Разделение бета-блокаторов при низких и высоких значениях pH с использованием колонок Agilent Poroshell HPH C18

Методические рекомендации

Низкомолекулярные лекарственные вещества

Автор

Уильям Лонг (William Long)

Agilent Technologies, Inc.

Введение

Бета-блокаторы, или бета-адренергические блокирующие агенты, представляют собой класс лекарственных препаратов, применяемых для лечения артериальной гипертензии и регулировки нарушений сердечного ритма. Являясь антагонистами бета-адренорецепторов, они ослабляют влияние эпинефрина (адреналина) и других гормонов стресса, блокируя их связывание с бета-рецепторами нервных окончаний. Первый бета-блокатор был синтезирован в 1958 году в научно-исследовательских лабораториях Eli Lilly, но первые клинически значимые бета-блокаторы, пропранолол и пронеталол, были разработаны и использованы для лечения стенокардии в 1962 году.

Бета-блокаторы блокируют действие адреналина и норадреналина, в частности на β-адренергические рецепторы, которое в рамках симпатической нервной системы опосредует реакцию организма на стресс (механизм «бей или беги»). Известны три типа бета-рецепторов, обозначаемые как β_1-, β_2- и β_3-рецепторы. β_1-адренергические рецепторы располагаются, в основном, в сердце и почках; β_2-адренергические рецепторы находятся преимущественно в легких, желудочно-кишечном тракте, печени, матке, гладкой мускулатуре сосудов и скелетных мышцах. β_3-адренергические рецепторы содержатся в жировых клетках.

Существует большое количество бета-блокаторов, которые различаются по типу блокируемых ими бета-рецепторов и, следовательно, их воздействию. Неселективные бета-блокаторы, например пропранолол, блокируют рецепторы β_1 и β_2 и воздействуют на сердце, кровеносные сосуды и дыхательные пути. Селективные бета-блокаторы, такие как метопролол, блокируют преимущественно β_1-рецепторы, поэтому воздействуют главным образом на сердце, не затрагивая дыхательных путей. Некоторые бета-блокаторы, например пиндолол, имитируют действие эпинефрина и норэпинефрина и могут вызывать повышение артериального давления и увеличение частоты сердечных сокращений [1,2].

Использование подвижной фазы с высоким pH для анализа основных соединений, к которым относятся бета-блокаторы, может стать обычной процедурой при применении колонок Agilent Poroshell HPH C18 с частицами размером 2,7 или 4 мкм. Эти колонки позволяют проводить исследования в широком диапазоне pH для разработки методик с использованием поверхностно-пористых частиц. Спрос на колонки с такими частицами растет вследствие их высокой эффективности и скорости.

Agilent Technologies

Экспериментальная часть

Использовалась система ВЭЖХ Agilent 1260 Infinity, состоящая из следующих компонентов:

- бинарный насос Agilent 1260 Infinity SL, способный создавать давление до 600 бар (G1312B);
- термостат колоночного отделения Agilent 1260 Infinity (G1316C);
- высокоэффективный автосамплер Agilent 1260 Infinity SL Plus (G1376C);
- детектор на основе диодной матрицы Agilent 1260 Infinity (G4212A), оснащенный проточной кюветой объемом 1 мкл с длиной оптического пути 10 мм (кат. № G4212-60008).

В данном исследовании применялись следующие колонки:

- Agilent Poroshell HPH C18, 4,6 × 100 мм, 2,7 мкм (кат. № 695975-702);
- Agilent Poroshell HPH C18, 4,6 × 100 мм, 4 мкм (кат. № 695970-702).

Для управления прибором и обработки данных использовалось программное обеспечение Agilent ChemStation версии C.1.05.

В перечень исследуемых соединений вошли урацил и ряд бета-блокаторов, растворенных в смеси вода:ацетонитрил в соотношении 50:50 с концентрацией 1 мг/мл с последующим смешиванием этих растворов в равных долях для получения раствора, содержащего приблизительно по 0,143 мкг/мл атенолола, пиндолола, ацебуталола, метопролола, окспренолола, алпренолола и пропранолола. На рис. 1 показано строение и величины pKa исследованных соединений. Для приготовления буферного раствора с низким значением pH (pH = 3) использовались формиат аммония и муравьиная кислота с концентрацией 10 мМ. Формиат аммония был приобретен у компании Sigma-Aldrich Corp., а муравьиная кислота двойной перегонки — у компании GFS. Для приготовления буфера с pH 10 использовались гидрокарбонат и гидроксид аммония, приобретенные у компании Sigma-Aldrich.

Перед тестированием колонки подогревались до 25 °C и уравновешивались при скорости потока 1 мл/мин в течение 10 минут.

Результаты и обсуждение

На рис. 1 показаны разнообразные структуры использованных бета-блокаторов. Такое разнообразие обеспечивает широкий спектр воздействия на различные органы. Бета-блокаторы являются основными соединениями, содержащими в своей структуре вторичную аминогруппу.

На рис. 2 показаны хроматограммы, которые могут быть получены в результате первоначальных экспериментов при разработке методики. Как видно из рисунка, несмотря на то что удалось добиться достаточного разделения, пики, элюированные позднее, имеют не очень хорошую форму. При уменьшении концентрации буфера

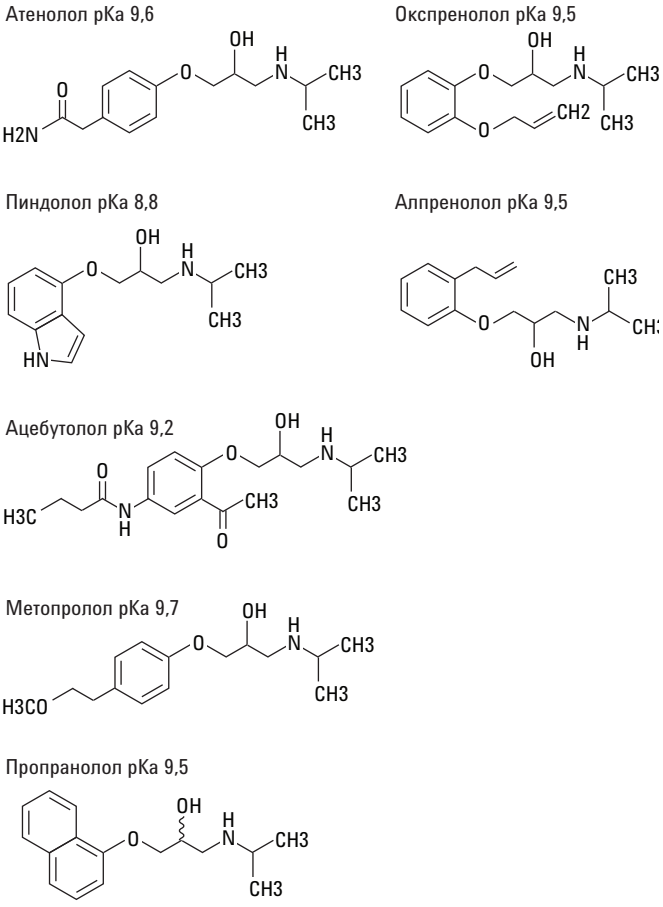


Рис. 1. Структуры β-блокаторов

в подвижной фазе базовая линия снижается, а пики получаются несколько шире и ниже. Таким образом, проведение количественного анализа затрудняется. Это можно исправить, добавив буферный раствор или модификатор подвижной фазы также и в ацетонитрил. Идентичное хроматографическое поведение на колонках Poroshell HPH C18 с размером частиц 2,7 мкм (A) и Poroshell HPH C18 с размером частиц 4 мкм (B) свидетельствует о возможности переноса хроматографической методики.

На рис. 3 показана хроматограмма смеси при pH 10,5. В этой щелочной подвижной фазе получено лучшее разделение полностью протонированных основных соединений, чем при использовании кислой подвижной фазы (рис. 2). Во всех случаях наблюдаются лучшие формы пиков, размытие их хвостов снижено, пики выше, а время удерживания больше, чем на хроматограммах на рис. 2. Пары пиков 6 и 7 полностью разрешены в этих условиях. Повышение качества хроматограммы позволяет проводить количественный анализ при более низких уровнях концентрации. Идентичное хроматографическое поведение на колонках Poroshell HPH C18 с размером частиц 2,7 мкм (A) и Poroshell HPH C18 с размером частиц 4 мкм (B) свидетельствует о возможности переноса хроматографической методики.

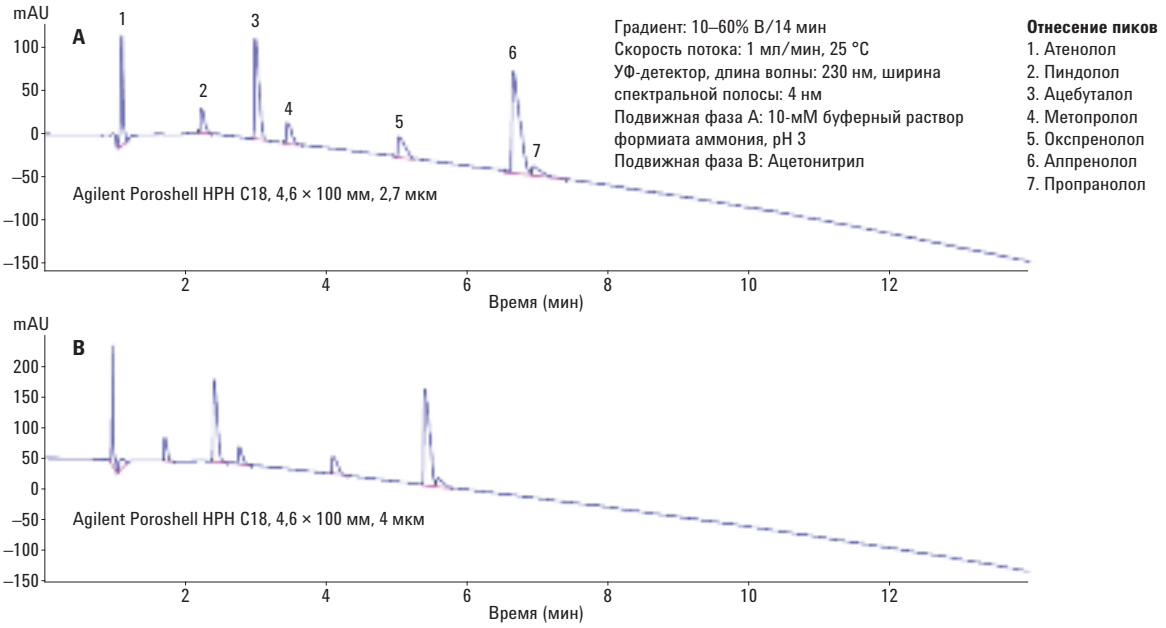


Рис. 2. Разделение смеси β-блокаторов на колонке Agilent Poroshell HPH C18 при низких значениях pH

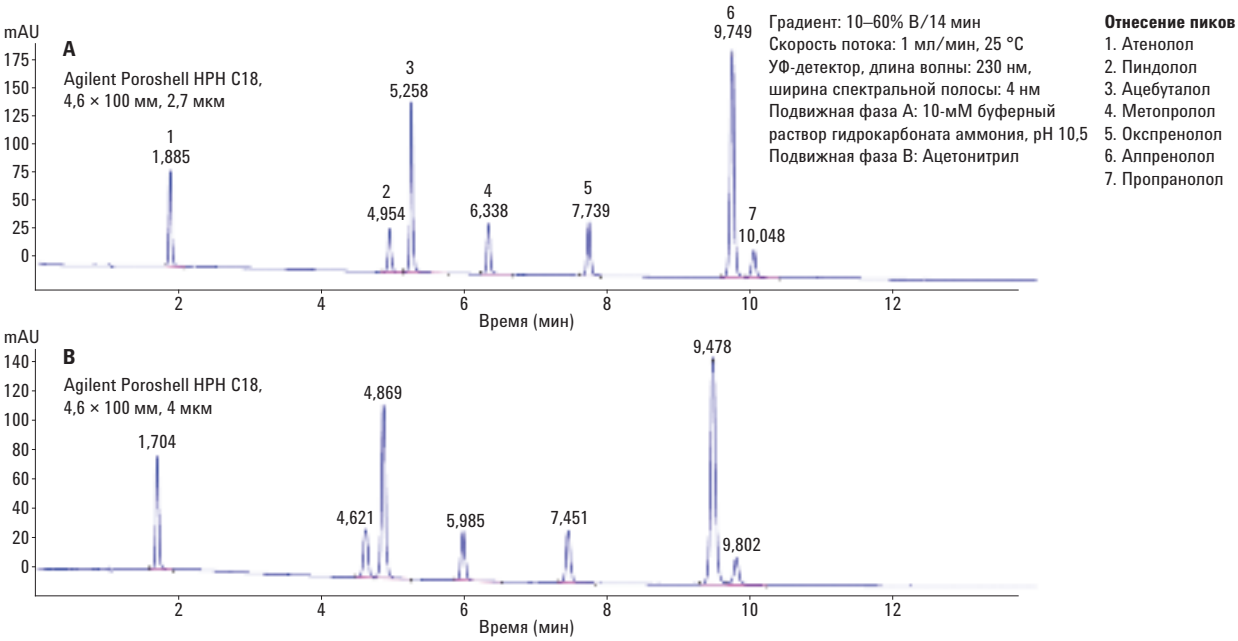


Рис. 3. Разделение смеси β-блокаторов на колонке Agilent Poroshell HPH C18 при высоких значениях pH

Выводы

Использование подвижной фазы с высоким pH для анализа основных соединений может стать обычной процедурой при применении колонок Agilent Poroshell HPH C18 с частицами размером 2,7 или 4 мкм. Для обеих колонок высокий уровень pH позволяет получить более узкие и лучше удерживаемые пики. В некоторых случаях удается также добиться более высокого разрешения. Благодаря использованию новых колонок Poroshell HPH C18, устойчивых к высоким значениям pH, можно использовать контроль pH для регулировки селективности без ущерба для срока службы колонки. Эквивалентная селективность позволяет переносить методики между колонками с размером частиц 2,7 и 4 мкм в зависимости от соображений выбора рабочего давления.

Колонки с поверхностно-пористыми частицами находят частое применение благодаря высокой эффективности и скорости. Исследователи при разработке хроматографических методик с помощью таких колонок теперь могут использовать растворы с более широким диапазоном значений pH [3].

Литература

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. Лун В. Дж. (Long, W. J.); Мак А. Е. (Mack, A. E.); Вон С. (Wang, X); Барбер В. Е. (Barber, W. E.) Selectivity and Sensitivity Improvements for Ionizable Analytes Using High-pH-Stable Superficially Porous Particles (Улучшенные селективность и чувствительность для ионизируемых аналитов с использованием поверхностно-пористых частиц, устойчивых к высоким значениям pH). *LCGC* **2015**, *33* (4).

Дополнительная информация

Представленные данные отражают типичные результаты. Для получения дополнительной информации о наших продуктах и услугах посетите наш веб-сайт по адресу: www.agilent.com/chem.

www.agilent.com/chem

Компания Agilent не несет ответственности за возможные ошибки в настоящем документе, а также за убытки, связанные или являющиеся следствием получения настоящего документа, ознакомления с ним и его использования.

Информация, описания и спецификации в настоящем документе могут быть изменены без предупреждения.

© Agilent Technologies, Inc., 2015

Напечатано в США
7 декабря 2015 г.
5991-6519RU

Agilent Technologies