Análisis de antidepresivos tricíclicos con columnas Agilent Poroshell HPH C18

Nota de aplicación

Fármacos - pequeña molécula

Autor

William Long

Agilent Technologies, Inc.

Introducción

Los antidepresivos tricíclicos (TCA, por sus siglas en inglés) se descubrieron a principios de los años 50 del siglo XX y se lanzaron al mercado en esa misma década. Su estructura química contiene tres anillos de átomos. Están estrechamente relacionados con los antidepresivos tetracíclicos, un grupo de compuestos antidepresivos cuyas moléculas tienen cuatro anillos de átomos.

Los antidepresivos cíclicos son unos de los primeros antidepresivos que se desarrollaron. Aunque hoy en día se sustituyen a menudo por fármacos más nuevos que provocan menos efectos secundarios, aún son una buena opción para tratar a muchos pacientes. Los antidepresivos cíclicos ponen más neurotransmisores (como la serotonina y la norepinefrina) a disposición del cerebro. Esto ayuda a mejorar la comunicación de las células cerebrales, lo que a su vez influye sobre el estado de ánimo. Los TCA de aminas terciarias, como la doxepina y la amitriptilina, son inhibidores más potentes de la recaptación de serotonina que los TCA de aminas secundarias, como la nortriptilina y la desipramina [1, 2, 3].

Agilent Technologies

Las aminas tricíclicas también son importantes como sondas cromatográficas. En la Figura 1 se puede observar que estos compuestos presentan unos valores elevados de pKa, entre 9,2 y 9,6. A pH 7,0, los grupos silanol de la sílice se encuentran en su forma ionizada, mientras que las sondas básicas (como los TCA) están muy protonadas. A pH neutro, los TCA experimentan interacciones de intercambio iónico con los grupos silanol de la sílice si existe exposición a ellos. La cola de pico será mayor cuanto mayor sea el número de grupos silanol expuestos. El factor de cola de la amitriptilina se utiliza como medida de la actividad de los grupos silanol [4].

En este estudio, comparamos el rendimiento de las columnas Agilent Poroshell HPH-C18 con el de las columnas de otro fabricante para el análisis de antidepresivos tricíclicos.

Experimento

Se utilizó un sistema LC Agilent 1260 Infinity, compuesto por los elementos siguientes:

- Bomba binaria SL Agilent 1260 Infinity, capaz de proporcionar una presión de hasta 600 bar (G1312B).
- Compartimento Termostatizado para columnas Agilent 1260 Infinity (G1316C).
- Inyector automático SL Plus de alto rendimiento Agilent 1260 Infinity (G1376C).
- Detector de diodo array Agilent 1260 Infinity (G4212A) con una celda de flujo de 10 mm de paso óptico y 1 µl de volumen (ref. G4212-60008).

En este estudio se utilizaron las columnas siguientes:

- Agilent Poroshell HPH-C18, 3 x 100 mm, 2,7 µm (ref. 695975-502).
- Agilent Poroshell HPH-C18, 3 x 100 mm, 4 µm (ref. 695970-502).
- Columnas superficialmente porosas estables a pH alto, de 3 × 100 mm y 2,6 y 5 µm, nuevas y de otro fabricante.

Para controlar el instrumento y procesar los datos se utilizó el software Agilent ChemStation (versión C.1.05).

Entre los compuestos analizados se incluyeron los siguientes: uracilo (50 µg/ml), clorhidrato de doxepina (250 µg/ml), clorhidrato de nortriptilina (500 µg/ml), clorhidrato de amitriptilina (250 µg/ml) y maleato de trimipramina (500 µg/ml). Todos ellos se adquirieron a Sigma-Aldrich, Corp., y se prepararon en agua. En la Figura 1 se muestran las estructuras y los detalles. Se prepararon por separado disoluciones 20 mM de fosfato sódico dibásico dihidratado y fosfato sódico monobásico dihidratado (también suministrados por Sigma-Aldrich); después se dosificaron hasta conseguir un valor de pH de 7,0. El acetonitrilo se adquirió a Honeywell (Burdick and

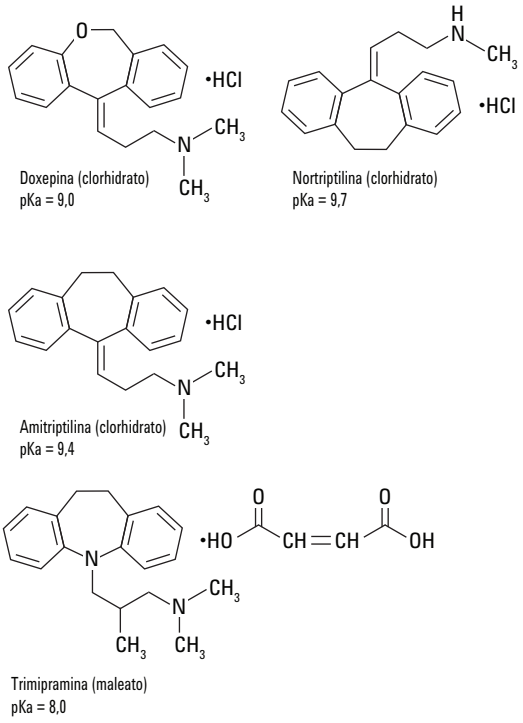


Figura 1. Estructuras de aminas tricíclicas.

Jackson). Se hizo pasar agua a través de filtros de 0,2 µm hasta alcanzar 18 MΩ en un sistema Milli-Q (Millipore). Para evaluar las columnas se utilizó una fase móvil premezclada, compuesta por acetonitrilo al 60 % y fosfato de sodio 20 mM al 40 %. Las columnas se calentaron a 25 °C y se equilibraron a 1 ml/min durante 10 minutos antes de realizar las pruebas.

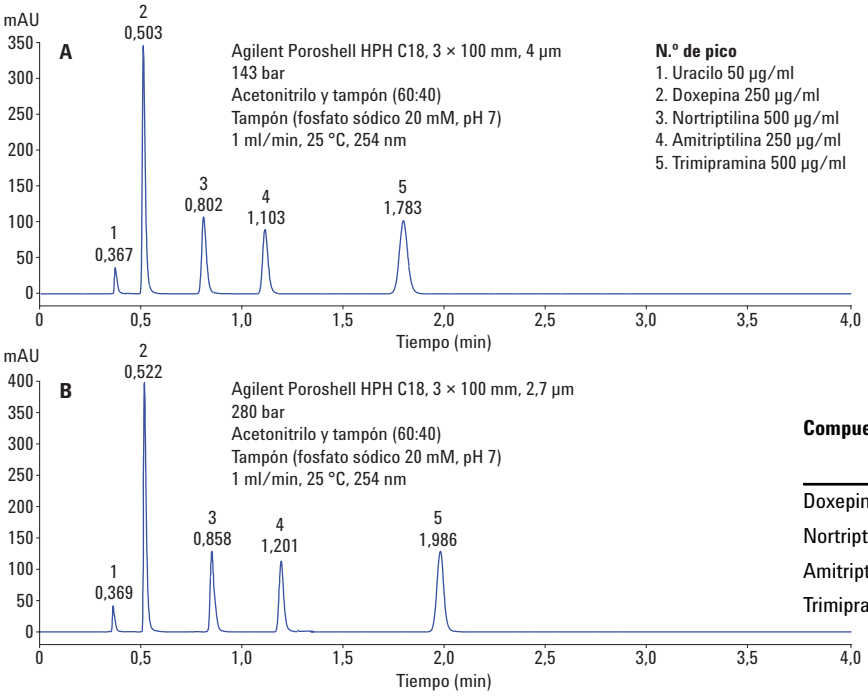
Resultados y comentarios

Como se puede observar en la Figura 1, los valores de pKa de los TCA estaban comprendidos entre 8 y 10, lo que clasifica claramente a estos compuestos como bases. Los resultados de la separación de muestras que contienen compuestos ionizables (como bases) normalmente mejoran si se utilizan fases móviles con un valor de pH de 3 o inferior. A este valor de pH, se minimizan las posibles interacciones con los grupos silanol de la columna. A pH igual o superior a 5,5, los grupos silanol residuales de la superficie de la columna pueden estar en forma de grupo "O-". Estos grupos silanol superficiales de carga negativa pueden dar lugar a interacciones de intercambio iónico con compuestos básicos de carga positiva. Este es el tipo más habitual de cola de pico. Sin embargo, muchas separaciones se llevan a cabo de forma más óptima con valores de pH medios (4-8) o altos (> 9), ya que los componentes de la muestra no son estables a pH bajo. El pH bajo hace que los compuestos básicos se protonen y se eluyan con excesiva rapidez, o que se requieran separaciones de bandas que no resultan posibles en esas condiciones de pH.

La mayoría de los cromatografistas son conscientes de que normalmente no es recomendable el funcionamiento a pH alto (por ejemplo, pH > 8) con las columnas convencionales de sílice, debido a la posible disolución del soporte de sílice y el consiguiente fallo de la columna. También pueden surgir problemas en las separaciones diseñadas para su funcionamiento en un rango de pH de 6-8. La solubilidad del soporte de sílice puede ser importante en este rango de pH, lo que hace que la reproducibilidad de la separación y la vida útil de la columna sean menores de lo esperado. Se ha constatado que la degradación de las columnas de sílice con valores intermedios (y altos) de pH depende en gran medida de la disolución del soporte de sílice, y no de la pérdida del sustrato orgánico ligado a causa de la hidrólisis [5]. También se ha determinado que la solubilidad del soporte de sílice en el rango de pH 6-8 aumenta enormemente en presencia de tampones fosfato, en especial con temperaturas y concentración de tampón elevadas [6].

La columna Agilent Poroshell HPH C18 ha demostrado ser estable en bicarbonato amónico y tampón fosfato, y se ha convertido en una opción muy utilizada para aplicaciones con pH medio o alto. Se han publicado aplicaciones en las que se utilizan estas columnas en diferentes tampones: fosfato/borato, trietanolamina/fosfato, fosfato, hidróxido de amonio o bicarbonato amónico. Estas columnas permiten a los cromatografistas aprovechar tanto la elevada eficiencia de las columnas superficialmente porosas como su larga vida útil con valores altos de pH o temperatura [7, 8, 9].

En la Figura 2 se muestran cromatogramas obtenidos con una columna Poroshell HPH C18 de 4 µm (A) y una columna de 2,7 µm (B), ambas con un formato de 3 × 100 mm. Estos tamaños de columna se utilizan cada vez más ya que requieren menos disolvente que el antiguo formato de 4,6 mm. La reducción del consumo de disolvente reduce los costes operativos de compra y gestión de residuos de disolventes. Las columnas de 3 x 100 mm también se utilizan frecuentemente para la espectrometría de masas. Tal como se muestra en la tabla resumen y en el cromatograma, todas las formas de pico son buenas y apenas presentan cola de pico. La eficiencia de pico, medida a través del pico de trimipramina, es de 15.679 en la columna de 2,7 µm y de 8.616 en la columna de 4 µm. Ambas columnas pueden utilizarse fácilmente con un instrumento de 400 bar, con una presión de 280 bar en la columna de 2,7 µm y una presión de 143 bar en la columna de 4 µm. El tiempo de retención de la columna de 4 µm es ligeramente inferior al de la columna de 2,7 µm, pero el orden de elución y la selectividad para los compuestos es similar en ambos casos, lo que es un buen indicador de la escalabilidad de las columnas.



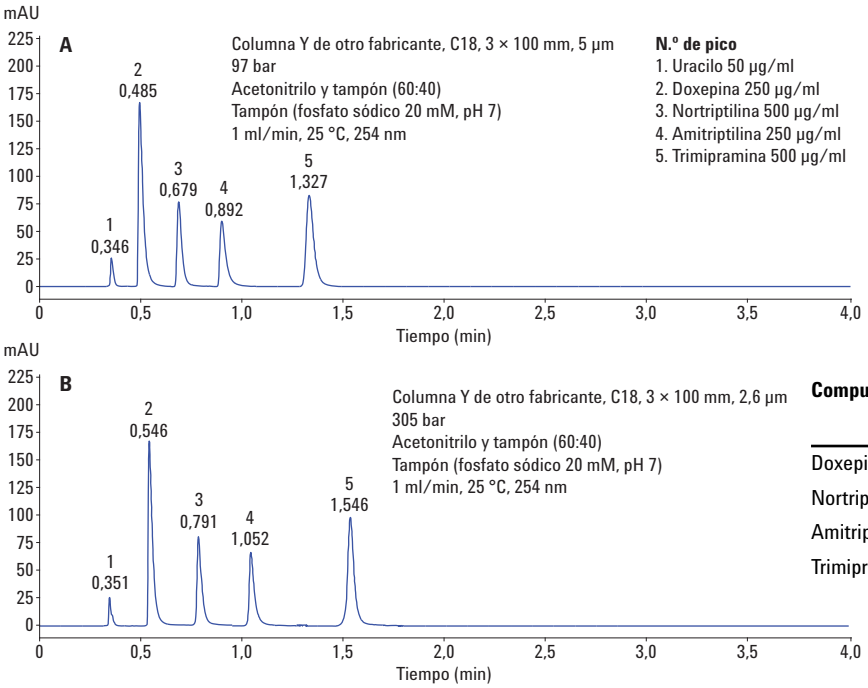
Compuesto	Colas de pico Agilent Poroshell HPH C18, 4 µm	Eficiencia Agilent Poroshell HPH C18, 4 µm	Colas de pico Agilent Poroshell HPH C18, 2,7 µm	Eficiencia Agilent Poroshell HPH C18, 2,7 µm
Doxepina	1,68	6.125	1,96	8.162
Nortriptilina	1,36	5.701	1,52	9.557
Amitriptilina	1,25	7.883	1,31	14.084
Trimipramina	1,07	8.616	1,05	15.679

Figura 2. Mezcla de antidepresivo tricíclico en tampón fosfato a pH 7 analizada con columnas Agilent Poroshell HPH C18.

En la Figura 3 se muestran los cromatogramas obtenidos con dos columnas superficialmente porosas de otro fabricante, estables a pH alto. Estos cromatogramas ponen de manifiesto que la forma del pico de las aminas tricíclicas es peor que la conseguida con las columnas Poroshell HPH C18 en la Figura 2. Debido a esta mala forma de pico en presencia de bases, la eficiencia de la columna de 2,6 µm del otro fabricante es menor que la de la columna Poroshell HPH C18 de 2,7 µm. Aunque la presión de la columna de 5 µm del otro fabricante es inferior a la de la columna Poroshell HPH de 4 µm, la diferencia es pequeña.

Conclusiones

Las columnas Agilent Poroshell HPH C18 han demostrado que ofrecen una buena durabilidad con tampones fosfato y de bicarbonato amónico a pH medio y alto, lo que las convierte en una buena opción para los cromatografistas. En esta nota de aplicación se compara la excelente forma de pico de la columna Poroshell HPH C18 con la obtenida con columnas de otro fabricante. La forma de pico influye en la eficiencia de la columna, por lo que no debe subestimarse la importancia de una buena forma de pico, sobre todo en el análisis de principios activos básicos de medicamentos.



Compuesto	Colas de pico Fabricante Y, 2,6 µm	Eficiencia Fabricante Y, 2,6 µm	Colas de pico Fabricante Y, 5 µm	Eficiencia Fabricante Y, 5 µm
Doxepina	3,22	3.099	2,97	2.522
Nortriptilina	2,07	6.710	1,96	4.056
Amitriptilina	2,14	9.163	2,41	4.684
Trimipramina	1,29	13.657	1,6	5.968

Figura 3. Mezcla de antidepresivo tricíclico en tampón fosfato a pH 7 analizada con columnas superficialmente porosas de otro fabricante.

Referencias

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**.

Más información

Estos datos representan resultados típicos. Si desea obtener más información sobre nuestros productos y servicios, visite nuestra página web www.agilent.com/chem.

www.agilent.com/chem

Solo para uso en investigación. Prohibido su uso en procedimientos diagnósticos.

Agilent no se hace responsable de ningún error incluido en este documento
ni de ningún daño incidental o consecuencial relacionado con la distribución,
la aplicación o el uso de este material.

La información, las descripciones y las especificaciones de esta publicación están
sujetas a modificación sin previo aviso.

© Agilent Technologies, Inc. 2015
Impreso en EE. UU.
7 de diciembre de 2015
5991-6512ES



Agilent Technologies