Separação de betabloqueadores em pH alto e baixo usando a Agilent Poroshell HPH C18

Nota de aplicação

Fármacos de moléculas pequenas

Autor

William Long

Agilent Technologies, Inc.

Introdução

Betabloqueadores, ou agentes bloqueadores beta-adrenérgicos, são uma classe de drogas usada para tratar hipertensão e controlar arritmias cardíacas. Como antagonistas do receptor beta-adrenérgico, eles diminuem os efeitos da epinefrina (adrenalina) e outros hormônios de estresse ao bloquear a sua ligação com receptores beta em terminações nervosas. O primeiro betabloqueador foi sintetizado em 1958 pelo Laboratório Eli Lilly, mas em 1962, os primeiros betabloqueadores clinicamente significativos, o propanolol e o pronetalol, foram desenvolvidos e usados no tratamento de angina de peito.

Os betabloqueadores bloqueiam a ação da adrenalina e da noradrenalina, principalmente em receptores adrenérgicos, parte do sistema nervoso simpático que media as respostas do tipo enfrentar ou fugir. Três tipos de betabloqueadores são conhecidos, denominados receptores b_1, b_2 e b_3. Os receptores adrenérgicos b_1 estão localizados principalmente no coração e nos rins; os receptores adrenérgicos b_2 estão principalmente nos pulmões, no trato gastrointestinal, no fígado, no útero, na musculatura lisa vascular e nos músculos esqueléticos; e os receptores adrenérgicos b_3 são encontrados em células adiposas.

Há um grande número de betabloqueadores e eles diferem no tipo de receptores beta que bloqueiam e, portanto, em seus efeitos. Beta bloqueadores não seletivos, como o propranolol, bloqueiam receptores b_1 e b_2 e afetam o coração, os vasos sanguíneos e as vias aéreas. Betabloqueadores seletivos, como o metoprolol, bloqueiam principalmente receptores b_1 e, portanto, afetam principalmente o coração e não afetam as vias aéreas. Alguns betabloqueadores, como o pindolol, imitam os efeitos da epinefrina e da norepinefrina e podem causar um aumento na pressão sanguínea e na frequência cardíaca [1,2].

A utilização de fase móvel com pH alto para a análise de compostos básicos, como os betabloqueadores, pode se tornar rotina usando as colunas Agilent Poroshell HPH C18 com partículas de 2,7 µm ou 4 µm. Essas colunas permitem a exploração de uma faixa de pH mais ampla para o desenvolvimento de métodos com partículas superficialmente porosas. Colunas com esse tipo de partícula estão sendo cada vez mais usadas devido à sua alta eficiência e velocidade.

Agilent Technologies

Experimento

Um LC Agilent 1260 Infinity foi usado, composto de:

- Bomba binária SL Agilent 1260 Infinity, capaz de fornecer 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, 4,6 × 100 mm, 2,7 µm (p/n 695975-702)
- Agilent Poroshell HPH C18, 4,6 × 100 mm, 4 µm (p/n 695970-702)

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

Os compostos examinados incluem a uracila e diversos betabloqueadores compostos por 50:50 de água:acetonitrila a 1 mg/mL, que foram misturados em partes iguais para fazer uma solução de aproximadamente 0,143 µg/mL de atenolol, pindolol, acebutalol, metoprolol, oxprenolol, alprenolol e propanalol. A Figura 1 mostra as estruturas e os detalhes. O formato de amônia e o ácido fórmico foram preparados a 10 mM e usados para preparar um tampão de pH baixo com pH 3. O formato de amônia foi comprado da Sigma-Aldrich, Corp. O ácido fórmico duplamente destilado foi comprado da GFS. O bicarbonato de amônia e o hidróxido de amônia foram usados para preparar um tampão com pH 10 e foram fornecidos pela Sigma-Aldrich.

As colunas foram aquecidas a 25 °C e equilibradas a 1 mL/min por 10 minutos antes dos testes.

Resultados e discussão

A Figura 1 ilustra as diversas estruturas dos betabloqueadores usados. Essa diversidade permite uma grande variedade de efeitos em várias partes do corpo. Os betabloqueadores são compostos básicos que contêm um grupo amina secundário na estrutura.

A Figura 2 mostra cromatogramas que podem resultar da varredura inicial do desenvolvimento de métodos. Como mostrado, embora uma separação adequada tenha sido obtida, o formato dos picos de eluição posterior não são

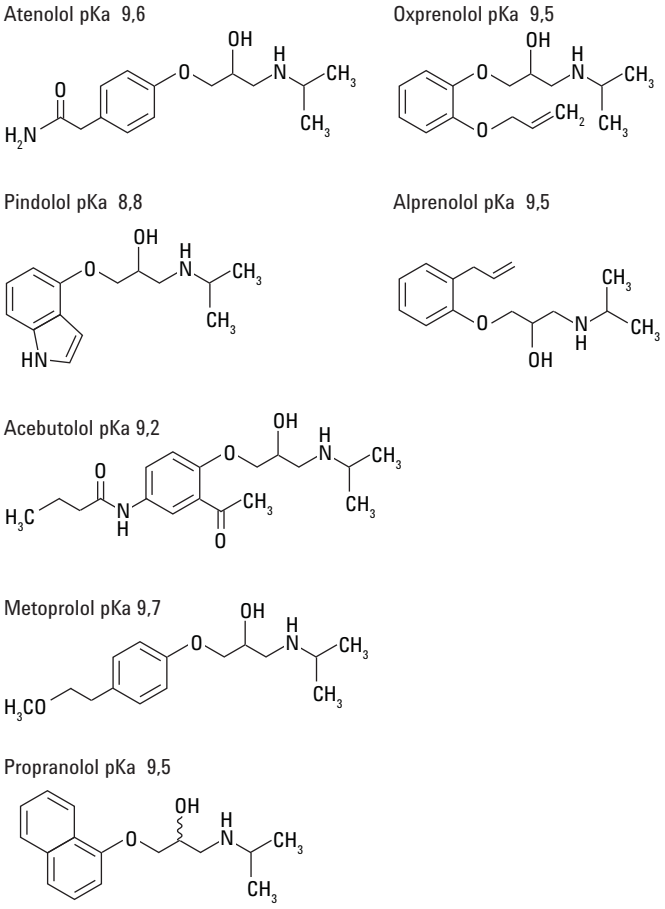


Figura 1. Estruturas de betabloqueadores.

muito bons. Em virtude de a concentração do tampão na fase móvel ser reduzida, a linha de base diminui, e o pico fica ligeiramente menor e mais largo. No entanto, a quantificação torna-se mais difícil. Isso poderia ser corrigido colocando o modificador de tampão ou de fase móvel também na acetonitrila. Observamos um comportamento cromatográfico idêntico na Poroshell HPH C18 (A) de 2,7 e na Poroshell HPH C18 (B) de 4 µm, indicando que a cromatografia é transferível.

A Figura 3 mostra a cromatografia de uma mistura em pH 10,5. Nesta fase móvel alcalina, a separação dos compostos básicos totalmente protonados é melhor do que a produzida usando a fase móvel ácida na Figura 2. Em todos os casos, o formato do pico é superior, a cauda é reduzida, os picos são mais altos e o tempo de retenção é maior do que na Figura 2. Os pares de pico 6 e 7 são totalmente identificados nessas condições. Devido à cromatografia de melhor qualidade, somos capazes de quantificar em níveis mais baixos. Observamos um comportamento cromatográfico idêntico na Poroshell HPH C18 (A) de 2,7 e na Poroshell HPH C18 (B) de 4 µm, indicando que a cromatografia é transferível.

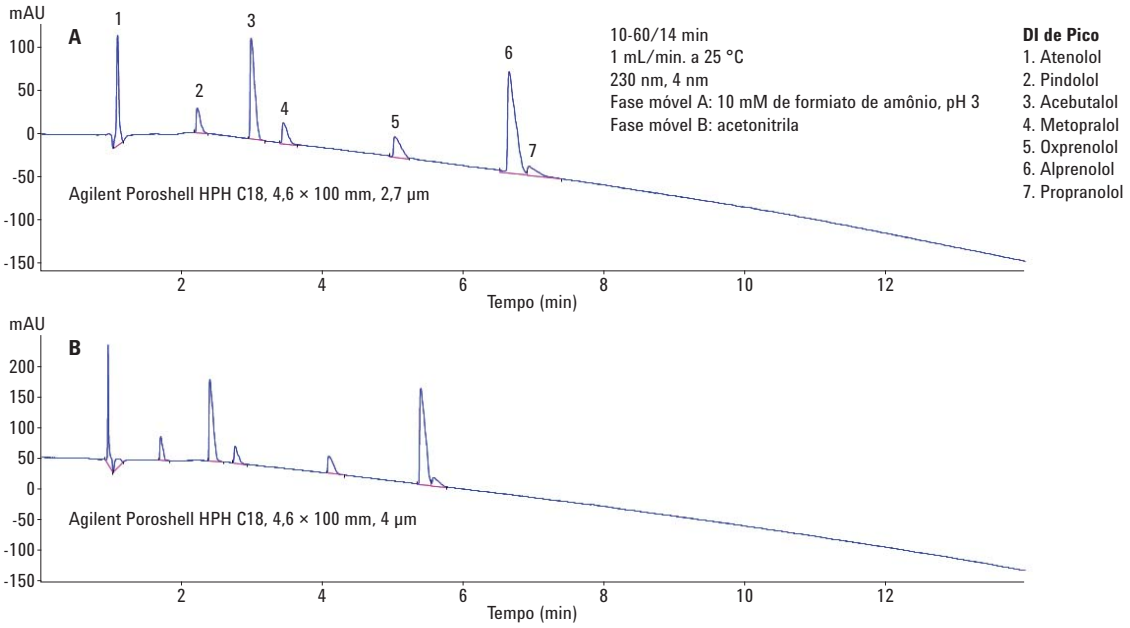


Figura 2. Separação em pH baixo de mistura de betabloqueador em uma coluna Poroshell HPH C18.

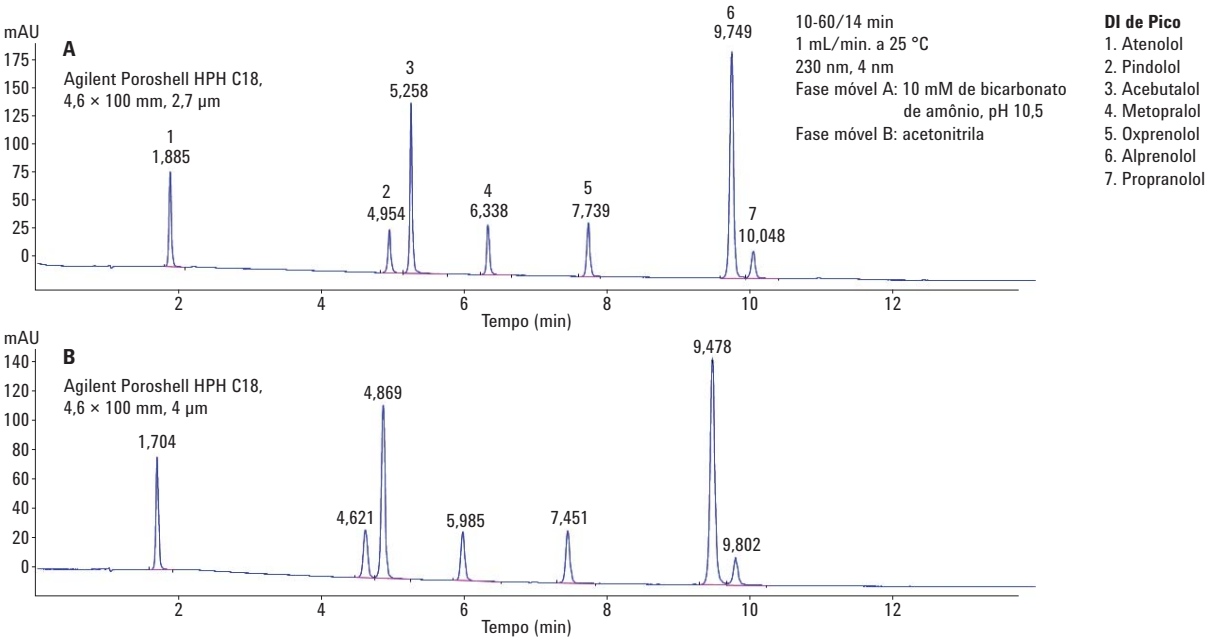


Figura 3. Separação em pH alto de mistura de betabloqueador em uma coluna Poroshell HPH C18.

Conclusões

A utilização de fase móvel com pH alto para a análise de compostos básicos pode ser realizada rotineiramente usando as colunas Agilent Poroshell HPH C18 com partículas de 2,7 µm ou 4 µm. Em ambos os casos, pH alto produz picos retidos mais agudos e melhores. Em alguns casos, uma melhor resolução também é obtida. O controle de pH pode ser usado para ajustar a seletividade, sem comprometer a vida útil da coluna, usando colunas novas e estáveis com pH alto, como a Poroshell HPH C18. Seletividade semelhante permite que os métodos sejam transferidos entre as colunas de 2,7 µm e 4 µm, conforme determinado pelas considerações de pressão.

Com essas colunas, os cromatógrafos podem explorar uma gama maior de pH no desenvolvimento de métodos usando a tecnologia de partículas superficialmente porosas, que está sendo muito utilizada devido à alta eficiência e velocidade [3].

Referências

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).

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

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.
5991-6519PTBR

Agilent Technologies