저/고 pH에서 Agilent Poroshell HPH C18을 이용한 베타 차단제의 분리

응용 자료

저분자 의약품

저자

William Long

Agilent Technologies, Inc.

소개

베타 차단제 또는 베타 아드레날린 작용 차단제는 고혈압을 치료하고 심부정맥을 관리하기 위해 사용되는 약물의 한 종류입니다. 베타 아드레날린 작용 수용체 대항제로서 에피네프린(epinephrine)(어드레날린: adrenaline) 및 기타 스트레스 호르몬이 신경 말단의 베타 수용체에 결합하는 것을 차단하여 이들의 영향을 감소시킵니다. 최초의 베타 차단제는 1958년 Eli Lilly Laboratories에서 합성하였지만 1962년에 임상적으로 의미 있는 베타 차단제인 프로프라놀롤 및 프로네탈롤이 처음 개발되어 협심증 치료에 사용되었습니다.

베타 차단제는 특히 투쟁-도피반응을 매개하는 교감신경계의 일부인 β-아드레날린 작용 수용체에서 아드레날린 및 노르아드레날린의 반응을 차단합니다. 세 가지 베타 수용체가 알려져 있으며, 그 명칭은 각각 β_1, β_2 및 β_3 수용체입니다. β_1-아드레날린 작용 수용체는 주로 심장과 신장에 있으며, β_2-아드레날린 작용 수용체는 주로 폐, 위장관, 간, 자궁, 혈관평활근 및 골격근에 있습니다. β_3-아드레날린 작용 수용체는 지방 세포에서 발견됩니다.

베타 차단제는 많으며, 저마다 차단하는 베타 수용체의 유형이 달라 효과에도 차이가 있습니다. 프로프라놀롤과 같은 비선택적 베타 차단제는 β_1 및 β_2 수용체를 차단하며, 심장, 혈관 및 기도에 영향을 미칩니다. 메토프롤롤과 같은 선택적 베타 차단제는 주로 β_1 수용체를 차단하므로 주로 심장에 영향을 주고 기도에는 영향을 주지 않습니다. 핀돌롤과 같은 일부 베타 차단제는 에피네프린과 노르에피네프린과의 효과를 모방하여 혈압과 심장박동의 증가를 일으킬 수 있습니다[1,2].

베타 차단제와 같은 염기 화합물의 분석을 위해 고 pH 이동상을 사용할 경우 보통 2.7µm 또는 4µm 미립자와 함께 Agilent Poroshell HPH C18 컬럼을 사용해도 됩니다. 이 컬럼을 통해 표면 다공성 미립자로 pH를 폭넓게 조사해 분석법 개발을 실시할 수 있습니다. 이 같은 미립자가 포함된 컬럼은 높은 효율과 속도 덕분에 보급이 확대되고 있습니다.

Agilent Technologies

실험

Agilent 1260 Infinity LC가 사용되었으며, 다음과 같이 구성됩니다:

- Agilent 1260 Infinity Binary 펌프 SL, 최대 600bar 제공 가능(G1312B)
- Agilent 1260 Infinity 항온 컬럼 장치(G1316C)
- Agilent 1260 Infinity 고성능 자동 시료 주입기 (Autosampler) SL Plus(G1376C)
- Agilent 1260 Infinity 다이오드 어레이 검출기(G4212A), 10mm 경로 길이, 1µL 흐름 셀 장착(p/n G4212-60008)

본 연구에는 다음 컬럼이 사용되었습니다:

- Agilent Poroshell HPH C18, 4.6 × 100mm, 2.7µm (p/n 695975-702)
- Agilent Poroshell HPH C18, 4.6 × 100mm, 4µm (p/n 695970-702)

Agilent ChemStation, 버전 C.1.05를 사용해 기기를 제어하고 데이터를 처리했습니다.

검사 대상 화합물은 우라실, 각종 베타 차단제 등이며 물: 아세토니트릴(50:50) 1mg/mL를 만든 다음, 동일한 양으로 혼합하여 약 0.143µg/mL의 아테놀롤, 핀돌롤, 아세부탈롤, 테노프롤롤, 옥스프레놀롤, 알프레놀롤 및 프로프라놀롤 용액을 만들었습니다. 그림 1은 구조와 상세 정보를 보여줍니다. 포름산염암모늄과 포름산암노늄을 10mM 준비하여, pH 3의 저 pH 완충액 제조에 사용하였습니다. 포름산염암모늄은 Sigma-Aldrich사에서 구입했으며, 이중 증류 포름산은 GFS로부터 구입했습니다. 중탄산암모늄과 수산화암모늄으로 pH 10 완충액을 만들었습니다. 둘 다 Sigma-Aldrich 제품입니다.

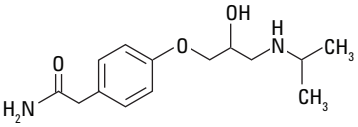
분석전, 컬럼오븐 온도는 25°C로 가열하고 분당 1ml의 속도로 유량을 맞추어 10분간 안정화 하였습니다.

결과 및 토의

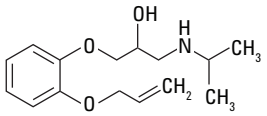
그림 1은 사용된 베타 차단제의 다양한 구조를 보여줍니다. 이 다양성 덕분에 신체의 여러 부분에 다양한 영향을 미칠 수 있습니다. 베타 차단제는 구조에 2차 아미노기를 포함하고 있는 염기 화합물입니다.

그림 2는 최초 분석법 개발 스캐닝으로 얻을 수 있는 크로마토그램을 보여줍니다. 그림에서 보듯, 충분한 분리가 확인되었지만 말기 용리 피크의 피크 모양이 그다지 양호하지는 않습니다. 이동상에서 완충액 농도를 감소함에 따라 기준선이 낮아지고 피크는 약간 더 넓고 짧아집니다.

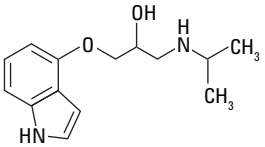
아테놀롤(Atenolol) pKa 9.6



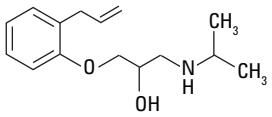
옥스프레놀롤(Oxprenolol) pKa 9.5



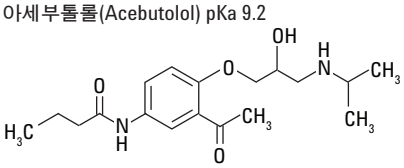
핀돌롤(Pindolol) pKa 8.8



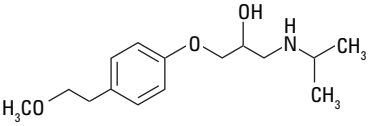
알프레놀롤(Alprenolol) pKa 9.5



아세부톨롤(Acebutolol) pKa 9.2



메토프롤롤(Metoprolol) pKa 9.7



프로프라놀롤(Propranolol) pKa 9.5

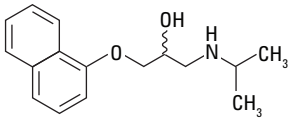


그림 1. β-차단제 구조

그래서 정량이 더 어렵게 됩니다. 이 경우 아세토니트릴에 완충액이나 이동상 조절제를 넣어 조절할 수 있습니다. 2.7µm Poroshell HPH C18(A)과 4µm Poroshell HPH C18(B)에서 모두 동일한 크로마토그래픽 반응을 확인하였으며, 이는 크로마토그래피를 이동할 수 있음을 의미합니다.

그림 3은 pH 10.5에서 혼합물의 크로마토그래피를 보여줍니다. 이 알칼리성 이동상에서, 완전히 양성자화된 염기 화합물의 분리는 그림 2에서 산성 이동상을 이용해 생성된 것보다 더 양호하게 나타납니다. 어느 경우든 피크 모양이 우수하고 테일링이 줄어들며, 피크가 더 크고 머무름 시간이 그림 2에서보다 더 크게 나타납니다. 이러한 조건에서 피크 쌍 6과 7이 완전히 분석됩니다. 개선된 크로마토그래피 때문에 낮은 농도에서 정량화할 수 있습니다. 2.7µm Poroshell HPH C18(A)과 4µm Poroshell HPH C18(B)에서 모두 동일한 크로마토그래픽 반응을 확인하였으며, 이는 크로마토그래피를 이동할 수 있음을 의미합니다.

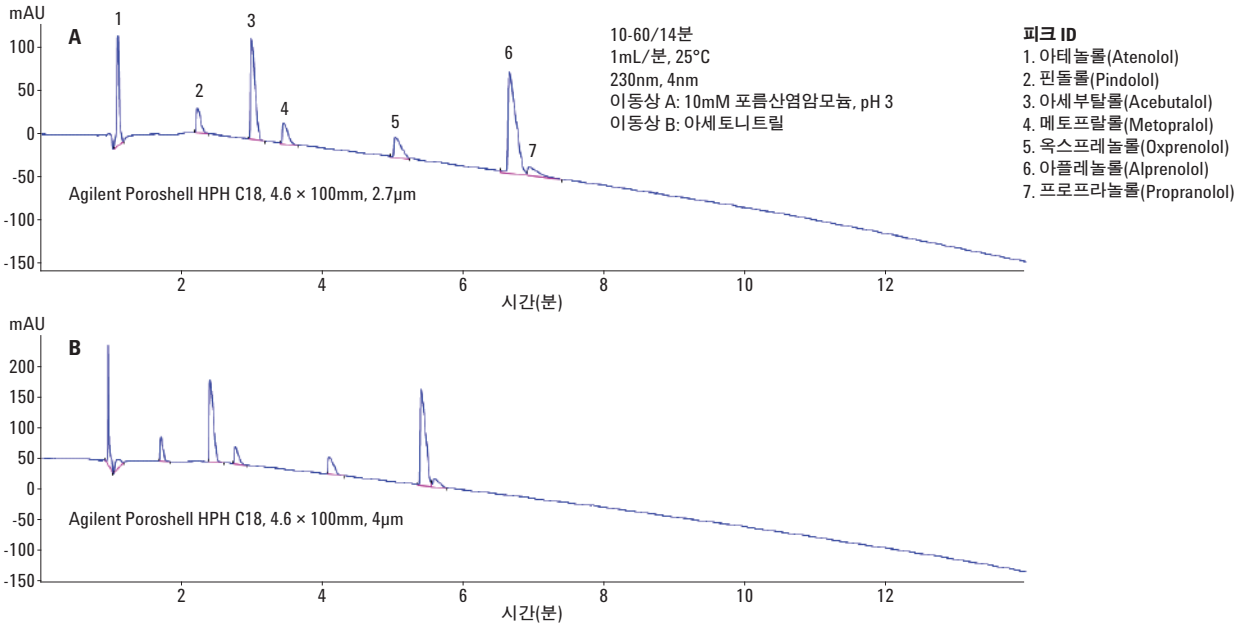


그림 2. Agilent Poroshell HPH C18 컬럼에서 β-차단제 혼합물의 저 pH 분리

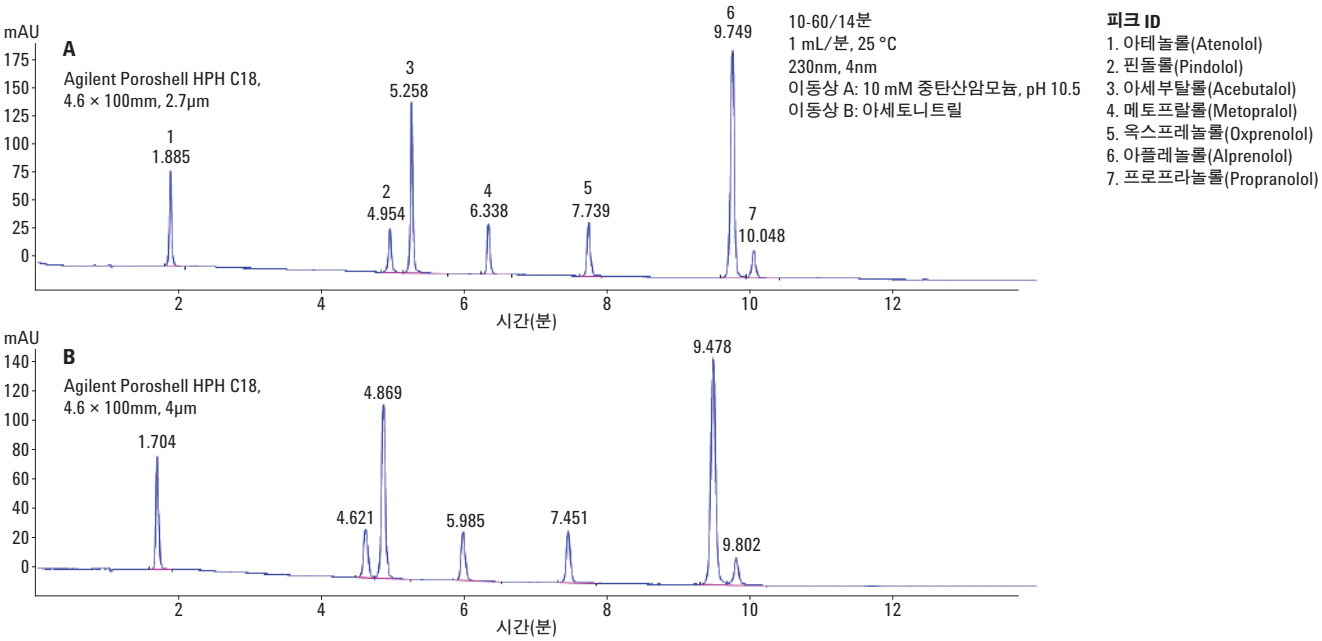


그림 3. Agilent Poroshell HPH C18 컬럼에서 β-차단제 혼합물의 고 pH 분리

결론

염기 화합물의 분석을 위해 고 pH 이동상을 사용할 경우, 보통 2.7µm 또는 4µm 미립자 크기의 Agilent Poroshell HPH C18 컬럼을 사용합니다. 두 경우 모두 고 pH는 더 분명한 피크를 획득합니다. 일부의 경우 분해능도 더 높아집니다. pH를 조정하면 Agilent Poroshell HPH C18과 같은 새로운 고 pH 안정적 컬럼을 사용하여 컬럼 수명을 잃지 않고도 선택성을 조절할 수 있습니다. 유사한 선택성을 이용하면 필요한 압력에 따라 2.7µm와 4µm 컬럼 사이에 분석법을 이전할 수 있습니다.

크로마토그래피 전문가는 이제 표면 다공성 미립자 기술을 이용하여 분석법 개발에서 다양한 범위의 pH를 연구할 수 있습니다. 이 기술은 높은 효율과 속도 때문에 점점 더 널리 채택되고 있습니다.

참조 문헌

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(고-pH 안정성 표면 다공성 미립자를 이용한 이온화 가능 분석물질의 선택성 및 민감도 향상). *LCGC* **2015**, *33* (4).

추가 정보

이러한 데이터는 일반적인 결과를 나타냅니다. 애질런트 제품 및 서비스에 대한 더 자세한 정보는 웹 사이트 www.agilent.com/chem에서 확인하실 수 있습니다

www.agilent.com/chem

애질런트는 이 문서에 포함된 오류나 이 문서의 제공, 이행 또는 사용과 관련하여 발생한 부수적인 또는 결과적인 손해에 대해 책임을 지지 않습니다.

이 발행물의 정보, 설명 및 사양은 예고 없이 변경될 수 있습니다.

© Agilent Technologies, Inc., 2015

한국에서 발행
2015년 12월 7일
5991-6519KO

서울시 용산구 한남대로 98, 일신빌딩 4층 우)04418
한국애질런트테크놀로지스(주) 생명과학/화학분석 사업부
고객지원센터 080-004-5090 www.agilent.co.kr

Agilent Technologies