Análise de antidepressivos tricíclicos usando Agilent Poroshell HPH C18

Nota de aplicação

Fármacos de moléculas pequenas

Autor

William Long

Agilent Technologies, Inc.

Introdução

Os antidepressivos tricíclicos (TCAs) foram descobertos no início dos anos 1950 e lançados no mercado no final dessa década. Suas estruturas químicas contém um núcleo com três anéis. Os antidepressivos tetracíclicos, que contêm um núcleo com quatro anéis, são um grupo de compostos antidepressivos bastante relacionados.

Os antidepressivos cíclicos estão entre os primeiros antidepressivos desenvolvidos. Embora sejam substituídos com frequência por drogas que causam menos efeitos colaterais, ainda são uma boa opção para muitas pessoas. Os antidepressivos cíclicos disponibilizam mais neurotransmissores para o cérebro como a serotonina e a norepinefrina, o que ajuda a melhorar a comunicação dos neurônios e, como consequência, afeta o humor. TCAs de amina terciária, como a doxepina e a amitriptilina, são inibidores mais potentes da reabsorção de serotonina do que os TCAs de amina secundária, como a nortriptilina e a desipramina [1,2,3].

Agilent Technologies

As aminas tricíclicas também são importantes compostos-teste para cromatografia. A Figura 1 demonstra que esses componentes têm altos valores de pKa, de 9,2 a 9,6. Em pH 7.0, os silanóis da sílica estão em sua forma ionizada, e moléculas básicas como os TCAs estão altamente protonadas. Em pH neutro, os TCAs podem interagir por mecanismo de troca iônica com os silanóis da sílica, se estiverem expostos. Uma maior cauda no pico pode ser observada quanto mais silanóis estiverem expostos. O fator de alargamento de amitriptilina é usado como medida da atividade silanofílica [4].

Neste trabalho, comparamos o desempenho de colunas Agilent Poroshell HPH C18 e de colunas de outro fornecedor para a análise cromatográfica de antidepressivos cíclicos.

Parte Experimental

Um LC Agilent 1260 Infinity foi usado, composto de:

- Bomba binária SL Agilent 1260 Infinity, capaz de operar até 600 bar (G1312B)
- Compartimento da coluna termostatizado Agilent 1260 Infinity (G1316C)
- Amostrador automático de alto desempenho SL Plus Agilent 1260 Infinity (G1376C)
- Detector de arranjo de diodos Agilent 1260 Infinity (G4212A) equipado com uma cela de fluxo de 1 µL com caminho óptico de 10 mm (p/n G4212-60008)

As seguintes colunas foram usadas nesse estudo:

- Agilent Poroshell HPH C18, 3 × 100 mm, 2,7 µm (p/n 695975-502)
- Agilent Poroshell HPH C18, 3 × 100 mm, 4 µm (p/n 695970-502)
- Colunas novas, superficialmente porosas resistentes a pH alto, 3 × 100 mm, 2,6 e 5 µm, de outro fornecedor

O software Agilent ChemStation, versão C.1.05, foi usado para controlar o instrumento e processar os dados.

Os componentes examinados foram uracila (50 µg/mL), hidrocloreto de doxepina (250 µg/mL), hidrocloreto de nortriptilina (500 µg/mL), hidrocloreto de amitriptilina (250 µg/mL) e maleato de trimipramina (500 µg/mL). Todos foram comprados da Sigma-Aldrich, Corp. e preparados em água. A Figura 1 mostra as estruturas e os detalhes. O diidrato dibásico de fosfato de sódio e o diidrato monobásico de fosfato de sódio, também da Sigma-Aldrich, foram preparados separadamente a 20 mM e titulado em pH 7.0. A acetonitrila

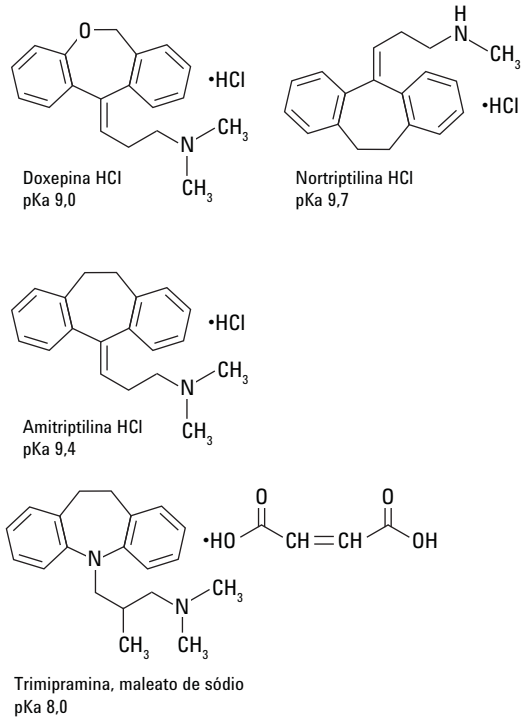


Figura 1. Estruturas de amina tricíclica.

foi comprada da Honeywell (Burdick e Jackson). A água foi filtrada a 0,2 µm em um sistema Milli-Q a 18 MΩ (Millipore). Um fase móvel pré-homogeneizada composta de 60 % de acetonitrila e 40% de fosfato de sódio 20 mM foi usada para avaliar as colunas. As colunas foram aquecidas a 25 °C e equilibradas a 1 mL/min por 10 minutos antes dos testes.

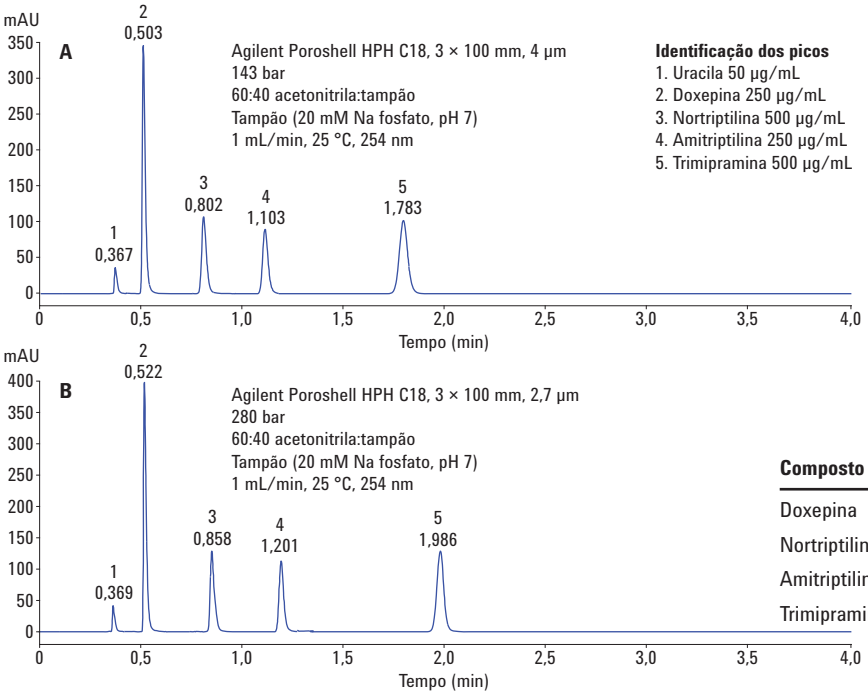
Resultados e discussão

Conforme listado na Figura 1, os valores de pKa dos TCAs ficaram entre 8 e 10, classificando de forma clara esses compostos como bases. Amostras com compostos ionizáveis, como os compostos básicos, geralmente são melhor separadas com fases móveis em pH 3 ou mais baixo. Nesse pH, possíveis interações com os silanóis da coluna são minimizadas. Em pH 5,5 e mais altos, podem existir silanóis residuais como O- na superfície da coluna. Esses silanóis com carga negativa na superfície podem ter interações de troca iônica com compostos básicos com carga positiva. Esse é o tipo mais comum de cauda de pico. No entanto, muitas separações são feitas de forma mais otimizada em pH médio (4-8) e mais alto (>9), visto que os compostos da amostra não são estáveis em pH baixo. Compostos básicos são protonados em pH baixo e eluem muito rapidamente, ou exigem espaçamentos de bandas não encontrados em pH baixo.

Sabe-se que colunas de sílica-convencionais não são recomendadas para operar em pH mais alto (por exemplo, pH >8), devido ao poder de dissolução do suporte de sílica acompanhado de danificação da coluna. Podem surgir problemas em separações desenvolvidas para operar na faixa de pH de 6 a 8. A solubilidade do suporte de sílica pode ser significativa nessa faixa de pH, portanto a reprodutibilidade da separação e a vida útil da coluna são menores do que o esperado. Foi documentado que a degradação de colunas baseadas em sílica em pH intermediário (e mais alto) é basicamente uma função de dissolução do suporte de sílica, em vez de uma perda de substrato orgânico ligado devido à hidrólise [5]. Também foi relatado que a solubilidade do suporte de sílica na faixa de pH de 6 a 8 é bastante aumentada na presença de tampões de fosfato, principalmente em temperaturas e concentrações de tampão mais altas [6].

A coluna Agilent Poroshell HPH C18 demonstrou ser estável nos tampões de bicarbonato de amônio e de fosfato e tornou-se uma opção de coluna mais popular para aplicações em pH intermediário e alto. Aplicações foram publicadas usando essas colunas em tampão borato-fosfato, tampão trietanolamina/fosfato e tampão de fosfato, hidróxido de amônio e bicarbonato de amônio. Com essas colunas, obtêm-se as vantagens da alta eficiência de colunas superficialmente porosas somadas a uma maior vida útil em pH ou temperatura elevada [7,8,9].

A Figura 2 mostra cromatogramas de uma coluna Poroshell HPH C18, 4 µm (A) e uma coluna de 2,7 µm (B) em um formato de 3 × 100 mm. Essas dimensões estão se tornando mais populares, pois usam menos solvente do que o formato antigo de 4,6 mm. Usar menos solvente significa custos operacionais mais baixos na aquisição e descarte de solventes. Colunas de 3 × 100 mm também são usadas com frequência quando a detecção é por espectrometria de massas. Como mostrado na tabela de resumo e no cromatograma, todos os picos apresentam bons formatos e com o mínimo de cauda. A eficiência medida pelo pico de trimipramina na coluna de 2,7 µm é de 15.679 e de 8.616 na coluna de 4 µm. Ambas as colunas podem ser adequadamente usadas em um instrumento de 400 bar, com pressão de 280 bar na coluna de 2,7 µm e 143 bar na coluna de 4 µm. O tempo de retenção na coluna de 4 µm é um pouco menor do que na coluna de 2,7 µm, mas a ordem de eluição e a seletividade dos compostos é semelhante em ambas, indicando a escalabilidade das colunas.



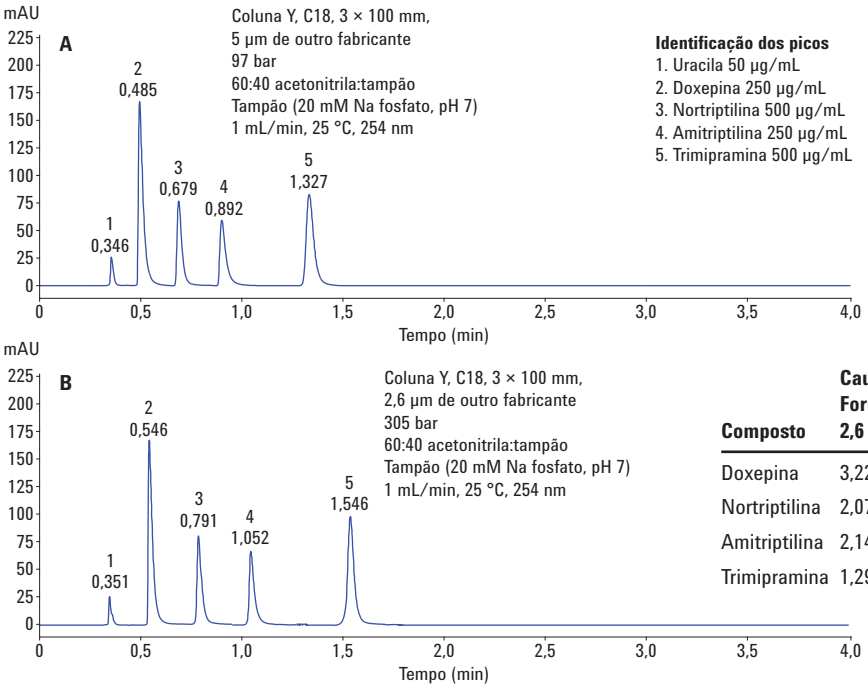
Composto	Cauda do pico Agilent Poroshell HPH C18, 4 µm	Eficiência Agilent Poroshell HPH C18, 4 µm	Cauda do pico Agilent Poroshell HPH C18, 2,7 µm	Eficiência Agilent Poroshell HPH C18, 2,7 µm
Doxepina	1,68	6.125	1,96	8.162
Nortriptilina	1,36	5.701	1,52	9.557
Amitriptilina	1,25	7.883	1,31	14.084
Trimipramina	1,07	8.616	1,05	15.679

Figura 2. Cromatograma da mistura de antidepressivos tricíclicos em tampão de fosfato em pH 7 em colunas Agilent Poroshell HPH C18.

A Figura 3 mostra cromatogramas de duas colunas superficialmente porosas estáveis em pH alto de um outro fornecedor. Os cromatogramas mostram que o formato dos picos das aminas tricíclicas foi de menor qualidade do que os obtidos pelas colunas Poroshell HPH C18 na Figura 2. Devido a esse formato do pico de qualidade inferior para os compostos básicos, a eficiência é menor na coluna de 2,6 µm de outro fornecedor do que na coluna Poroshell HPH C18 de 2,7 µm. Embora a pressão da coluna de 5 µm do outro fornecedor seja menor do que a da coluna Poroshell HPH de 4 µm, a diferença é pequena.

Conclusões

As colunas Agilent Poroshell HPH C18 mostraram ter boa durabilidade em tampões de bicarbonato de amônio e de fosfato em pH alto e intermediário, tornado-as uma boa opção para analistas. Nessa nota de aplicação, o formato do pico excelente com a Poroshell HPH C18 é comparado com materiais de outro fornecedor. Visto que o formato do pico influencia a eficiência da coluna, a importância de um bom formato do pico, principalmente ao analisar compostos farmacêuticos básicos, não deve ser subestimada.



Composto	Cauda do pico Fornecedor Y, 2,6 µm	Eficiência Fornecedor Y, 2,6 µm	Cauda do pico Fornecedor Y, 5 µm	Eficiência Fornecedor 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. Cromatograma da mistura de antidepressivos tricíclicos em tampão de fosfato em pH 7 em colunas superficialmente porosas de outro fornecedor.

Referências

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**.

Mais informações

Estes dados representam os resultados típicos.
Para obter mais informações sobre nossos produtos e serviços, acesse o site www.agilent.com/chem.

www.agilent.com/chem

Somente para uso em pesquisas. Não devem ser usados em procedimentos de diagnóstico.

A Agilent Technologies não será responsável por erros contidos neste documento ou por danos incidentais ou consequenciais em relação ao fornecimento, desempenho ou uso deste material.

As informações, descrições e especificações nesta publicação estão sujeitas a mudanças sem aviso prévio.

© Agilent Technologies, Inc., 2015
Impresso nos EUA
07 de dezembro de 2015
5991-6512PTBR



Agilent Technologies