

# Agilent Poroshell HPH C18-Säulen: Trennung von Betablockern bei niedrigem und hohem pH-Wert

## Application Note

Small Molecule Pharmaceuticals

### Autor

William Long  
Agilent Technologies, Inc.

### Einführung

Bei Betablockern, oder Beta-Rezeptorblockern, handelt es sich um eine Arzneimittelklasse, die zur Behandlung von Bluthochdruck und Herzrhythmusstörungen eingesetzt wird. Als Beta-Adrenozeptor-Antagonisten verringern sie die Wirkung von Epinephrin (Adrenalin) und anderen Stresshormonen, indem sie die Bindung dieser Hormone an die Betarezeptoren der Nervenenden hemmen. Der erste Betablocker wurde 1958 von den Eli Lilly Laboratories synthetisiert, aber erst 1962 wurden die ersten klinisch relevanten Betablocker Propranolol und Pronethalol entwickelt und zur Behandlung von Angina pectoris eingesetzt.

Betablocker hemmen die Wirkung von Adrenalin und Noradrenalin, insbesondere auf  $\beta$ -Adrenozeptoren, die Teil des sympathischen Nervensystems sind und die Stressreaktion (Fight-or-flight-Reaktion) herbeiführen. Es sind drei Arten von Beta-Rezeptoren bekannt, die als  $\beta_1$ -,  $\beta_2$ - und  $\beta_3$ -Rezeptoren bezeichnet werden.  $\beta_1$ -Adrenozeptoren kommen vor allem im Herz und in den Nieren vor,  $\beta_2$ -Adrenozeptoren dagegen meist in der Lunge, im Magen-Darm-Trakt, in der Leber, im Uterus, in der glatten Gefäßmuskulatur und in der Skelettmuskulatur.  $\beta_3$ -Adrenozeptoren findet man in Fettzellen.

Es gibt viele Betablocker, die sich darin unterscheiden, welchen Beta-Rezeptor sie hemmen und welche Wirkung sie dadurch haben. Nicht-selektive Betablocker, wie z. B. Propranolol, hemmen  $\beta_1$ - und  $\beta_2$ -Rezeptoren und wirken auf das Herz, die Blutgefäße und die Atemwege. Selektive Betablocker, wie z. B. Metoprolol, hemmen hauptsächlich  $\beta_1$ -Rezeptoren und wirken daher meist auf das Herz, nicht aber auf die Atemwege. Manche Betablocker, wie z. B. Pindolol, imitieren die Wirkung von Epinephrin und Norepinephrin und können einen Anstieg des Blutdrucks und der Herzfrequenz verursachen [1,2].

Die Verwendung einer mobilen Phase mit hohem pH-Wert zur Analyse von basischen Substanzen, wie z. B. Betablockern, kann mit Agilent Poroshell HPH C18-Säulen mit 2,7- $\mu\text{m}$ - oder 4- $\mu\text{m}$ -Partikeln zur Routine werden. Diese Säulen ermöglichen die Untersuchung eines größeren pH-Bereichs bei der Methodenentwicklung für Packungsmaterial mit poröser Partikeloberfläche. Säulen mit diesen Partikeln finden aufgrund ihrer hohen Effizienz und Geschwindigkeit immer größere Verbreitung.



Agilent Technologies

## 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 Thermostatisierter Säulenofen (G1316C)
- Agilent 1260 Infinity Hochleistungsprobengeber SL Plus (G1376C)
- Agilent 1260 Infinity Diodenarray-Detektor (G4212A) mit 10 mm Schichtdicke und 1- $\mu$ l-Durchflusszelle  
(Best.-Nr. G4212-60008)

In dieser Untersuchung wurden folgende Säulen verwendet:

- Agilent Poroshell HPH C18, 4,6  $\times$  100 mm, 2,7  $\mu$ m  
(Best.-Nr. 695975-702)
- Agilent Poroshell HPH C18, 4,6  $\times$  100 mm, 4  $\mu$ m  
(Best.-Nr. 695970-702)

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

Die untersuchten Verbindungen waren Uracil und eine Reihe von Betablockern. Es wurde jeweils eine Lösung in Wasser:Acetonitril (50:50) mit 1 mg/ml hergestellt. Dann wurden jeweils gleiche Teile gemischt, um eine Lösung von ungefähr 0,143  $\mu$ g/ml Atenolol, Pindolol, Acebutolol, Metoprolol, Oxprenolol, Alprenolol und Propranolol herzustellen. Abbildung 1 zeigt die Strukturen und Details. Es wurden 10 mM Lösungen von Ammoniumformiat und Ameisensäure hergestellt. Damit wurde ein Puffer bei niedrigem pH-Wert (pH 3) hergestellt. Ammoniumformiat wurde von Sigma-Aldrich, Corp. gekauft und zweifach destillierte Ameisensäure wurde von GFS gekauft. Ammoniumbicarbonat und Ammoniumhydroxid wurden verwendet, um einen Puffer bei pH 10 herzustellen; beide Substanzen wurden von Sigma-Aldrich bezogen.

Die Säulen wurden bei 25 °C temperiert und mit 1 ml/min 10 Minuten vor den Tests äquilibriert.

## Ergebnisse und Diskussion

Abbildung 1 zeigt die verschiedenen Strukturen der verwendeten Betablocker. Diese Vielfalt ermöglicht eine große Anzahl von Wirkmöglichkeiten auf unterschiedliche Teile des Körpers. Betablocker sind basische Substanzen, die eine sekundäre Aminogruppe in ihrer Struktur enthalten.

Abbildung 2 zeigt Chromatogramme wie sie als Ergebnis zu Beginn der Methodenentwicklung erhalten werden können. Wie gezeigt ist die Trennung erfolgreich, die Peakform der später eluierenden Peaks ist jedoch nicht sehr gut. Da die Konzentration des Puffers in der mobilen Phase geringer wird, fällt die Basislinie ab und die Peaks werden etwas breiter und kleiner.

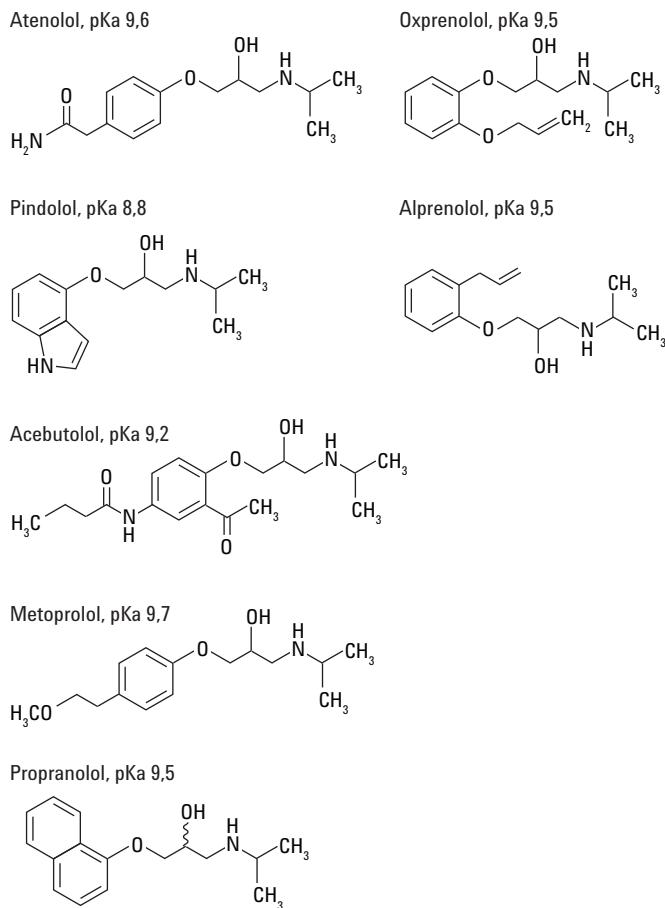


Abbildung 1: Strukturen von  $\beta$ -Blockern.

Dadurch wird die Quantifizierung erschwert. Dies könnte dadurch korrigiert werden, dass auch Puffer oder Mobilphasen-Modifier in das Acetonitril gegeben wird. Man erhält das gleiche chromatographische Verhalten sowohl auf der Poroshell HPH C18-Säule mit 2,7- $\mu$ m-Partikeln (A) als auch auf der Poroshell HPH C18-Säule mit 4- $\mu$ m-Partikeln (B). Dies weist darauf hin, dass die chromatographische Trennung übertragbar ist.

Abbildung 3 zeigt die chromatographische Trennung der Mischung bei pH 10,5. In dieser basischen mobilen Phase ist die Trennung der vollständig protonierten basischen Substanzen besser als die mit der sauren mobilen Phase erhaltene Trennung in Abbildung 2. In allen Fällen ist die Peakform besser, das Tailing ist geringer, die Peaks sind größer und die Retentionszeit ist länger als in Abbildung 2. Die Peaks Nr. 6 und 7 sind bei diesen Bedingungen vollständig aufgelöst. Aufgrund der besseren chromatographischen Trennung kann hier bei geringeren Konzentrationen quantifiziert werden. Man erhält das gleiche chromatographische Verhalten sowohl auf der Poroshell HPH C18-Säule mit 2,7- $\mu$ m-Partikeln (A) als auch auf der Poroshell HPH C18-Säule mit 4- $\mu$ m-Partikeln (B). Dies weist darauf hin, dass die chromatographische Trennung übertragbar ist.

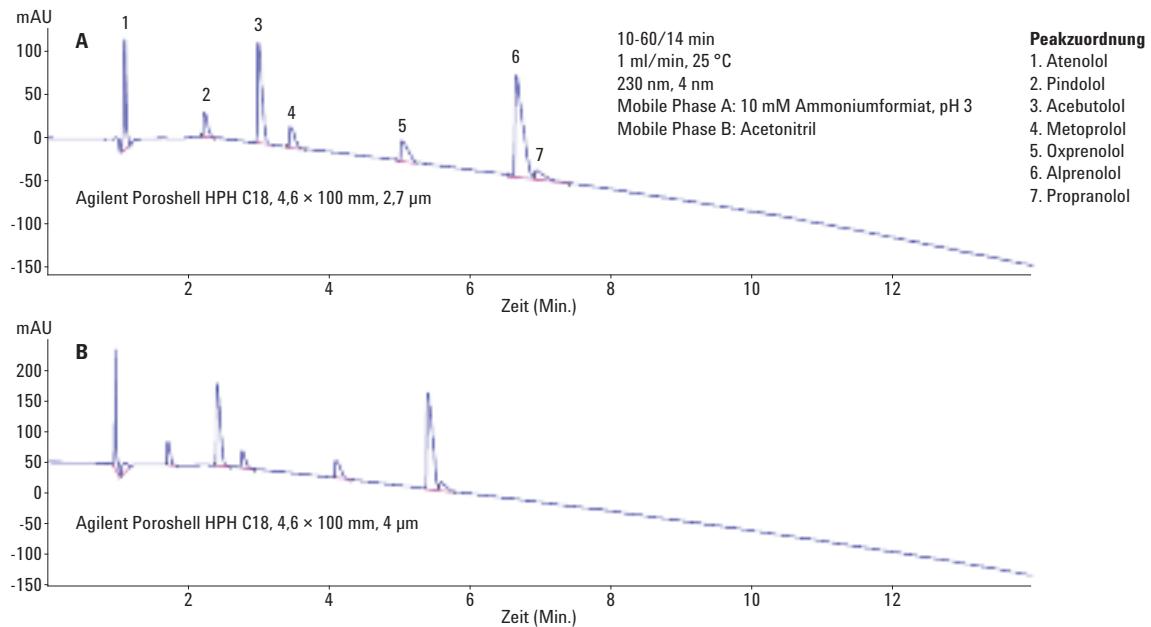


Abbildung 2: Trennung der  $\beta$ -Blocker-Mischung auf einer Agilent Poroshell HPH C18-Säule bei niedrigem pH-Wert.

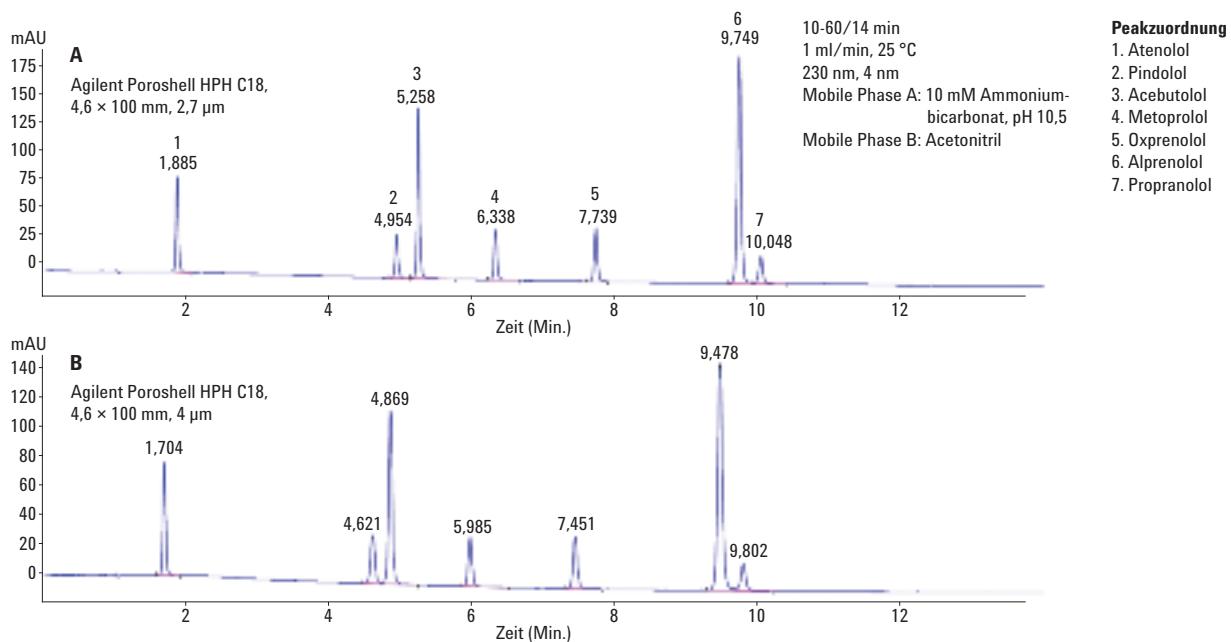


Abbildung 3: Trennung der  $\beta$ -Blocker-Mischung auf einer Agilent Poroshell HPH C18-Säule bei hohem pH-Wert.

## Schlussfolgerungen

Die Verwendung einer mobilen Phase mit hohem pH-Wert zur Analyse von basischen Substanzen, kann mit Agilent Poroshell HPH C18-Säulen mit 2,7-µm- oder 4-µm-Partikeln routinemäßig durchgeführt werden. In beiden Fällen erzielt der hohe pH-Wert schärfere und besser retenierte Peaks. In manchen Fällen wird auch eine bessere Auflösung erreicht. Die Steuerung des pH-Werts kann durch die Verwendung der neuen, bei hohen pH-Werten stabilen Säulen wie der Poroshell HPH C18-Säule zur Anpassung der Selektivität ohne Beeinträchtigung der Lebensdauer der Säule verwendet werden. Die ähnliche Selektivität ermöglicht, dass die Methoden je nach erforderlichen Druckbedingungen zwischen den Säulen mit 2,7-µm-Partikeln und denen mit 4-µm-Partikeln übertragen werden können.

Durch die Verwendung dieser Säulen können Chromatographieanwender jetzt mithilfe der Technologie für oberflächenporöse Partikel, die aufgrund ihrer hohen Effizienz und Geschwindigkeit immer größere Verbreitung findet, einen größeren pH-Bereich bei der Methodenentwicklung untersuchen [3].

## Literatur

1. <http://www.mayoclinic.org/diseases-conditions/high-blood-pressure/in-depth/beta-blockers/art-20044522>
2. <http://www.webmd.com/heart-disease/guide/beta-blocker-therapy>
3. Long, W. J.; Mack, A. E.; Wang, X.; Barber, W. E. Selectivity and Sensitivity Improvements for Ionizable Analytes Using High-pH-Stable Superficially Porous Particles. *LCGC* **2015**, 33 (4).

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

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

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  
5991-6519DEE



**Agilent Technologies**