Séparation de bêta-bloquants à pH faible et élevé à l'aide des colonnes Agilent Poroshell HPH C18

Note d'application

Médicaments

Auteur

William Long

Agilent Technologies, Inc.

Introduction

Les bêta-bloquants, ou inhibiteurs des récepteurs bêta-adrénergiques, appartiennent à une classe de médicaments utilisés pour traiter l'hypertension et atténuer les arythmies cardiaques. En tant qu'antagonistes des récepteurs bêta-adrénergiques, ils réduisent l'effet de l'épinéphrine (adrénaline) et d'autres hormones du stress en inhibant leur liaison aux récepteurs bêta sur les terminaisons nerveuses. Le premier bêta-bloquant a été synthétisé en 1958 par les laboratoires Eli Lilly, mais c'est en 1962 que les premiers bêta-bloquants à action clinique significative, le propranolol et le pronéthalol, ont été développés et utilisés pour traiter l'angine de poitrine.

Les bêta-bloquants inhibent l'action de l'adrénaline et de la noradrénaline, notamment leur liaison aux récepteurs β-adrénergiques, des éléments du système nerveux sympathique responsables de la réponse combat-fuite. Trois types de récepteurs bêta ont été identifiés, connus comme les récepteurs β_1, β_2 et β_3. Les récepteurs β_1-adrénergiques se trouvent essentiellement dans le cœur et le rein , et les récepteurs β_2- dans les poumons, le système gastro-intestinal, le foie, l'utérus, les muscles lisses vasculaires et le muscle squelettique. Les récepteurs β_3-adrénergiques sont localisés dans les cellules adipeuses.

Il existe de nombreux bêta-bloquants ; ils se différencient par le type de récepteur bêta qu'ils inhibent, et donc par leurs effets. Les bêta-bloquants non sélectifs, comme le propranolol, inhibent les récepteurs β_1 et β_2, et ont un effet sur le cœur, les vaisseaux sanguins et les voies respiratoires. Les bêta-bloquants sélectifs, comme le métoprolol, inhibent principalement les récepteurs β_1 ; ils agissent donc essentiellement sur le cœur et n'ont pas d'effet sur les voies respiratoires. Certains bêta-bloquants, comme le pindolol, ont des effets similaires à l'épinéphrine et à la norépinéphrine et peuvent entraîner une augmentation de la tension artérielle et du rythme cardiaque [1,2].

L'analyse de routine de composés basiques tels que les bêta-bloquants en utilisant une phase mobile de pH élevé est désormais possible grâce aux colonnes Agilent Poroshell HPH C18 à particules de 2,7 µm ou 4 µm. Ces colonnes permettent d'étendre la plage de pH utilisée lors du développement de méthodes avec des colonnes à particules superficiellement poreuses. L'utilisation de telles colonnes est de plus en plus répandue en raison de leur bonne efficacité et de leur rapidité.

Agilent Technologies

Données expérimentales

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

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

Les colonnes suivantes ont été utilisées pendant cette étude :

- Agilent Poroshell HPH C18, 4,6 × 100 mm, 2,7 µm (réf. 695975-702)
- Agilent Poroshell HPH C18, 4,6 × 100 mm, 4 µm (réf. 695970-702)

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

Les composés étudiés comprenaient l'uracile et une série de bêta-bloquants préparés à 1 mg/mL dans de l'eau:acétonitrile 50:50, puis mélangés à parts égales pour constituer une solution d'environ 0,143 µg/mL d'aténolol, pindolol, acébutolol, métoprolol, oxprénolol, alprénolol et propranolol. La figure 1 montre leurs structures et leurs détails. Des solutions de formiate d'ammonium et d'acide formique à 10 mM ont été préparées, puis utilisées pour préparer un tampon à pH faible à pH 3. La formiate d'ammonium a été achetée auprès de Sigma-Aldrich Corp. L'acide formique bidistillé a été acheté auprès de GFS. Du bicarbonate d'ammonium et de l'hydroxyde d'ammonium ont été utilisés pour préparer un tampon à pH 10 ; les deux ont été fournis par Sigma-Aldrich.

Les colonnes étaient chauffées à 25 °C et équilibrées à 1 mL/min pendant 10 minutes avant l'analyse.

Résultats et discussion

La figure 1 présente la diversité structurelle des différents bêta-bloquants utilisés. Cette diversité permet d'obtenir un grand éventail d'effets sur diverses parties du corps. Les bêta-bloquants sont des composés basiques dont la molécule contient un groupement amine secondaire.

La figure 2 montre les chromatogrammes obtenus lors des analyses initiales effectuées pour le développement de méthodes. Bien que la séparation soit correcte, la forme des pics éluant tardivement est plutôt médiocre. Au fur et à mesure que la concentration du tampon dans la phase mobile diminue, la ligne

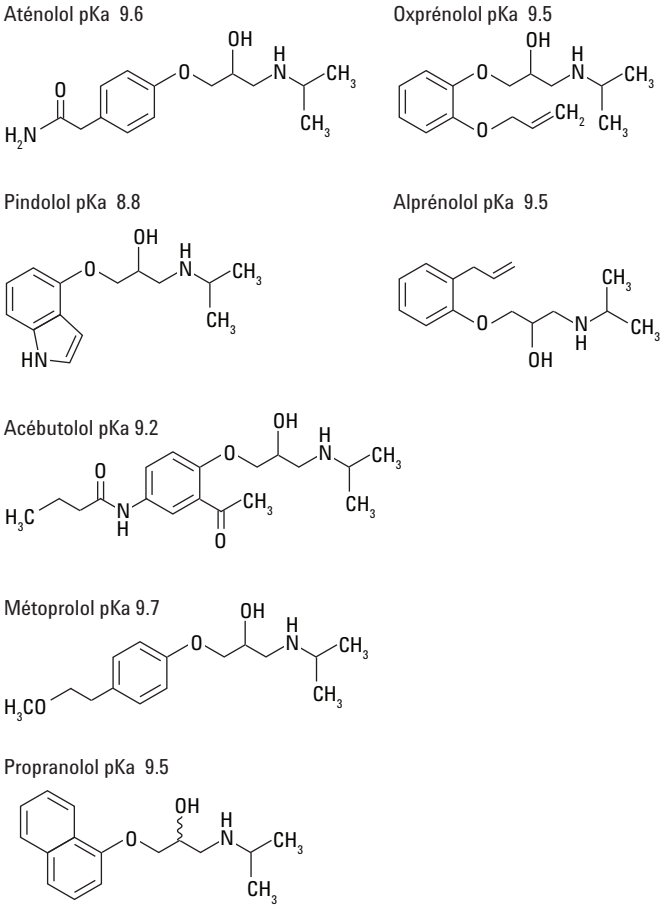


Figure 1. Structures des β-bloquants.

de base s'abaisse et les pics deviennent légèrement plus larges et moins hauts. De ce fait, la quantification est plus difficile. Ce phénomène pourrait être corrigé en ajoutant le tampon ou le modificateur de phase mobile également dans l'acétonitrile. Les profils chromatographiques observés avec les colonnes Poroshell HPH C18 de 2,7 µm (A) et de 4 µm (B) sont identiques, ce qui indique que la méthode chromatographique est transférable.

La figure 3 présente les chromatogrammes obtenus pour le mélange à pH 10,5. Dans cette phase mobile alcaline, la séparation des composés basiques entièrement protonés est supérieure à celle obtenue dans la figure 2 avec une phase mobile acide. Pour tous les composés, la forme de pic est meilleure, les traînées de pic sont moindres, les pics sont plus hauts et le temps de rétention est plus long que dans la figure 2. Dans ces conditions la résolution des paires de pics 6 et 7 est totale. Grâce à ces profils chromatographiques améliorés, les composés ont pu être quantifiés à des niveaux plus bas. Les profils chromatographiques observés avec les colonnes Poroshell HPH C18 de 2,7 µm (A) et de 4 µm (B) sont identiques, ce qui indique que la méthode chromatographique est transférable.

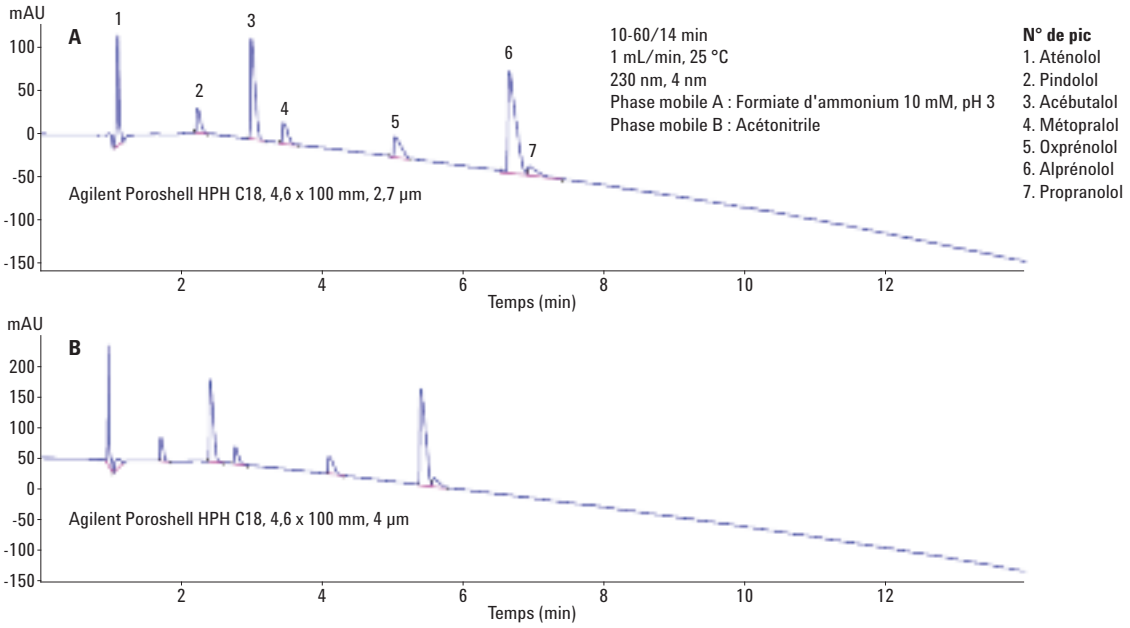


Figure 2. Séparation à pH faible d'un mélange de β-bloquants sur une colonne Agilent Poroshell HPH C18.

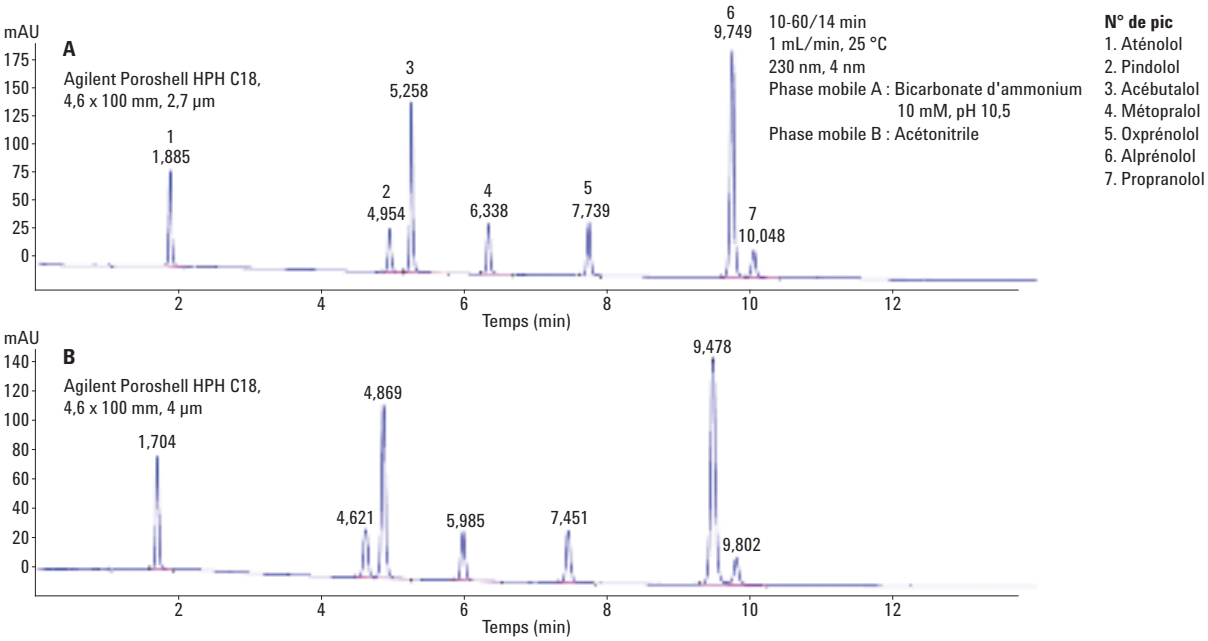


Figure 3. Séparation à pH élevé d'un mélange de β-bloquants sur une colonne Agilent Poroshell HPH C18.

Conclusions

L'utilisation d'une phase mobile à pH élevé pour l'analyse de routine de composés basiques est possible avec les colonnes Agilent Poroshell HPH C18 à granulométrie de 2,7 µm ou 4 µm. Dans les deux cas, les pics sont plus étroits et mieux retenus à pH élevé. Dans certains cas la résolution est également améliorée. Il est désormais possible de régler le pH pour ajuster la sélectivité sans altérer la durée de vie de la colonne en utilisant les nouvelles colonnes stables à pH élevé telles que les colonnes Agilent Poroshell HPH C18. En raison d'une sélectivité similaire, les méthodes peuvent être transférées entre les colonnes de 2,7 µm et 4 µm, selon les besoins en termes de pression.

Grâce à ces colonnes à technologie de particules superficiellement poreuses, les chromatographistes peuvent maintenant explorer une gamme de pH plus large dans le développement de la méthode. Cette technologie est de plus en plus adoptée en raison de sa haute efficacité et vitesse [3].

Références

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).

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.

www.agilent.com/chem

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
5991-6519FR

Agilent Technologies