# Analisi di antidepressivi triciclici con le colonne Poroshell HPH C18 Agilent

## Nota applicativa

Piccole molecole prodotti farmaceutici


## Autore

William Long

Agilent Technologies, Inc.


## Introduzione

Gli antidepressivi triciclici (TCA) sono stati scoperti all'inizio degli anni ‘50 e commercializzati successivamente nello stesso decennio. La loro struttura chimica contiene tre anelli di atomi. Gli antidepressivi tetraciclici, che contengono quattro anelli di atomi, sono un gruppo di composti antidepressivi strettamente correlati.

Gli antidepressivi ciclici sono stati tra i primi antidepressivi sviluppati. Sebbene vengano spesso sostituiti da farmaci più recenti che causano meno effetti collaterali, rappresentano ancora una buona opzione per molte persone. Gli antidepressivi ciclici funzionano aumentando la disponibilità nel cervello di neurotrasmettitori quali la serotonina e la noradrenalina. Questo aiuta le cellule del cervello a comunicare meglio, il che a sua volta influenza l’umore. I TCA contenenti un’ammina terziaria, come la doxepina e l’amitriptilina, sono degli inibitori della ricaptazione della serotonina più potenti rispetto ai TCA contenenti un’ammina secondaria, come la nortriptilina e la desipramina [1,2,3].

Le ammine tricicliche sono importanti anche come sonde cromatografiche. La figura 1 mostra come questi composti abbiano valori di pKa elevati, che vanno da 9,2 a 9,6. A pH 7,0, i silanoli della silice sono in forma ionizzata e le sonde basiche come i TCA sono altamente protonate. A pH neutro, se esposti ai silanoli della silice, i TCA stabiliscono interazioni a scambio ionico con queste sostanze. Se vengono esposti più silanoli, si può osservare un maggiore scodamento dei picchi. Lo scodamento dell'amitriptilina è utilizzato come misura dell'attività dei silanoli [4].

Nel presente lavoro mettiamo a confronto le prestazioni delle colonne Poroshell HPH C18 Agilent e delle colonne di un altro fornitore nell'analisi di antidepressivi triciclici.

## Risultati sperimentali

È stato utilizzato un sistema LC Agilent 1260 Infinity, comprendente i seguenti componenti:

- pompa binaria Agilent 1260 Infinity SL, che permette di ottenere pressioni fino a 600 bar (G1312B)
- comparto colonna termostatato Agilent 1260 Infinity (G1316C)
- autocampionatore ad alte prestazioni Agilent 1260 Infinity SL Plus (G1376C)
- rivelatore a serie di diodi Agilent 1260 Infinity (G4212A) dotato di una cella a flusso da 1 µL, con una lunghezza del percorso di 10 mm (codice G4212-60008)

Nel presente studio sono state impiegate le seguenti colonne:

- Poroshell HPH C18 Agilent, 3 × 100 mm, 2,7 µm (codice 695975-502)
- Poroshell HPH C18 Agilent, 3 × 100 mm, 4 µm (codice 695970-502)
- nuove colonne con particelle a superficie porosa stabili a pH elevato, 3 × 100 mm, 2,6 e 5 µm, di un altro fornitore

Per controllare lo strumento ed elaborare i dati è stato utilizzato il software Agilent ChemStation, versione C.1.05.

I composti esaminati comprendevano uracile (50 µg/mL), doxepina cloridrato (250 µg/mL), nortriptilina cloridrato (500 µg/mL), amitriptilina cloridrato (250 µg/mL) e trimipramina maleato (500 µg/mL). Tutti i composti sono stati acquistati da Sigma-Aldrich, Corp. e preparati in acqua. La figura 1 ne mostra le strutture e i dettagli. Il sodio fosfato dibasico diidrato e il sodio fosfato monobasico diidrato, ottenuti anch'essi da Sigma-Aldrich, sono stati preparati separatamente a una concentrazione di 20 mM e titolati a pH 7,0. L'acetonitrile è

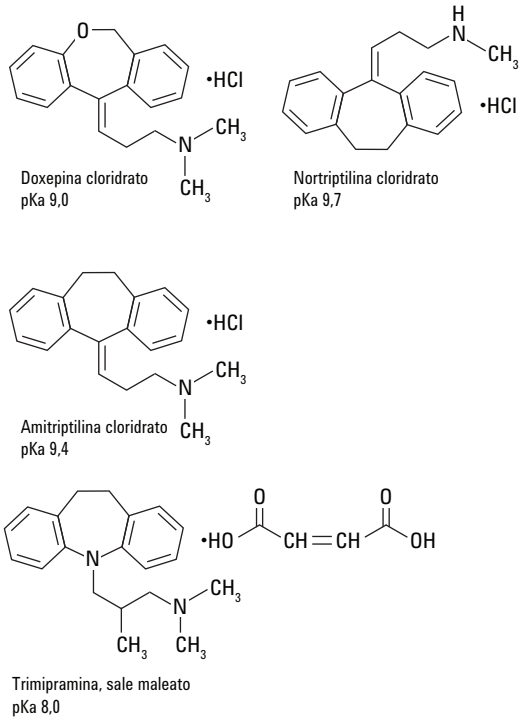



Figura 1. Strutture delle ammine tricicliche.

stato acquistato da Honeywell (Burdick and Jackson). L'acqua (18 MΩ), è stata filtrata con un sistema Milli-Q (Millipore) da 0,2 µm. Per valutare le colonne è stata usata una fase mobile premiscelata composta per il 60% da acetonitrile e per il 40% da fosfato di sodio 20 mM. Le colonne sono state riscaldate a 25 °C ed equilibrate per 10 minuti a 1 mL/min prima del test.

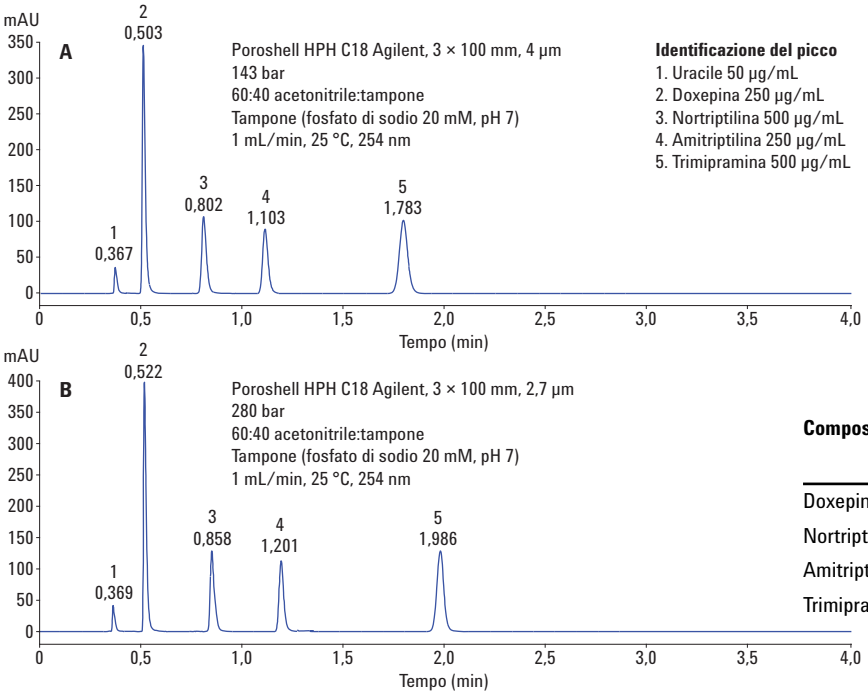
## Risultati e discussione

Come riportato nella figura 1, i valori di pKa dei TCA sono compresi tra 8 e 10, e questo permette di classificare chiaramente questi composti come basi. In genere, i campioni contenenti composti ionizzabili come le basi vengono separati meglio utilizzando fasi mobili a pH 3 o inferiore. A questi valori di pH, le potenziali interazioni con i silanoli della colonna vengono ridotte al minimo. A pH 5,5 o superiore, i silanoli residui sulla superficie della colonna possono trovarsi nella forma O-. Questi silanoli di superficie carichi negativamente possono stabilire interazioni a scambio ionico con composti basici carichi positivamente. Ciò è più comunemente all'origine dello scodamento dei picchi cromatografici. Tuttavia, molte separazioni risultano migliori a valori di pH intermedi (4-8) o elevati (>9), perché i componenti del campione non sono stabili a bassi valori di pH. I composti basici sono protonati a basso pH e vengono eluiti troppo rapidamente, o richiedono separazione dei picchi cromatografici difficilmente ottenibile a bassi valori di pH.

La maggior parte degli operatori di cromatografia sa che l'utilizzo a pH elevato (ad esempio, pH >8) delle convenzionali colonne a base di silice è sconsigliato, a causa della possibile dissoluzione del supporto in silice associata a un danneggiamento della colonna. Possono verificarsi problemi nelle separazioni progettate per essere effettuate nell'intervallo di pH 6-8. In questo intervallo di pH, la solubilità del supporto in silice può essere significativa, per cui la riproducibilità della separazione e la durata della colonna risultano inferiori alle attese. È stato dimostrato che la degradazione a valori di pH intermedi (o elevati) delle colonne a base di silice dipende in misura preponderante dalla dissoluzione del supporto in silice piuttosto che da una idrolisi della fase legata alla silice [5]. È stato anche osservato che la solubilità dei supporti in silice nell'intervallo di pH 6-8 aumenta ampiamente in presenza di tamponi fosfato, in particolare a temperature e concentrazioni di tampone più elevate [6].

La colonna Poroshell HPH C18 Agilent ha dimostrato di essere stabile nei tamponi fosfato e bicarbonato di ammonio e questo ha favorito un suo maggiore utilizzo nelle applicazioni a pH medio-alti. Sono state pubblicate applicazioni che utilizzano queste colonne con tampone fosfato/borato, tampone trietilammina/fosfato e tampone fosfato, idrossido di ammonio e bicarbonato di ammonio. Con queste colonne, gli operatori di cromatografia possono sfruttare il vantaggio dell'alta efficienza delle colonne con particelle a superficie porosa, unito a una lunga durata a pH o temperatura elevati [7,8,9].

La figura 2 mostra i cromatogrammi ottenuti utilizzando colonne Poroshell HPH C18, 4 µm (A) e 2,7 µm (B), nel formato 3 × 100 mm. Queste dimensioni stanno diventando più comuni, perché utilizzano meno solvente rispetto al precedente formato da 4,6 mm. Usare meno solvente significa ridurre i costi operativi per l'acquisto e lo smaltimento dei solventi. La colonne da 3 x 100 mm sono usate comunemente anche per la spettrometria di massa. Come mostrato nella tabella riassuntiva e nel cromatogramma, tutte le forme dei picchi sono buone, con uno scodamento minimo. L'efficienza di picco, valutata attraverso il picco della trimipramina, è di 15.679 sulla colonna da 2,7 µm e di 8.616 sulla colonna da 4 µm. Entrambe le colonne possono essere utilizzate facilmente su uno strumento da 400 bar, con una pressione di 280 bar sulla colonna da 2,7 µm e di 143 bar sulla colonna da 4 µm. Il tempo di ritenzione sulla colonna da 4 µm è leggermente inferiore che sulla colonna da 2,7 µm, ma l'ordine di eluizione e la selettività dei composti è simile in entrambi i casi, il che dimostra la scalabilità delle colonne.



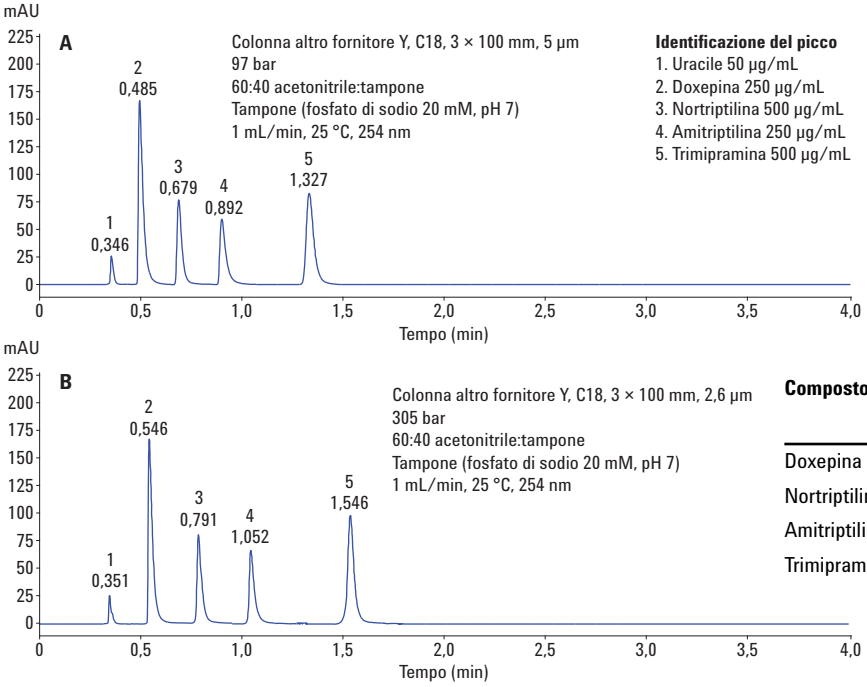

| Composto | Scodamento Poroshell HPH C18 Agilent, 4 µm | Efficienza Poroshell HPH C18 Agilent, 4 µm | Scodamento Poroshell HPH C18 Agilent, 2,7 µm | Efficienza Poroshell HPH C18 Agilent, 2,7 µm |
|---|---|---|---|---|
| Doxepina | 1,68 | 6.125 | 1,96 | 8.162 |
| Nortriptilina | 1,36 | 5.701 | 1,52 | 9.557 |
| Amitriptilina | 1,25 | 7.883 | 1,31 | 14.084 |
| Trimipramina | 1,07 | 8.616 | 1,05 | 15.679 |

Figura 2. Miscela di antidepressivi triciclici in tampone fosfato a pH 7 su colonne Poroshell HPH C18 Agilent.

La figura 3 mostra i cromatogrammi ottenuti utilizzando due colonne con particelle a superficie porosa stabili a pH elevato di un altro fornitore. I cromatogrammi mostrano una forma dei picchi per le ammine tricicliche peggiore di quella ottenuta con le colonne Poroshell HPH C18, mostrata nella figura 2. A causa di questa forma dei picchi non ottimale per le basi, l'efficienza della colonna da 2,6 µm dell'altro fornitore è minore di quella della colonna Poroshell HPH C18 da 2,7 µm. Sebbene la pressione della colonna da 5 µm dell'altro fornitore sia inferiore a quella della colonna Poroshell HPH da 4 µm, la differenza è piccola.

## Conclusioni

Le colonne Poroshell HPH C18 Agilent hanno dimostrato una buona durata nei tamponi fosfato e bicarbonato di ammonio a valori di pH intermedi e alti, e rappresentano quindi una buona scelta per gli operatori di cromatografia. Nella presente nota applicativa, l'eccellente forma dei picchi delle colonne Poroshell HPH C18 viene confrontata con i materiali di un altro fornitore. Poiché la forma dei picchi influenza l'efficienza della colonna, l'importanza di una buona forma dei picchi, specialmente nell'analisi di composti farmaceutici basici, non dovrebbe essere sottostimata.




| Composto | Scodamento fornitore Y, 2,6 µm | Efficienza fornitore Y, 2,6 µm | Scodamento fornitore Y, 5 µm | Efficienza fornitore 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. Miscela di antidepressivi triciclici in tampone fosfato a pH 7 su colonne con particelle a superficie porosa di un altro fornitore.

## Bibliografia


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**.


## Ulteriori informazioni

Questi dati rappresentano i risultati tipici. Per ulteriori informazioni sui nostri prodotti e servizi, visitare il nostro sito web all'indirizzo www.agilent.com/chem.

www.agilent.com/chem

Solo per scopi di ricerca. Non utilizzabili per procedure diagnostiche.

Agilent non può essere ritenuta responsabile per errori contenuti nella presente pubblicazione o per danni accidentali o consequenziali derivanti dalla fornitura, dalle prestazioni o dall'utilizzo del presente materiale.

Le informazioni, descrizioni e specifiche fornite possono variare senza preavviso.

© Agilent Technologies, Inc. 2015
Stampato negli Stati Uniti
7 dicembre 2015
5991-6512ITE



Agilent Technologies