Separazione di beta-bloccanti a basso e alto pH con le colonne Poroshell HPH C18 Agilent

Nota applicativa

Piccole molecole prodotti farmaceutici

Autore

William Long

Agilent Technologies

Introduzione

I beta-bloccanti, o bloccanti beta-adrenergici, sono una classe di farmaci usati per il trattamento dell'ipertensione e la gestione delle aritmie cardiache. In quanto antagonisti del recettore beta-adrenergico, riducono gli effetti dell'epinefrina (adrenalina) e di altri ormoni dello stress bloccando il loro legame ai recettori beta localizzati nelle terminazioni nervose. Il primo beta-bloccante fu sintetizzato nel 1958 nei laboratori Eli Lilly, ma solo nel 1962 furono sviluppati e utilizzati per il trattamento dell'angina pectoris i primi beta-bloccanti di interesse clinico, il propanololo e il pronetalolo.

I beta-bloccanti bloccano l'azione dell'adrenalina e della noradrenalina, in particolare quella sui recettori β-adrenergici, che fanno parte del sistema nervoso simpatico che media la reazione di lotta o fuga. Si conoscono tre tipi di recettori beta, denominati recettori β_1, β_2 e β_3. I recettori adrenergici β_1 sono localizzati principalmente nel cuore e nel rene; i recettori adrenergici β_2 si trovano principalmente nei polmoni, nell'apparato gastrointestinale, nel fegato, nell'utero, nei muscoli lisci vascolari e nei muscoli scheletrici. I recettori adrenergici β_3 si trovano nelle cellule adipose.

Esistono numerosi beta-bloccanti, che si distinguono per il tipo di recettore beta che bloccano e, di conseguenza, per i loro effetti. I beta-bloccanti non selettivi, come il propanololo, bloccano i recettori β_1 e β_2 e agiscono sul cuore, sui vasi sanguigni e sulle vie aeree. I beta-bloccanti selettivi, come il metoprololo, bloccano principalmente i recettori β_1, quindi agiscono soprattutto sul cuore e non hanno effetti sulle vie aeree. Alcuni beta-bloccanti, come il pindololo, producono gli stessi effetti dell'epinefrina e della norepinefrina e possono causare un aumento della pressione sanguigna e della frequenza cardiaca [1,2].

L'uso di fasi mobili a pH elevato per l'analisi di composti basici come i beta-bloccanti può diventare un'operazione di routine con le colonne Poroshell HPH C18 Agilent con particelle da 2,7 µm o da 4 µm. Queste colonne permettono di prendere in considerazione un intervallo di pH più ampio nello sviluppo di metodi con particelle a superficie porosa. Le colonne contenenti questo tipo di particelle sono sempre più impiegate, grazie alla loro elevata efficienza e velocità.

Agilent Technologies

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

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

I composti esaminati comprendevano l'uracile e una serie di beta-bloccanti preparati a una concentrazione di 1 mg/mL in acqua:acetonitrile (50:50), quindi miscelati in parti uguali per creare una soluzione contenente circa 0,143 µg/mL di atenololo, pindololo, acebutololo, metoprololo, oxprenololo, alprenololo e propanololo. La figura 1 mostra le strutture e i dettagli di questi composti. Il formiato di ammonio e l'acido formico sono stati preparati a una concentrazione di 10 mM e utilizzati per preparare un tampone a basso pH (pH 3). Il formiato di ammonio è stato acquistato da Sigma-Aldrich, Corp. e l'acido formico bidistillato è stato acquistato da GFS. Il bicarbonato di ammonio e l'idrossido di ammonio sono stati utilizzati per preparare un tampone a pH 10; entrambi sono stati forniti da Sigma-Aldrich.

Le colonne sono state riscaldate a 25 °C ed equilibrate per 10 minuti a 1 mL/min prima del test.

Risultati e discussione

La figura 1 mostra le diverse strutture dei beta-bloccanti utilizzati. Questa diversità permette un'ampia varietà di effetti su varie parti del corpo. I beta-bloccanti sono composti basici la cui struttura contiene un gruppo amminico secondario.

La figura 2 mostra i cromatogrammi che si possono ottenere da una iniziale scansione di sviluppo del metodo. Come si può vedere, sebbene si osservi una separazione adeguata, la forma dei picchi che vengono eluiti tardivamente non è molto soddisfacente. Man mano che la concentrazione di tampone

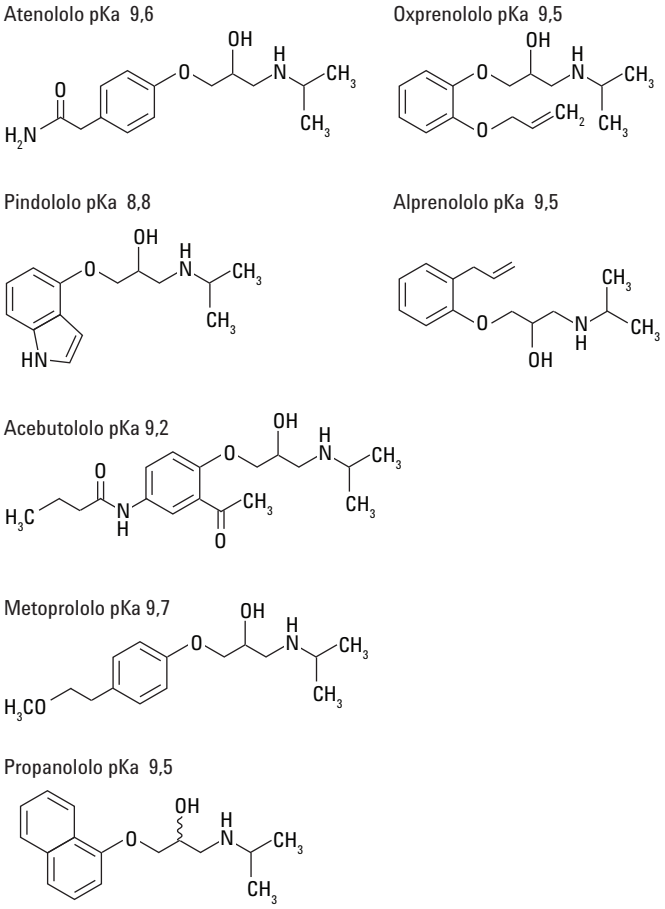


Figura 1. Strutture dei β-bloccanti.

nella fase mobile diminuisce, la linea di base si riduce e i picchi diventano leggermente più ampi e più bassi. Pertanto, la quantificazione diventa più difficile. Questo problema potrebbe essere corretto aggiungendo il tampone o il modificatore della fase mobile anche nell'acetonitrile. Si può osservare che la colonna Poroshell HPH C18 da 2,7 µm (A) e la colonna Poroshell HPH C18 da 4 µm (B) hanno un comportamento cromatografico identico e questo indica che la cromatografia è trasferibile.

La figura 3 mostra la cromatografia della miscela a pH 10,5. In questa fase mobile alcalina, la separazione dei composti basici completamente protonati è migliore di quella ottenuta utilizzando la fase mobile acida, mostrata nella figura 2. In tutti i casi, la forma dei picchi è superiore, lo scodamento è ridotto, i picchi sono più alti e il tempo di ritenzione maggiore che nella figura 2. La coppia di picchi 6 e 7 viene completamente risolta in queste condizioni. Grazie al migliore risultato cromatografico, è possibile quantificare a livelli più bassi. Si può osservare che la colonna Poroshell HPH C18 da 2,7 µm (A) e la colonna Poroshell HPH C18 da 4 µm (B) hanno un comportamento cromatografico identico, e questo indica che la cromatografia è trasferibile.

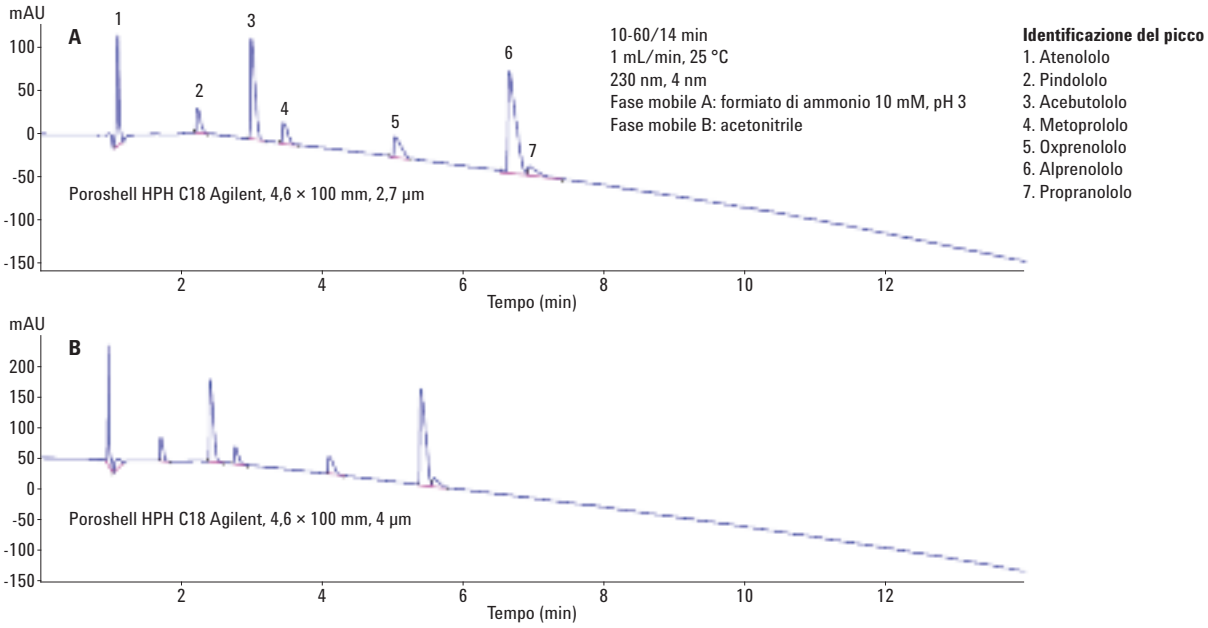


Figura 2. Separazione a basso pH di una miscela di β-bloccanti su una colonna Poroshell HPH C18 Agilent.

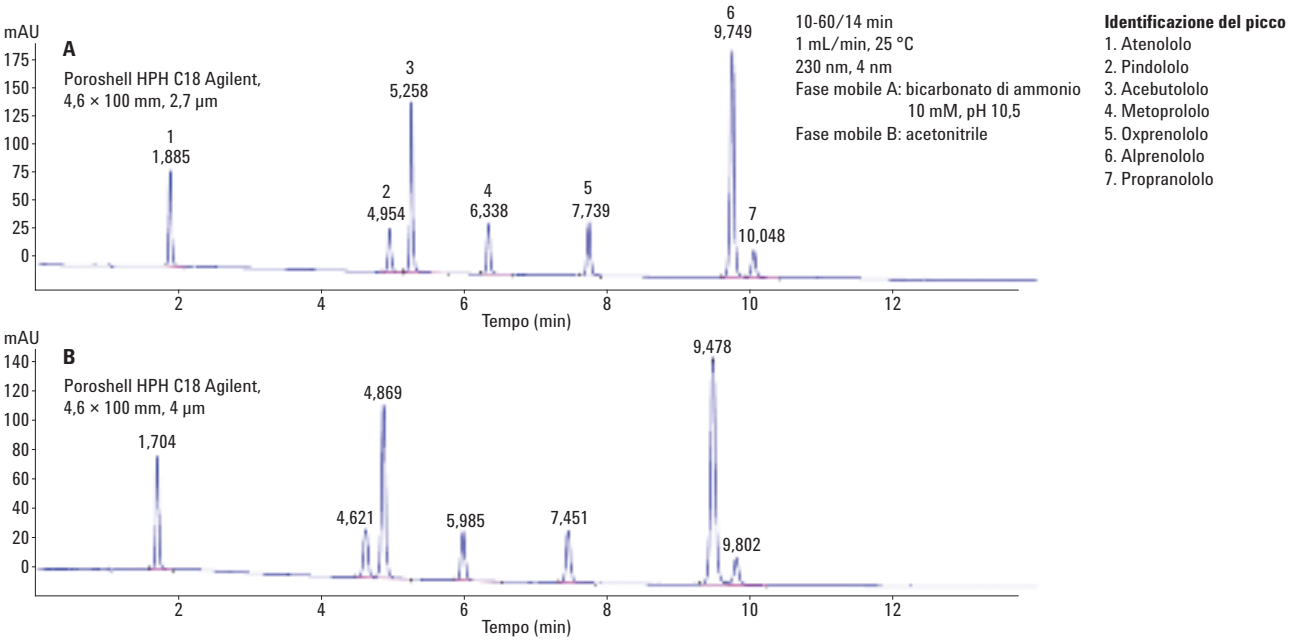


Figura 3. Separazione a pH elevato di una miscela di β-bloccanti su una colonna Poroshell HPH C18 Agilent.

Conclusioni

L'uso di fasi mobili a pH elevato per l'analisi di composti basici può diventare un'operazione di routine con le colonne Poroshell HPH C18 Agilent con particelle da 2,7 µm o 4 µm. In entrambi i casi, un pH elevato permette di ottenere picchi più definiti e con una migliore ritenzione. In alcuni casi si ottiene anche una migliore risoluzione. Il controllo del pH può essere utilizzato per regolare la selettività senza ridurre la durata delle colonne, utilizzando le nuove colonne stabili a pH elevato come la Poroshell HPH C18. La selettività paragonabile delle colonne da 2,7 µm e da 4 µm permette di trasferire i metodi da una colonna all'altra sulla base di considerazioni relative alla pressione.

Utilizzando queste colonne, gli operatori di cromatografia possono ora prendere in considerazione un intervallo più ampio di pH nello sviluppo di metodi, attraverso l'impiego della tecnologia per particelle a superficie porosa, sempre più utilizzata grazie alla sua elevata efficienza e rapidità [3].

Bibliografia

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).

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

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
5991-6519ITE

Agilent Technologies