



Separación de betabloqueantes a pH bajo y alto con una columna Agilent Poroshell HPH C18

Nota de aplicación

Fármacos - pequeña molécula

Autor

William Long
Agilent Technologies, Inc.

Introducción

Los betabloqueantes, o agentes bloqueantes betaadrenérgicos, son una clase de fármacos utilizados para tratar la hipertensión y las arritmias cardíacas. Como antagonistas de los receptores betaadrenérgicos, disminuyen los efectos de la epinefrina (adrenalina) y otras hormonas del estrés mediante el bloqueo de su unión con los receptores en las terminaciones nerviosas. El primer betabloqueante fue sintetizado por Eli Lilly Laboratories en 1958. En 1962 se desarrollaron los primeros betabloqueantes clínicamente significativos (el propranolol y el pronetanolol), que se utilizaron para el tratamiento de la angina de pecho.

Los betabloqueantes bloquean la acción de la adrenalina y la noradrenalina, en especial en los receptores betaadrenérgicos, una parte del sistema nervioso simpático que interviene en la respuesta simpática. Se conocen tres tipos de receptores, denominados receptores β_1 , β_2 y β_3 . Los receptores adrenérgicos β_1 están ubicados fundamentalmente en el corazón y en los riñones; los receptores adrenérgicos β_2 están presentes principalmente en los pulmones, el tubo gastrointestinal, el hígado, el útero, el músculo liso vascular y el músculo esquelético. Los receptores adrenérgicos β_3 están en los adipocitos.

Existen numerosos betabloqueantes, que se diferencian en el tipo de receptores que bloquean y, por tanto, en sus efectos. Los betabloqueantes no selectivos (como el propranolol) bloquean los receptores β_1 y β_2 , y afectan al corazón, los vasos sanguíneos y las vías respiratorias. Los betabloqueantes selectivos (como el metoprolol) bloquean principalmente los receptores β_1 y, por tanto, afectan sobre todo al corazón, pero no a las vías respiratorias. Algunos betabloqueantes (como el pindolol) imitan los efectos de la epinefrina y la norepinefrina, y pueden provocar un aumento de la presión sanguínea y la frecuencia cardíaca [1, 2].

Las columnas Agilent Poroshell HPH C18 con partículas de 2,7 o 4 μm permiten utilizar de forma rutinaria fases móviles de pH alto para el análisis de compuestos básicos (como los betabloqueantes). Estas columnas permiten utilizar un rango de pH más amplio para el desarrollo de métodos con partículas superficialmente porosas. Las columnas con este tipo de partículas se usan cada vez más debido a su alta eficiencia y velocidad.



Agilent Technologies

Experimento

Se utilizó un sistema LC Agilent 1260 Infinity, compuesto por los elementos siguientes:

- Bomba binaria SL Agilent 1260 Infinity, capaz de proporcionar una presión de hasta 600 bar (G1312B).
- Compartimento termostatzado de columna Agilent 1260 Infinity (G1316C).
- Inyector automático SL Plus de alto rendimiento Agilent 1260 Infinity (G1376C).
- Detector de diodo array Agilent 1260 Infinity (G4212A) con una celda de flujo de 10 mm de paso óptico y 1 μ l de volumen (ref. G4212-60008).

En este estudio se utilizaron las columnas siguientes:

- Agilent Poroshell HPH-C18, 4,6 x 100 mm, 2,7 μ m (ref. 695975-702).
- Agilent Poroshell HPH-C18, 4,6 x 100 mm, 4 μ m (ref. 695970-702).

Para controlar el instrumento y procesar los datos se utilizó el software Agilent ChemStation (versión C.1.05).

Entre los compuestos analizados se incluyeron el uracilo y una serie de betabloqueantes preparados en agua y acetonitrilo (50:50) con una concentración de 1 mg/ml, que se mezclaron posteriormente a partes iguales para obtener una disolución de aproximadamente 0,143 μ g/ml de atenolol, pindolol, acebutolol, metoprolol, oxprenolol, alprenolol y propranolol. En la Figura 1 se muestran las estructuras y los detalles. Se prepararon formiato de amonio y ácido fórmico con una concentración de 10 mM; después, se utilizaron para preparar un tampón de pH bajo (pH 3). El formiato de amonio se adquirió a Sigma-Aldrich, Corp. El ácido fórmico de doble destilación se adquirió a GFS. Se utilizaron bicarbonato amónico e hidróxido amónico, suministrados por Sigma-Aldrich, para preparar un tampón de pH 10.

Las columnas se calentaron a 25 °C y se equilibraron a 1 ml/min durante 10 minutos antes de realizar las pruebas.

Resultados y comentarios

En la Figura 1 se pueden observar las distintas estructuras de los betabloqueantes utilizados. Su diversidad permite conseguir una amplia variedad de efectos en distintas partes del cuerpo. Los betabloqueantes son compuestos básicos que contienen un grupo amino secundario en su estructura.

En la Figura 2 se muestran cromatogramas como los que podrían obtenerse durante un barrido inicial del proceso de desarrollo de métodos. Como se observa, aunque se obtiene una separación adecuada, la forma de pico de los picos que eluyen al final no es muy buena. A medida que se reduce la concentración del tampón

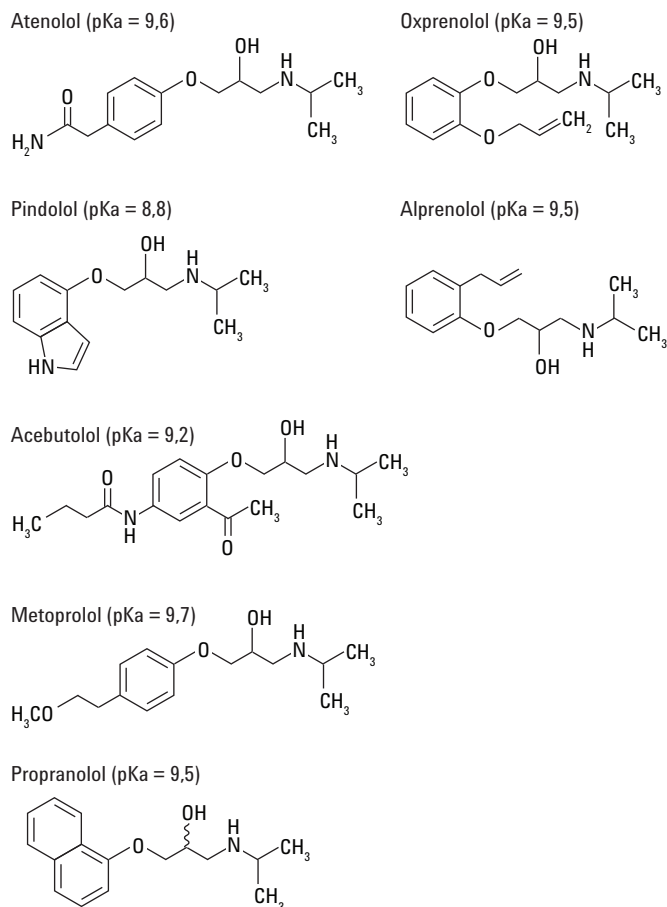


Figura 1. Estructuras de betabloqueantes.

en la fase móvil, la línea base baja y los picos se van ensanchando y acortando ligeramente. Por tanto, la cuantificación se vuelve más difícil. Esto puede corregirse añadiendo tampón o modificador de fase móvil al acetonitrilo. Tal como puede observarse, las columnas Poroshell HPH C18 (A) de 2,7 μ m y Poroshell HPH C18 (B) de 4 μ m presentan un comportamiento cromatográfico idéntico, lo que indica que la cromatografía es transferible.

En la Figura 3 se muestra la cromatografía de la mezcla a pH 10,5. Con esta fase móvil alcalina, la separación de los compuestos básicos completamente protonados es mejor que la obtenida con la fase móvil ácida de la Figura 2. En todos los casos, la forma de pico es mejor, las colas de pico son menores, los picos son más altos y el tiempo de retención es mayor en comparación con la Figura 2. Los pares de picos 6 y 7 quedan perfectamente resueltos en estas condiciones. Debido a estas mejoras de la cromatografía, podemos cuantificar a niveles más bajos los compuestos. Tal como puede observarse, las columnas Poroshell HPH C18 (A) de 2,7 μ m y Poroshell HPH C18 (B) de 4 μ m presentan un comportamiento cromatográfico idéntico, lo que indica que la cromatografía es transferible.

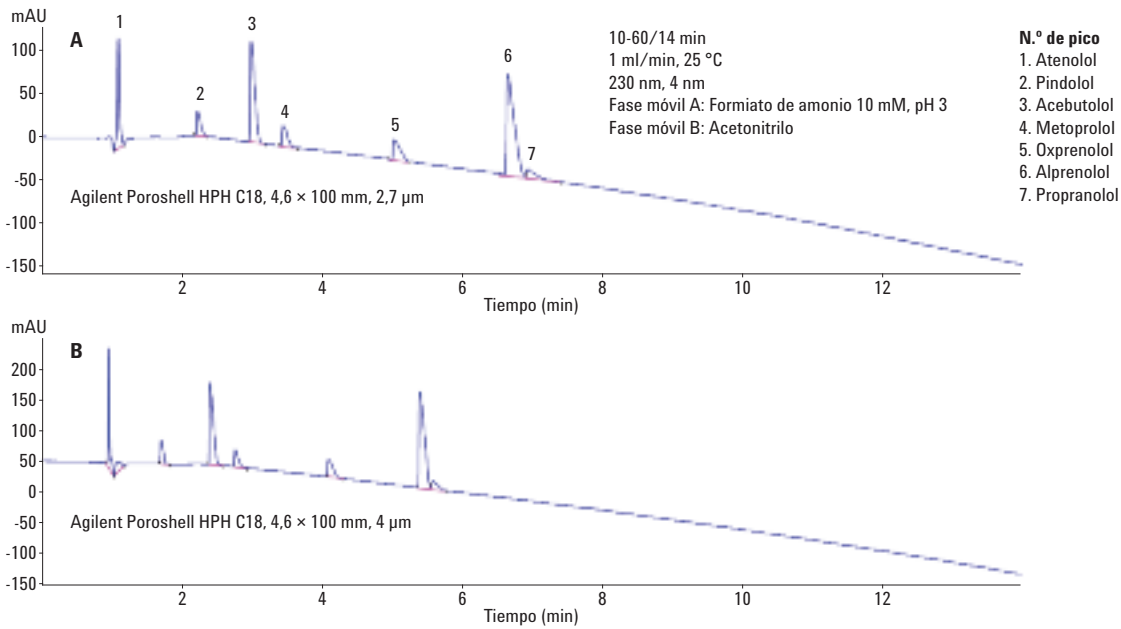


Figura 2. Separación a pH bajo de una mezcla de betabloqueantes con una columna Agilent Poroshell HPH C18.

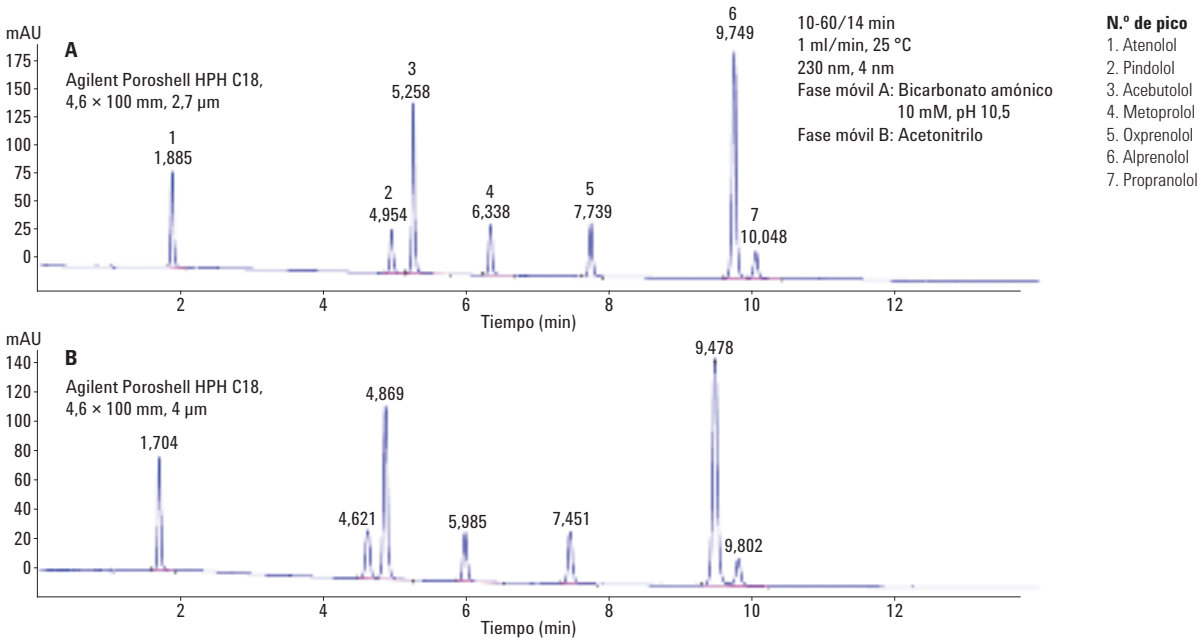


Figura 3. Separación a pH alto de una mezcla de betabloqueantes con una columna Agilent Poroshell HPH C18.

Conclusiones

Las columnas Agilent Poroshell HPH C18 con partículas de 2,7 o 4 µm permiten utilizar de forma rutinaria fases móviles de pH alto para el análisis de compuestos básicos. En ambos casos, un pH alto hace posible obtener picos más estrechos y mejor retenidos. En algunos casos, también se consigue mejorar la resolución. Las nuevas columnas estables a pH alto, como la columna Poroshell HPH C18, permiten utilizar el control del pH para ajustar la selectividad sin que eso acorte la vida útil de la columna. Su selectividad es similar, lo que hace que los métodos puedan transferirse entre columnas de 2,7 µm y 4 µm en función de las condiciones de presión.

Gracias a estas columnas, los cromatografistas pueden aventurarse ahora a usar un rango mayor de pH para el desarrollo de métodos con tecnología de partículas superficialmente porosas, que se utiliza cada vez más gracias a su alta eficiencia y velocidad [3].

Referencias

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).

Más información

Estos datos representan resultados típicos. Si desea obtener más información sobre nuestros productos y servicios, visite nuestra página web www.agilent.com/chem.

www.agilent.com/chem

Agilent no se hace responsable de ningún error incluido en este documento ni de ningún daño incidental o consecuencial relacionado con la distribución, la aplicación o el uso de este material.

La información, las descripciones y las especificaciones de esta publicación están sujetas a modificación sin previo aviso.

© Agilent Technologies, Inc. 2015
Impreso en EE. UU.
7 de diciembre de 2015
5991-6519ES



Agilent Technologies