

Béta-blokkolók enantiomerjeinek folyadékkromatográfiás elválasztása teicoplanin tartalmú királis állófázison

Gagy László¹, Gyéresi Árpád¹, Gergely András²

¹Marosvásárhelyi Orvosi és Gyógyszerészeti Egyetem, Gyógyszerészeti Kar, Gyógyszerészeti Kémiai Tanszék,

²Semmelweis Egyetem, Gyógyszerészeti Kémiai Intézet, Budapest

Separarea enantiomerilor unor derivați din clasa beta-blocantelor prin cromatografie chirală folosind fază staționară chirală cu teicoplanină

În tratamentul bolilor cardiovasculare sunt utilizate circa 50 de blocante β -adrenergice (β -blocante), în majoritate derivați de ariloxi-propanolamină, cu un atom de carbon ca centru de chiralitate. De obicei enantiomerii S(-) sunt mai activi. Din acest motiv câțiva compuși (ex. timolol) se folosesc sub formă de un enantiomer pur. Farmacopeea Europeană [15] prevede o metodă CLIP, folosind fază staționară chirală, pentru determinarea purității enantiomerice a timololului. În literatura de specialitate sunt descrise numeroase metode cromatografice chirale aplicabile pentru determinarea purității optice a substanțelor medicamentoase. Am cercetat 16 compuși din grupa β -blocantelor. Pentru separarea enantiomerilor acestor compuși am folosit metoda cromatografiei de lichide sub presiune, folosind fază staționară chirală (Chirobiotic T, 50 x 4,6 mm, 5 μ m, conținând teicoplanină). În cazul a celor 15 compuși am observat interacțiune stereoselectivă. Am obținut separarea enantiomerilor la linia de bază la 6 compuși.

Enantioseparation of beta-blockers on teicoplanin chiral stationary phase using chiral chromatography

In treating the diseases of the cardiovascular system, most of the 50 used β -blocking agents are aryloxy-propanolamine derivatives, containing chiral center. Typically, the S(-) enantiomers are more active than the R(+) enantiomers. For this reason some of them (for example timolol) are used as a single enantiomer. For the determination of the enantiomeric purity of timolol the recent edition of the European Pharmacopoeia [15] prescribes a HPLC method using chiral stationary phase. There are several chiral chromatographic methods for the determination of enantiomeric purity of medicinal substances in the pharmaceutical bibliography. In our studies we used several (16) β -blockers. For the enantioseparation of these compounds we applied the method of liquid chromatography, using Chirobiotic T (50 x 4,6 mm, 5 μ m, containing teicoplanin) chiral stationary phase. In case of 15 compounds chiral interaction was observed. Baseline separation of 6 compounds was obtained.

Orvostudományi Értesítő, 2007, 80 (1): 54-57

www.emeogysz.ro

A terăpiában használt több mint 50 β -blokkoló esetében általában az egyik enantiomer lényegesen hatékonyabb [12], s ezért egyes vegyületeket, pl. a timololt S(-) konfigurációjú tiszta enantiomer formájában használják. A tiszta enantiomerként bevezetett gyógyszervegyületek esetében a gyógyszerkönyvek nagy figyelmet fordítanak az enantiomertisztaság ellenőrzésére. A timolol enantiomertisztaságának vizsgálatára az Európai Gyógyszerkönyv [15] nagyhatékonyságú folyadékkromatográfiás módszert ír elő, királis állófázis használatával. A szakirodalomban számos, a β -blokkolók enantiomertisztaságának meghatározására alkalmas kromatográfiás módszer található [1-11, 13, 14].

A gyógyszervegyületek vizsgálatára, királis szelektorként, gyakran használják a makrociklikus antibiotikumokat [5, 8]. Egyes β -blokkolók (acebutolol, alprenolol, atenolol, metoprolol, oxprenolol, pindolol, propranolol és sotalol) esetében is sikeresen alkalmaztak teicoplanin tartalmú állófázist [4, 6, 8, 9, 11, 14] az enantiomerek szétválasztására, valamint az egyes vegyületek biológiai folyadékokból való sztereoselektív meghatározására.

Vizsgálatainkban 16 (ebből 7 irodalmi adatok alapján is szétválasztható teicoplanin tartalmú királis állófázison) β -blokkoló szerepelt (1. táblázat). E vegyületek enantiomerjeinek szétválasztására folyadékkromatográfiás módszert alkalmaztunk, királis állófázisként Chirobiotic T (teicoplanin tartalmú) oszlopot használva. A kromatográfiás körülményeket irodalmi adatok [11] alapján választottuk ki.

Anyagok és módszer

Anyagok

RS-propranolol HCl (Aldrich), RS-metoprolol tartarát, RS-bisoprolol hemifumarát és RS-sotalol HCl (Moebs, Spanyolország), RS-carvedilol (Coprima, Spanyolország), RS-atenolol (Ipca Laboratories, India), RS-oxprenolol HCl (Aldrich), RS-celiprolol HCl (Moebs, Spanyolország); RS-carteolol, RS-mepindolol, RS-pindolol, RS-acebutolol HCl, RS-bupranolol HCl, RS-betaxolol HCl, RS-labetalol és RS-nadolol (Bioanalitikai Intézet/ Pécsi Egyetem); Trietilamin (TEA), ecetsav, metanol (MeOH) és acetonitril (AcCN) - Merck.

Felszerelés

Jasco PU-980 HPLC pumpa,
Jasco UV-1575 detektor,
Rheodyne 7725i injektor, 20 μ l loop.

Módszer

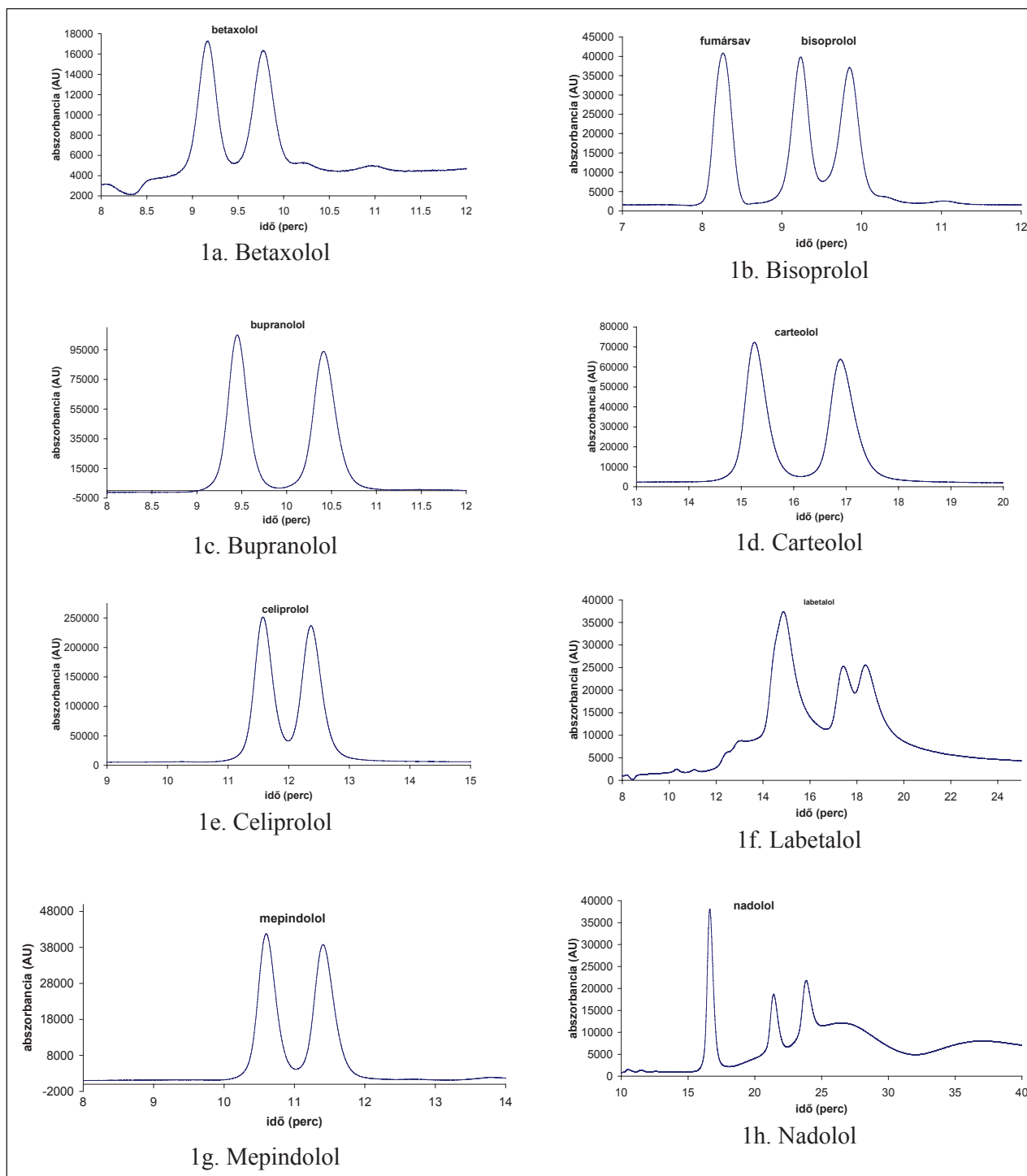
Chirobiotic T (50x4,6 mm, részecskeméret 5 μ m) kromatográfiás oszlopot használtunk.

Mozgófázisként acetonitril, metanol, ecetsav és trietilamin 55:45:0,3:0,2 (v/v/v/v) elegyet használtunk.

A minták készítése metanolban való oldással történt (0,01%). Detektálás: UV, 262 nm.

Áramlási sebesség: 0,8 ml/min.





1.ábra. Béta-blokkolók enantiomerjeinek szétválasztása teicoplanin tartalmú állófázison. Mozgófázis: $\text{AcCN}:\text{MeOH}:\text{CH}_3\text{COOH}:\text{TEA} = 55:45:0,3:0,2$; oszlop: Chirobiotic T ($50 \times 4,6$ mm, részecskeméret $5 \mu\text{m}$); áramlási sebesség: $0,8 \text{ ml/min}$; minta: $0,01 \%$ -os metanolos oldat; detektálás: UV, 262 nm

Eredmények

A vizsgált körülmények között 15 vegyület mutatott sztereoszелеktív kölcsönhatást (1. ábra, 2. táblázat). 6 vegyület (betaxolol – 1a ábra, bupranolol – 1c ábra, carteolol – 1d ábra, metoprolol, propranolol, sotalol) esetében alapvonalú szétválasztást sikerült elérni. Az acebutolol, atenolol, bisoprolol,

celiprolol, labetalol, mepindolol, nadolol, oxprenolol és pindolol esetében csak részleges szétválás volt megfigyelhető, az alapvonalú szétválasztáshoz a kromatográfiás körülmények optimalizálása szükséges. A labetalol (4 izomer) esetében 4 csúcs volt észlelhető (1f ábra). A nadolol (4 izomer) esetében csak 3 csúcs volt észlelhető (1h ábra). Az alkalmazott körülmények között a carvedilol nem mutatott sztereoszелеktív kölcsönhatást.

1. táblázat. A vizsgált β -blokkolók szerkezete

Elnevezés	Szerkezet
	$R^1-O-CH_2-CH(OH)-CH_2-NH-R^2$
Acebutolol	
Atenolol	
Betaxolol	
Bisoprolol	
Bupranolol	
Carteolol	
Carvedilol	
Celiprolol	
Labetalol	
Mepindolol	
Metoprolol	
Nadolol	
Oxprenolol	
Pindolol	
Propranolol	
Sotalol	

2. táblázat. Béta-blokkolók enantiomerjeinek szétválasztása teicoplanin tartalmú állófázison

Megnevezés	Retenciósi idő (t)				Kapacitástényező (k)				Szelektivitási tényező (α)			Felbontás (Rs)		
	t ₁	t ₂	t ₃	t ₄	k ₁	k ₂	k ₃	k ₄	α _{1,2}	α _{2,3}	α _{3,4}	R _{s1,2}	R _{s2,3}	R _{s3,4}
Acebutolol	12,39	12,91	-	-	3,96	4,16	-	-	1,050	-	-	0,992	-	-
Atenolol	18,25	19,50	-	-	6,30	6,80	-	-	1,079	-	-	1,434	-	-
Betaxolol	9,17	9,78	-	-	2,67	2,91	-	-	1,090	-	-	1,575	-	-
Bisoprolol	9,24	9,85	-	-	2,70	2,94	-	-	1,088	-	-	1,564	-	-
Bupranolol	9,45	10,41	-	-	2,78	3,16	-	-	1,137	-	-	2,199	-	-
Carteolol	15,25	16,89	-	-	5,10	5,76	-	-	1,129	-	-	2,043	-	-
Celiprolol	11,57	12,37	-	-	3,63	3,95	-	-	1,088	-	-	1,407	-	-
Labetalol	13,07	14,87	17,41	18,37	4,23	4,95	5,96	6,35	1,170	1,204	1,065	1,29	1,96	1,286
Mepindolol	10,6	11,41	-	-	3,24	3,56	-	-	1,098	-	-	1,632	-	-
Metoprolol	10,74	11,68	-	-	3,30	3,67	-	-	1,112	-	-	1,802	-	-
Nadolol	16,62	21,41	23,85	-	5,65	7,56	8,54	-	1,338	1,130	-	4,971	2,330	-
Oxprenolol	9,58	10,09	-	-	2,83	3,04	-	-	1,074	-	-	1,260	-	-
Pindolol	10,36	10,99	-	-	3,14	3,40	-	-	1,083	-	-	1,449	-	-
Propranolol	11,56	12,62	-	-	3,62	4,05	-	-	1,119	-	-	1,903	-	-
Sotalol	13,57	14,93	-	-	4,43	4,97	-	-	1,122	-	-	1,958	-	-

Mozgófázis: AcCN:MeOH:CH₃COOH:TEA – 55:45:0,3:0,2; oszlop: Chirobiotic T (50×4,6 mm, részecskeméret 5 μm); áramlási sebesség: 0,8 ml/min; minta: 0,01%-os metanolos oldat; detektálás: UV, 262 nm, 1 – első enantiomer, 2 – második enantiomer, stb, $k = (t_r - t_0)/t_0$, $\alpha = k_n + 1/k_p$, $R_s = 2(t_n + t_p)/(w_n + w_p + 1)$; $t_0 = 2,5$ perc

Következtetések

Az alkalmazott módszerrel a tanulmányozott szakirodalomban a Chirobiotic T oszlopon már szétválasztott β-blokkolókon kívül 3 vegyület (betaxolol, bupranolol, carteolol) enantiomerjeit sikerült az alapvonalon szétválasztani. A módszer alkalmazható lehet az illető vegyületek biológiai folyadékokból történő enantioszelektív vizsgálatára is. Számos további vegyület esetén sztereoszelektív kölcsönhatást figyeltünk meg, így a kromatográfiás körülmények optimalizálásával alapvonalú szétválasztásuk valószínűleg megoldható.

Köszönetnyilvánítás

A munkáinkhoz nyújtott támogatásért köszönet illeti a Domus Hungarica Scientiarum et Artium alapítványt.

Irodalom

1. Aboul-Enein H. Y. - High-performance liquid chromatographic enantioseparation of drugs containing multiple chiral centers on polysaccharide-type chiral stationary phases, J. Chromatogr. A, 2001, 906:185-193.
2. Aboul-Enein H. Y., Serignese V. - Role of solvents in the resolution of some beta-adrenergic blockers on cellulose 3,5-dimethylphenyl carbamate chiral stationary phase, J. Liq. Chromatogr., 1993, 16(1):197-207.
3. Agrawal Z. K., Patel R. N. - Chiral chromatographic separation of beta-blockers, J. Chromatogr. B, 2005, 820: 23–31.
4. Badaloni E., D'Acquarica I., Gasparrini F. et al. - Enantioselective liquid chromatographic-electrospray mass spectrometric assay of β-adrenergic blockers: application to a pharmacokinetic study of sotalol in human plasma, J. Chromatogr. B, 2003, 796:45–54.
5. Bojarski J. - Stereoselective chromatography of cardiovascular drugs: an update, J. Biochem & Biophys Methods, 2002, 54(1-3):197-220.
6. D'Orazio G., Fanali S. - Use of teicoplanin stationary phase for the enantiomeric resolution of atenolol in human urine by nano-liquid chromatography-mass spectrometry, J. Pharm. & Biomed. Anal., 2006, 40:539–544.
7. Gyéresi Á., Józan M., Szász Gy. et al. - Ariloxipropanolamin származékok enantiomerjeinek szétválasztása királis állófázison, Congressus Pharmaceuticus Hungaricus XII, 8-10.05.2003, Budapest – Gyógyszerészet, összefoglalók p.68.
8. Kafkova B., Bosakova Z., Tesarova E., Coufal P. - Chiral separation of beta-adrenergic antagonists, profen non-steroidal anti-inflammatory drugs and chlorophenoxypropionic acid herbicides using teicoplanin as the chiral selector in capillary liquid chromatography, J. Chromatogr. A, 2005, 1088:82–93.
9. Karlsson Ch., Wikstrom H., Armstrong D. W., Owens P. K. - Enantioselective reversed-phase and non-aqueous capillary electrochromatography using a teicoplanin chiral stationary phase, J. Chromatogr. A, 2000, 897:349–363.
10. Lanchote V. L., Bonato P. S., Cerqueira P. M. et al. - Enantioselective analysis of metoprolol in plasma using high-performance liquid chromatographic direct and indirect separations: applications in pharmacokinetics, J. Chromatogr. B, 2000, 738:27–37.
11. Lamprecht G., Kraushofer T., Stoschitzky K., Lindner W. - Enantioselective analysis of (R)- and (S)-atenolol in urine samples by a high-performance liquid chromatography column-switching setup, J. Chromatogr. B, 2000, 740:219–226.
12. Mehvar R., Brocks D. R. - Stereospecific Pharmacokinetics and Pharmacodynamics of Beta-Adrenergic Blockers in Humans, J. Pharm. Sci., 2001, 4(2):185-200.
13. Szymura-Oleksiak J., Bojarski J., Aboul-Enein H. Y. - Recent applications of stereoselective chromatography, Chirality, 2002, 14:417-435.
14. Xia Y. Q., Bakhtiar R., Franklin R. B. - Automated online dual-column extraction coupled with teicoplanin stationary phase for simultaneous determination of (R)- and (S)-propranolol in rat plasma using liquid chromatography-tandem mass spectrometry, J. Chromatogr. B, 2003, 788:317–329.
15. ***European Pharmacopoeia 5th edition, Council of Europe, Strasbourg, 2004.