

# Analyse d'antidépresseurs tricycliques à l'aide de la colonne Agilent Poroshell HPH C18

## Note d'application

Médicaments

### Auteur

William Long  
Agilent Technologies, Inc.

### Introduction

Les antidépresseurs tricycliques (ATC) ont été découverts au début des années 1950, puis commercialisés vers la fin de la même décennie. Leur structure chimique se compose de trois anneaux d'atomes. Les antidépresseurs tétracycliques, à quatre anneaux d'atomes, constituent un groupe de composés antidépresseurs étroitement lié.

Les antidépresseurs cycliques ont été parmi les premiers à être développés. Ils représentent une solution de choix pour de nombreuses personnes, même si ils sont aujourd'hui souvent remplacés par des médicaments plus récents ayant moins d'effets indésirables. Le mode d'action des antidépresseurs cycliques est de stimuler la production de neurotransmetteurs, tels que la sérotonine et la norépinéphrine, et de les rendre plus disponibles pour le cerveau. Cela facilite la communication entre les cellules du cerveau, ce qui agit sur l'humeur. Les ATC à amines tertiaires, tels que la doxépine ou l'amitriptyline, sont des inhibiteurs plus puissants du recaptage de la sérotonine que les ATC à amines secondaires, tels que la nortriptyline et la désipramine [1,2,3].



**Agilent Technologies**

Les amines tricycliques sont également des sondes chromatographiques importantes. La figure 1 montre que les valeurs pKa pour ces composés sont élevées, et sont comprises entre 9,2 et 9,6. À un pH de 7,0, les groupements silanol sont ionisés, et les sondes basiques telles que les ATC sont fortement protonées. À pH neutre, les ATC interagissent par échange d'ions avec les groupements silanol s'ils se trouvent en leur présence. Des traînées de pics plus importantes sont observées si d'autres groupements silanol sont exposés. Le facteur de traînée de l'amitriptyline est donc utilisé pour mesurer l'activité des groupements silanol [4].

Dans cette étude, nous avons comparé la performance des colonnes Agilent Poroshell HPH C18 à des colonnes d'un autre fabricant pour l'analyse d'antidépresseurs tricycliques.

## Données expérimentales

Un système LC Agilent 1260 Infinity a été utilisé. Il comprenait les éléments suivants :

- Pompe binaire SL Agilent 1260 Infinity, pouvant générer une pression de jusqu'à 600 bars (G1312B)
- Compartiment à colonne thermostaté Agilent 1260 Infinity (G1316C)
- Échantillonneur automatique haute performance SL Plus Agilent 1260 Infinity (G1376C)
- Détecteur à barrette de diodes Agilent 1260 Infinity (G4212A) ayant un chemin de 10 mm et une cellule de 1 µL (réf. G4212-60008)

Les colonnes suivantes ont été utilisées pendant cette étude :

- Agilent Poroshell HPH C18, 3 × 100 mm, 2,7 µm (réf. 695975-502)
- Agilent Poroshell HPH C18, 3 × 100 mm, 4 µm (réf. 695970-502)
- Des colonnes à particules superficiellement poreuses stables à pH élevé neuves, 3 x 100 mm, 2,6 et 5 µm, d'un autre fabricant

Le logiciel Agilent ChemStation, version C.1.05, était utilisé pour piloter l'instrument et traiter les données.

Les composés étudiés comprenaient l'uracile (50 µg/mL), le chlorhydrate de doxépine (250 µg/mL), le chlorhydrate de nortriptyline (500 µg/mL), le chlorhydrate d'amitriptyline (250 µg/mL) et le maléate de trimipramine (500 µg/mL). Tous ces composés ont été achetés auprès de Sigma-Aldrich, Corp. et préparés dans de l'eau. La figure 1 montre leurs structures et leurs détails. Le phosphate de sodium dibasique dihydraté et phosphate de sodium monobasique dihydraté, également fournis par Sigma-Aldrich, ont été préparés séparément à une concentration de 20 mM et ajustés à pH 7,0. L'acétonitrile a été acheté auprès de Honeywell (Burdick and Jackson). L'eau était filtrée à l'aide d'un filtre de 0,2 µm à 18 MΩ à partir d'un

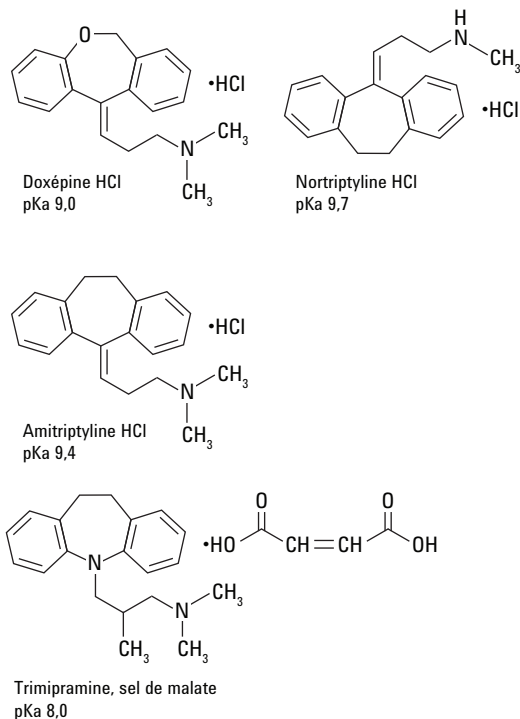


Figure 1. Structures d'amines tricycliques.

système Milli-Q (Millipore). Une phase mobile composée de 60 % d'acétonitrile et 40% de phosphate de sodium à 20 mM prémélangé a été utilisée pour évaluer les colonnes. Les colonnes étaient chauffées à 25 °C et équilibrées à 1 mL/min pendant 10 minutes avant les tests.

## Résultats et discussion

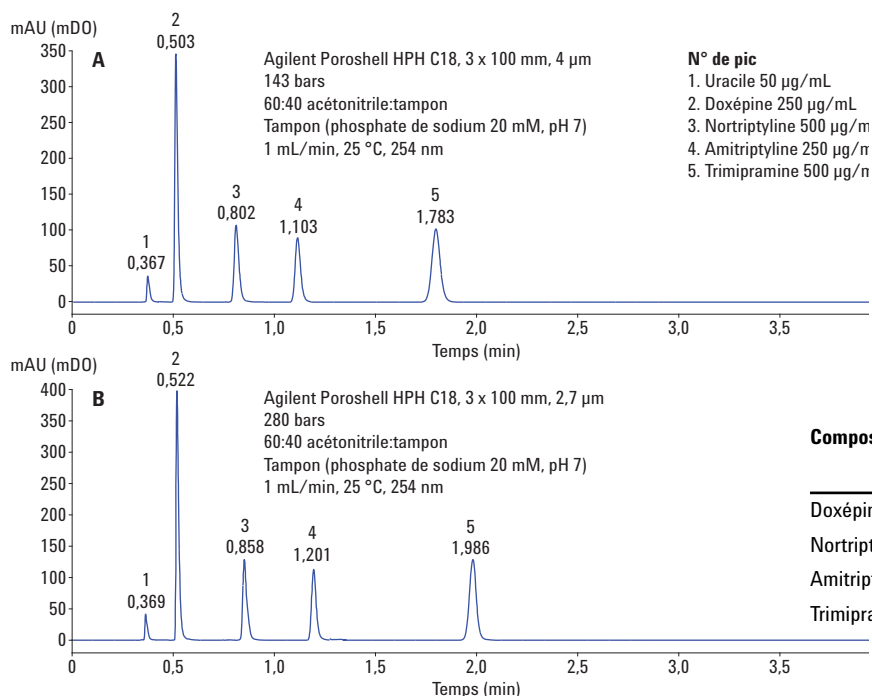
Comme indiqué dans la figure 1, les valeurs pKa des ATC étaient comprises entre 8 et 10, ce qui permet sans ambiguïté de classer ces composés comme bases. En général, les échantillons contenant des composés ionisables tels que des bases sont mieux séparés à l'aide de phases mobiles ayant un pH de 3 ou moins. À un tel pH, les interactions éventuelles avec les groupements silanol de la colonne sont réduites au minimum. À un pH supérieur ou égal à 5,5, les groupements silanol résiduels à la surface de la colonne peuvent exister sous forme de O<sup>-</sup>. Ces groupements silanol chargés négativement peuvent interagir par échange d'ions avec des composés basiques chargés positivement. Ces interactions sont la cause la plus répandue de traînée des pics. Toutefois, la plupart des séparations sont réalisées à des pH moyens (4 à 8) ou élevés (> 9) en raison de l'instabilité des composants de l'échantillon à pH faible. Les composés basiques sont protonés à pH faible et éluent trop rapidement, ou nécessitent un espacement entre les bandes qui n'est pas possible à pH faible.

Les colonnes à base de silice classiques ne sont généralement pas recommandées pour un fonctionnement à pH élevé (par exemple, pH > 8) à cause de la possibilité de dissolution de la silice et de la défaillance de colonne qu'elle entraîne. De tels problèmes peuvent apparaître lors de séparations conçues pour fonctionner entre pH 6 et 8. La solubilité du support silice peut être importante dans cette plage de pH aboutissant à une moins bonne reproductibilité des séparations et une durée de vie de colonne moins longue que celle attendue. La dégradation des colonnes à base de silice à des pH moyens (et élevés) est principalement due à la dissolution du support silice, plutôt qu'à une perte du substrat organique greffé par hydrolyse [5]. Par ailleurs, la solubilité du support silice à des pH entre 6 et 8 s'accroît considérablement en présence de tampons de phosphate, et plus particulièrement à des températures plus élevées et pour des concentrations de tampon plus élevées [6].

La colonne Agilent Poroshell HPH C18 est stable dans des tampons de bicarbonate d'ammonium et de phosphate. De ce fait cette colonne s'est imposée pour les applications à pH moyen à élevé. Des applications ont été publiées sur l'utilisation de ces colonnes dans le tampon phosphate/borate, le tampon triéthylamine/phosphate et le tampon phosphate/hydroxyde d'ammonium/bicarbonate

d'ammonium. Grâce à ces colonnes, les chromatographistes peuvent bénéficier de l'efficacité élevée des colonnes à particules superficiellement poreuses ainsi que d'une durée de vie élevée à des pH ou des températures élevés [7,8,9].

La figure 2 montre les chromatogrammes obtenus avec des colonnes Poroshell HPH C18, 4 µm (A) et 2,7 µm (B), 3 x 100 mm. Ces colonnes sont de plus en plus appréciées car elles utilisent moins de solvant que celles de l'ancien format de 4,6 mm, engendrant une réduction des coûts liés à l'achat et à l'élimination des solvants. Les colonnes de 3 x 100 mm sont fréquemment utilisées lors de couplage avec la spectrométrie de masse. Comme indiqué dans le tableau récapitulatif et dans le chromatogramme, les formes des pics sont correctes et les traînées de pics minimales. L'efficacité de pic, mesurée à partir du pic de la trimipramine, est de 15 679 sur la colonne de 2,7 µm et de 8 616 sur la colonne de 4 µm. Les deux colonnes peuvent être installées sur un instrument de 400 bars, avec une pression de 280 bars pour la colonne de 2,7 µm et de 143 bars pour la colonne de 4 µm. Le temps de rétention sur la colonne de 4 µm est légèrement inférieur à celui sur la colonne de 2,7 µm, mais l'ordre d'éluion et la sélectivité des composés est similaire, démontrant ainsi l'adaptation des deux colonnes.



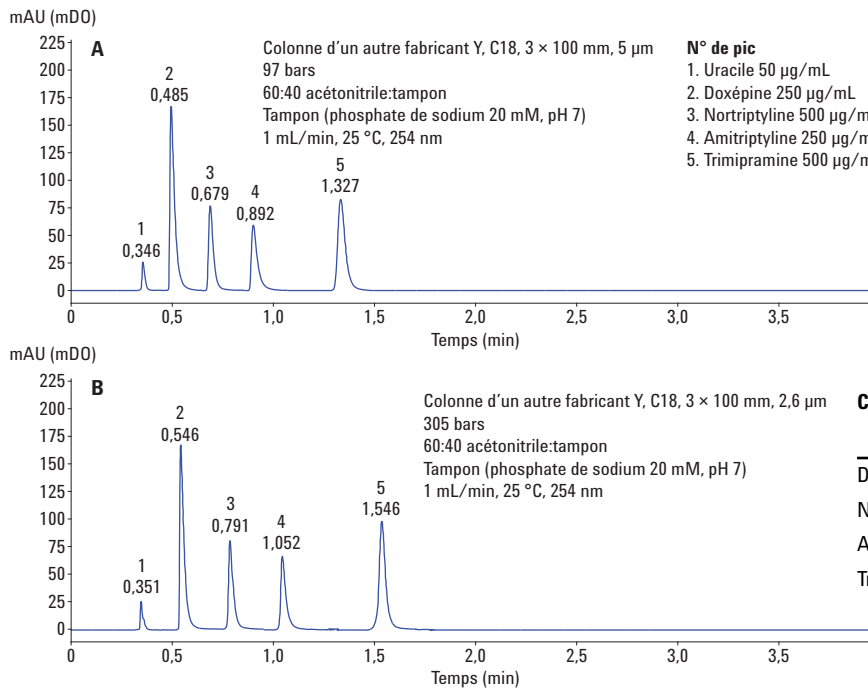
Composé	Trainée de pic Agilent Poroshell HPH C18, 4 µm	Efficacité Agilent Poroshell HPH C18, 4 µm	Trainée de pic Agilent Poroshell HPH C18, 2,7 µm	Efficacité Agilent Poroshell HPH C18, 2,7 µm
Doxépine	1,68	6 125	1,96	8 162
Nortriptyline	1,36	5 701	1,52	9 557
Amitriptyline	1,25	7 883	1,31	14 084
Trimipramine	1,07	8 616	1,05	15 679

Figure 2. Mélange d'antidépresseurs tricycliques dans du tampon de phosphate à pH 7 sur colonnes Agilent Poroshell HPH C18.

La figure 3 montre les chromatogrammes obtenus avec deux colonnes à particules superficiellement poreuses stables à pH élevé d'un autre fabricant. Les chromatogrammes montrent que la forme des pics pour les amines tricycliques est moins bonne que celle obtenue avec les colonnes Poroshell HPH C18 dans la figure 2. En raison de cette mauvaise forme de pic pour les bases, l'efficacité de la colonne de 2,6 µm de l'autre fabricant est inférieure à celle de la colonne Poroshell HPH C18 de 2,7 µm. Bien que la pression dans la colonne de 5 µm de l'autre fabricant soit inférieure à celle dans la colonne Poroshell HPH de 4 µm, la différence est minime.

## Conclusions

Nous avons montré que les colonnes Agilent Poroshell HPH C18 ont une bonne durée de vie avec des tampons de phosphate et de bicarbonate d'ammonium à des pH moyens à élevés ; elles représentent donc un bon choix pour les chromatographistes. Dans cette note d'application, nous avons comparé la forme de pic excellente obtenue avec les colonnes Poroshell HPH C18 à des équipements d'autres fabricants. Puisque la forme de pic a un effet sur l'efficacité de la colonne, il convient de ne pas sous estimer l'importance d'une bonne forme de pic, surtout lors de l'analyse de composés pharmaceutiques basiques.



Composé	Trainée	Efficacité	Trainée	Efficacité
	de pic Fabricant Y, 2,6 µm	Fabricant Y, 2,6 µm	de pic Fabricant Y, 5 µm	Fabricant Y, 5 µm
Doxépine	3,22	3 099	2,97	2 522
Nortriptyline	2,07	6 710	1,96	4 056
Amitriptyline	2,14	9 163	2,41	4 684
Trimipramine	1,29	13 657	1,6	5 968

Figure 3. Mélange d'antidépresseurs tricycliques dans du tampon de phosphate à pH 7 sur des colonne à particules superficiellement poreuses d'un autre fabricant.

## Références

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](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**.

## Pour plus d'informations

Ces données représentent des résultats types. Pour plus d'informations sur nos produits et services, consultez notre site Internet sur [www.agilent.com/chem](http://www.agilent.com/chem).

[www.agilent.com/chem](http://www.agilent.com/chem)

Utilisation en recherche uniquement. Ne pas utiliser dans les procédures de diagnostic.

Agilent décline toute responsabilité en cas d'erreurs dans le présent document, ainsi qu'en cas de dommages fortuits ou consécutifs à la fourniture, aux performances ou à l'utilisation de ce matériel.

Les informations, descriptions et spécifications de cette publication peuvent être modifiées sans préavis.

© Agilent Technologies, Inc., 2015  
Imprimé aux États-Unis,  
7 décembre 2015  
5991-6512FR



**Agilent Technologies**