als bei der Poroshell HPH 4-µm-Säule, der Unterschied ist jedoch gering.

Schlussfolgerungen

Es wurde gezeigt, dass Agilent Poroshell HPH C18-Säulen in Ammoniumbicarbonat- und Phosphatpuffern bei hohen und mittleren pH-Werten eine gute Beständigkeit besitzen und daher eine gute Wahl für Chromatographieanwender darstellen. In dieser Application Note wird die hervorragende Peakform von Poroshell HPH C18 mit Materialien anderer Hersteller verglichen. Da die Peakform die Trennleistung der Säule beeinflusst, darf die Bedeutung guter Peakformen, insbesondere bei der Analyse basischer pharmazeutischer Verbindungen, nicht unterschätzt werden.



Verbindung	Tailing bei Hersteller Y, 2,6 µm	Effizienz bei Hersteller Y, 2,6 µm	Tailing bei Hersteller Y, 5 µm	Effizienz bei Hersteller Y, 5 µm
Doxepin	3,22	3099	2,97	2522
Nortryptylin	2,07	6710	1,96	4056
Amitriptylin	2,14	9163	2,41	4684
Trimipramin	1,29	13 657	1,6	5968

Abbildung 3: Mischung trizyklischer Antidepressiva in Phosphatpuffer bei pH 7 auf oberflächenporösen Säulen anderer Hersteller.

Literatur

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. Chromatogr. 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. Publikationsnummer 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. Publikationsnummer 5991-5263EN, **2014**.

Weitere Informationen

Diese Daten stellen typische Ergebnisse dar. Weitere Informationen zu unseren Produkten und Leistungen finden Sie auf unserer Website unter www.agilent.com/chem.

www.agilent.com/chem

Ausschließlich zu Forschungszwecken. Nicht für Diagnoseverfahren geeignet.

Agilent haftet weder für hierin enthaltene Fehler noch für Neben- oder Folgeschäden in Zusammenhang mit der Bereitstellung, Leistung oder Verwendung dieses Materials.

Änderungen vorbehalten.

© Agilent Technologies, Inc., 2015
Gedruckt in den USA,
7. Dezember 2015
5991-6512DEE



Agilent Technologies