



universität
wien

DIPLOMARBEIT

Titel der Diplomarbeit

„Enantioselektive Bioanalytik des Beta - Adrenozeptor -
Antagonisten Carvedilol und seiner Metaboliten in
Blutplasma mittels HPLC - Mehrsäulen
Chromatographie“

Verfasser

Leonhard Gruber

angestrebter akademischer Grad

Magister der Naturwissenschaften (Mag. rer. nat.)

Wien, 2011

Studienkennzahl lt. Studienblatt:

A 419

Studienrichtung lt. Studienblatt:

Diplomstudium Chemie

Betreuer:

O. Univ.-Prof. Dr. Wolfgang Lindner

1 Themenstellung	4
2 Grundlagen	5
2.1 Pharmakologie von Adrenozeptor – Antagonisten	5
2.2 Pharmakologie und klinische Anwendung von Carvedilol ..	7
2.3 Theoretische Grundlagen der Chromatographie	9
2.3.1 Der chromatographische Trennprozess	9
2.3.2 Chromatographische Kenngrößen	12
2.3.3 Dynamische Beschreibung	16
2.3.4 Arten der Chromatographie.....	18
2.3 Enantiomerentrennungsmethoden für Carvedilol	20
3 Praktischer Teil	21
3.1 Materialien und Geräte	21
3.1.1 Chemikalien.....	21
3.1.2 Geräte und apparativer Aufbau	21
3.2 Trennsäulenmaterialien	23
3.2.1 LiChrospher® ADS	23
3.2.2 Teicoplanin	24
4 Methodenentwicklung	25
4.1 Säulenschaltmethode mit „on-column“ Deproteinierung ..	25
4.1.1 Eluenten- und Trennsäulenauswahl	25
4.1.2 Blindwert.....	35
4.1.3 Metaboliten.....	36
4.2 Flüssig-Flüssig Extraktion mit Säulenschalten	38
4.2.1 Flüssig-Flüssig Extraktion	38
4.2.2 Chromatographie	40
4.2.3 Kalibrierung	43
4.2.4 Anwendung	44
5 Analysenresultate	45
6 Literatur- und Abbildungsverzeichnis	70
7 Zusammenfassung	72
8 Abstract	73
9 Anhang	74
10 Lebenslauf	79

Danksagung

O. Univ.-Prof. Dr. Wolfgang Lindner danke ich für die Bereitstellung des Themas und der Möglichkeit zur Durchführung.

Bei Dr. Günther Lamprecht bedanke ich mich für seine Hilfe bei der Durchführung und Bearbeitung des Themas.

Meinen Vorgesetzten auf meiner Arbeitsstelle O. Univ.-Prof. Dr. Alfred Vendl und Ao. Univ.-Prof. Dr. Bernhard Pichler danke ich für ihr Entgegenkommen.

Ich danke meinen Eltern Leonhard († 2011) und Johanna Gruber für alles.

1 Themenstellung

Die Aufgabe war die quantitative Bestimmung der Enantiomere von (*R,S*)-Carvedilol in Blutplasma.

Dafür sollte eine von Prof. F. Gasparrini (Universita „La Sapienza“, Rom, Italien) entwickelte Enantiomerentrennsäule verwendet werden. Mittels vorgeschalteter ADS-Trennsäule sollte eine Trennung des Analyten von der Matrix erreicht und somit eine „on-line“ Analysenmethode etabliert werden, die eine direkte Dosierung von Blutplasma erlaubt.

Mit dieser entwickelten Methode sollten 400 Plasmaproben von Patienten und Probanden, von der Med. Univ.-Klinik Graz, bestimmt werden.

2 Grundlagen

2.1 Pharmakologie von Adrenozeptor – Antagonisten

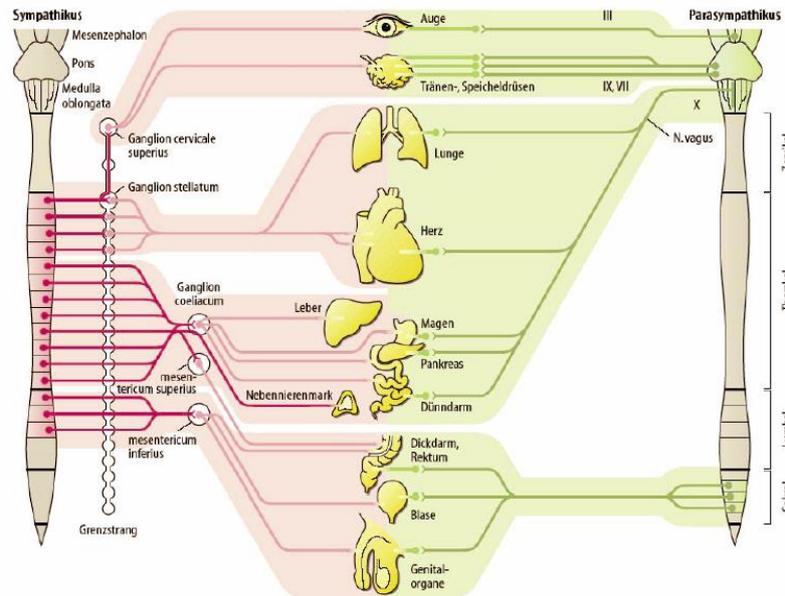


Abb. 1: Aufbau des vegetativen Nervensystems[1]

Zusammengefasst und abschnittsweise zitiert [2] ergibt sich folgendes Bild des vegetativen Nervensystems. Das vegetative Nervensystem beeinflusst die Funktionen aller Organe oder Organsysteme. Die Erregung oder Hemmung vegetativer Neuronen geschieht meist unbewusst.

Das vegetative Nervensystem wird in einen sympathischen und einen parasympathischen Anteil gegliedert. Da die meisten Organe von beiden Teilen des vegetativen Nervensystems angeregt und funktionell entgegengesetzt beeinflusst werden, erlaubt diese Zweiteilung eine fein abgestimmte Regelung.

Die Erhöhung des Sympathikotonus dient der Anpassung an Situationen, die hohe Leistungen erfordern (z. B. Kampf oder Flucht) und mobilisiert Energie aus Reserven (Ergotropie).

In Perioden der Ruhe, Entspannung, Verdauung usw. überwiegt der Parasympathikotonus und begünstigt regenerative und angleichende Prozesse (Trophotropie).

Sympathikus und Parasympathikus sind aus zwei hintereinander geschalteten Neuronen aufgebaut. Der Zellkörper des ersten oder präganglionären Neurons liegt im

Gehirn oder Rückenmark und sendet sein Axon bis zum vegetativen Ganglion (Anhäufung von Nervenzellen) in der Peripherie, wo es synaptische Kontakte mit dem Zellkörper des zweiten oder postganglionären Neurons aufnimmt.

Die Erregungsübertragung vom prä- auf das postganglionäre Neuron oder vom postganglionären Neuron auf die Effektorzellen geschieht mit Hilfe von Überträgerstoffen (Neurotransmitter) im Bereich der so genannten Synapsen. Eine Synapse besteht aus:

- der Nervenendigung (präsynaptischer Anteil),
- dem synaptischen Spalt und
- spezialisierten Membranabschnitten am Zellkörper oder den Dendriten eines Neurons oder der Effektorzelle (postsynaptischer Anteil).

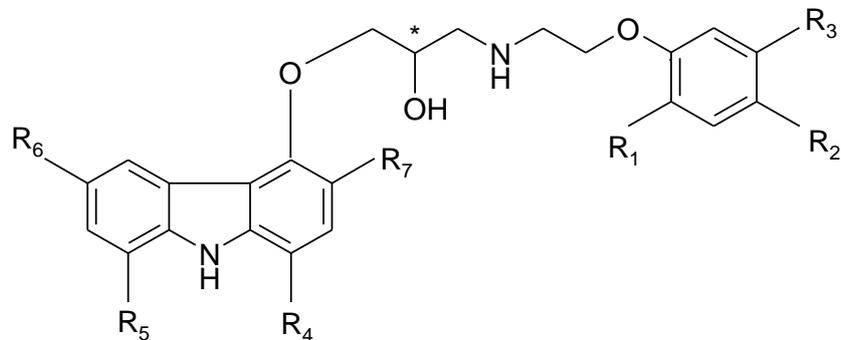
Die Neurotransmitter Acetylcholin bzw. Noradrenalin werden in den Nervenendigungen in Bläschen gespeichert und durch ein eintreffendes Aktionspotential freigesetzt.

Allerdings enthalten die postganglionären parasympathischen und sympathischen Neuronen nicht ausschließlich Acetylcholin, bzw. Noradrenalin, als Transmitter. Es hat sich herausgestellt, dass in vegetativen Neuronen und in zahlreichen Neuronen des Zentralnervensystems zwei, drei oder mehr Transmitter gemeinsam gespeichert und freigesetzt werden (Cotransmission).

Die Reizung sympathischer Nerven durch Ausschüttung von Noradrenalin oder Adrenalin führt zu einer großen Zahl von teils hemmenden, teils stimulierenden Effekten an nahezu allen peripheren Organen (Abb.1). Als adrenerge Rezeptoren bezeichnet man Rezeptoren an der Plasmamembran, die durch Adrenalin und verwandte Catecholamine ausgelöst werden. Es existieren zwei Typen von Adrenozeptoren, nämlich α - und β - Adrenozeptoren.

Das Verhältnis von α - zu β - Rezeptoren ist in den einzelnen Gefäßgebieten unterschiedlich. Während beispielsweise Haut- und Schleimhautarterien fast ausschließlich mit α -Rezeptoren ausgestattet sind, überwiegen in den arteriellen Gefäßen zur Skelettmuskulatur und in den Herzschlagadern die β -Rezeptoren. Das Herz ist überwiegend mit β -Rezeptoren ausgestattet, die positive inotrope und chronotrope Wirkungen von Sympathomimetika vermitteln.

2.2 Pharmakologie und klinische Anwendung von Carvedilol



	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄	R ₅	R ₆	R ₇
Carvedilol (M0)	OCH ₃	H	H	H	H	H	H
M2	OH	H	H	H	H	H	H
M4	OCH ₃	OH	H	H	H	H	H
M5	OCH ₃	H	OH	H	H	H	H
M14	OCH ₃	H	H	OH	H	H	H
M16	OCH ₃	H	H	H	OH	H	H
M20	OCH ₃	H	H	H	H	OH	H
M21	OCH ₃	H	H	H	H	H	OH

Abb. 2: Struktur von Carvedilol und seiner Metaboliten

Carvedilol [1[Carbazolyl-(4)-oxy]-3-[(2-methoxyphenoxyethyl)amino]-2-propanol] liegt als racemische Mischung des (*R*)- und des (*S*)-Enantiomere vor (Abb.2). Es wirkt als ein Antihypertensiva, das im gleichem Molekül die Eigenschaften von α_1 - und β -Blockade vereinigt.

Eine Kombination von α_1 - und β -Rezeptorblockaden erscheint sinnvoll unter der Vorstellung, das die α_1 -blockierende Komponente den Gefäßwiderstand herabsetzt und damit die Wirkung der β -Blockade unterstützend beeinflussen kann. Carvedilol senkt den systolischen und diastolischen Blutdruck sowie den peripheren Gefäßwiderstand. Dabei wird das mit einer α_1 -Blockade üblicherweise auftretende Herzjagen durch die β -Blockade verhindert. Der Hybridarzneistoff Carvedilol wird bei der Indikation von Bluthochdruck, koronarer Herzkrankheit und chronischer Herzinsuffizienz eingesetzt. Neben den für das Herz wichtigen β_1 - und β_2 -Adrenozeptoren blockiert er auch den α_1 -Adrenozeptoren. Die sich daraus

ergebenden gefäßerweiternden Eigenschaften sind für die Blutdrucksenkung verantwortlich. Dabei ist die β -blockierende Wirkung an die (S)-Form gebunden, während die α_1 -blockierende Wirkung beiden Isomeren zu Eigen ist. Carvedilol hat die typischen Merkmale der β -Rezeptorblocker, eine Propanolaminkette mit einem chiralem Zentrum und einem Substituenten am Stickstoffatom. Diesem Substituent schreibt man die α_1 -blockierende Wirkung des Carvedilol zu [3,4].

Der Carbazolhälfte des Moleküls wird die antioxidative Wirkung zugesprochen. Als Antioxidationsmittel verhindert es die Oxidation von LDL (β -Lipoproteine, Lipoproteine mit geringer Dichte, low-density lipoproteins). Oxidierte LDL sind verantwortlich für die Entwicklung von Arterienverkalkung [3].

Carvedilol wird gut vom Körper aufgenommen. Die Bioverfügbarkeit beträgt wegen des ausgeprägten "first-pass"-Effekts (Anteil im Kreislauf, nach Metabolisierung in der Leber) jedoch nur ~25%. Dabei ist die Bioverfügbarkeit der α_1 -blockierenden rechtsdrehenden (R)-Form 2,5-mal höher als diejenige der (S)-Form. Die Plasmahalbwertszeit beträgt 6 – 7 Std. (Abnahme der Wirkstoffmenge im Organismus) [5].

Carvedilol findet Anwendung bei der Indikation von Bluthochdruck, koronare Herzkrankheit und chronischer Herzinsuffizienz [4,6,7] und ist ein starkes Antioxidationsmittel zum Schutz der Hauptorgane [3,4,8,9].

2.3 Theoretische Grundlagen der Chromatographie

2.3.1 Der chromatographische Trennprozess

Veronika Mayer schreibt über die Chromatographie[10]: „...ist ein Trennprozeß, bei welchem das Probengemisch zwischen zwei Phasen im chromatographischen Bett (Trennsäule oder Ebene) verteilt wird. Eine Hilfsphase ruht, die andere Hilfsphase strömt daran im chromatographischen Bett vorbei. Ruhende Hilfsphase = stationäre Phase: zur „Adsorption“ (im weiteren Sinn) fähiges Material in der Form von festen Teilchen, behandelten Oberflächen oder flüssigkeitsbelegten Trägern. Strömende Hilfsphase = mobile Phase: Gas oder Flüssigkeit.“

Als Beispiel ist die Trennung einer Mischung aus zwei Komponenten Δ und O dargestellt. Die Abbildungen 3.a-d. [10] zeigen den Verlauf der chromatographischen Trennung.

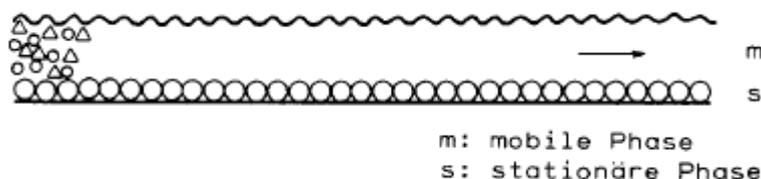


Abb. 3a

Eine Komponente Δ hält sich bevorzugt in der stationären Phase auf, die andere Komponente O bevorzugt in der mobilen Phase.

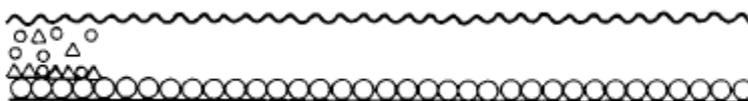


Abb. 3b

Wenn frisches Fließmittel nachströmt, stellt sich ein neues Gleichgewicht ein: Probemoleküle, die sich in der mobilen Phase befanden, werden von der „nackten“ Oberfläche der stationären Phase gemäß ihrem Verteilungskoeffizienten zum Teil adsorbiert, während vorher adsorbierte Moleküle wieder in die mobile Phase übertreten.



Abb. 3c

Nach oftmaliger Wiederholung dieses Vorgangs sind die beiden Komponenten getrennt. Die mobile Phase bevorzugende Komponente O wandert schneller als die Δ Komponente, welche mehr an der stationären Phase „haftet“ (Abb. 3c u. 3d).

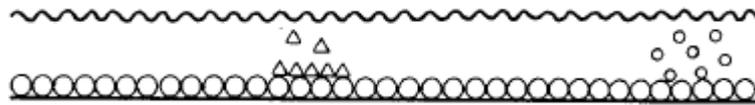


Abb. 3d

Die chromatographische Trennung kann man sich als eine Abfolge von Gleichgewichtseinstellungen vorstellen. Nach vielfacher Wiederholung der Gleichgewichtseinstellungen sind die Substanzen vollständig voneinander getrennt. Je nach Art und Beschaffenheit der stationären Phase sind verschiedene physikalisch - chemische Vorgänge an dieser Gleichgewichtseinstellung beteiligt.

Unabhängig davon, welcher der vielen unterschiedlichen molekularen Mechanismen für die Verteilung bzw. Adsorption der Probenbestandteile verantwortlich ist, lassen sich derartige Verteilungen zwischen zwei Phasen theoretisch durch einen *Verteilungskoeffizient* K beschreiben.

$$K_x = \frac{c_{stat}}{c_{mob}}$$

c_{stat} : Konzentration des Stoffes X in der stationären Phase

c_{mob} : Konzentration des Stoffes X in der mobilen Phase

Bei Adsorptionssystemen mit kleinen Analytenkonzentrationen, bei denen eine Sättigung der stationären Phase nicht erreicht wird, gibt die empirische gefundene Freundlich'sche Adsorptionsisothermen im Anfangsverlauf eine gute Beschreibung (Abb. 4).

$$\frac{x}{m} = a \cdot c^{1/n}$$

x : adsorbierte Menge

m : Gesamtmenge an Adsorbens

c : Konzentration des Stoffes in Lösung

a, n : temperaturabhängige stoffspezifische Konstanten

Bei höheren Stoffkonzentrationen beobachtet man eine Sättigung, die adsorbierte Menge erreicht ein Maximum. Die Langmuirsche Adsorptionsisotherme beschreibt dieses Phänomen zufriedenstellend (Abb. 4).

$$\frac{x}{m} = \frac{x_{\max} \cdot c}{c + b}$$

b : von der mobilen und stationären Phase abhängige Konstante

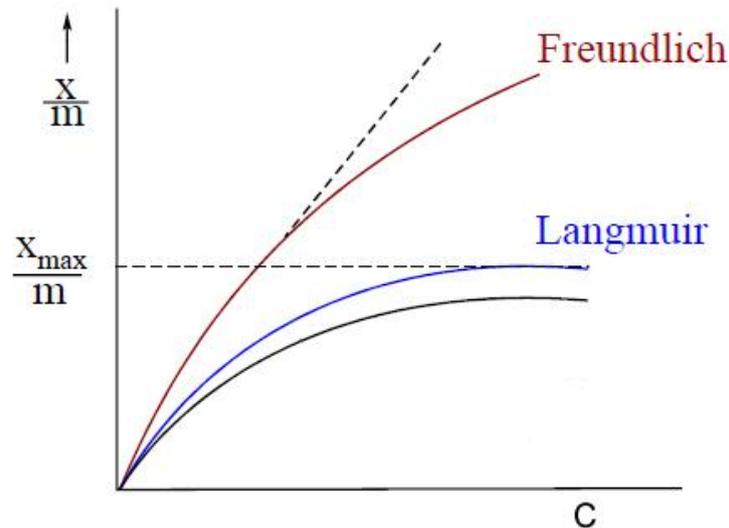


Abb. 4 Adsorptionsisotherme [11]

Ein anderes Maß für die Beschreibung der Verteilungsgleichgewichte ist der *Retentionsfaktor* k .

$$k = \frac{n_{\text{stat}}}{n_{\text{mob}}}$$

n_{stat} : Anzahl Mole des Stoffes X in der stationären Phase bei Gleichgewicht

n_{mob} : Anzahl Mole des Stoffes X in der mobilen Phase bei Gleichgewicht

Damit sich ein Stoffgemisch trennt, müssen die verschiedenen Komponenten im betreffenden chromatographischen System verschiedene *Verteilungskoeffizienten* K , bzw. verschiedene *Retentionsfaktoren* k haben.

Am Ende der Trennsäule erfolgt die Detektion mit der Ausgabe eines Chromatogrammes, auf dem die Signale der Analyten als Peaks, die im Idealfall einer Gaußkurve entsprechen, sichtbar sind. Die Peaks liefern qualitative und quantitative Informationen über die untersuchte Mischung.

Qualitativ: Die Retentionszeit liefert eine qualitative Information. Sie ist jene Zeit, die vom Dosieren der Probe bis zum Erscheinen des Signalmaximums am Detektorausgang verstreicht. Die Retentionszeit einer Komponente ist, bei gleichen chromatographischen Bedingungen, stets konstant. Die chromatographischen Bedingungen sind gegeben durch: Art der stationären Phase, Zusammensetzung der mobilen Phase, Fließgeschwindigkeit der mobilen Phase und Temperatur.

Zur Identifikation eines Peaks wird die in Frage kommende Substanz rein dosiert und die Retentionszeit mit der Probenretentionszeit verglichen.

Quantitativ: Die Fläche des Peaks ist mit der eingespritzten Stoffmenge proportional. Aus der Auswertung der Peakfläche bzw. Peakhöhe von Chromatogrammen unterschiedlicher Standardkonzentrationen kann eine Kalibrierfunktion erstellt werden. Aus der Peakfläche bzw. Peakhöhe einer unbekannt Probe kann über der Kalibrierfunktion die Konzentration bzw. der Gehalt an Zielanalyten ermittelt werden.

2.3.2 Chromatographische Kenngrößen

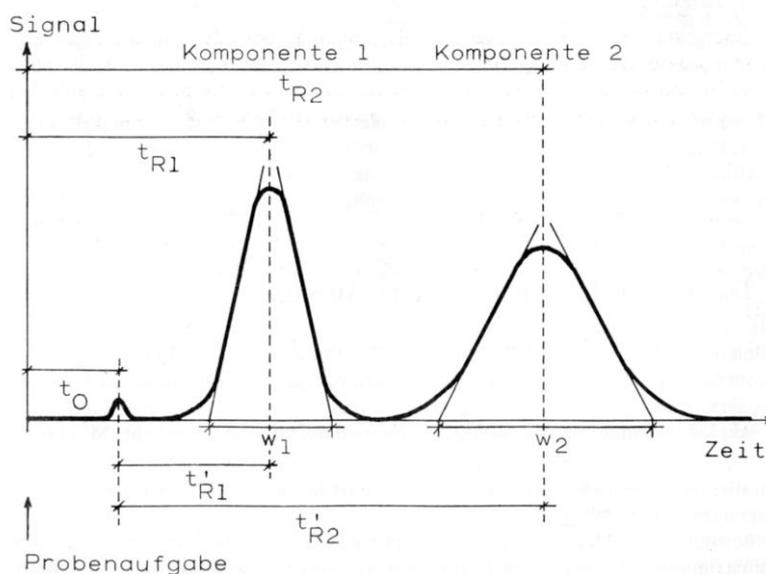


Abb. 5: das Chromatogramm und seine Kenngrößen [10]

w : Basisbreite eines Peaks^a

t_0 : Totzeit der Trennsäule; die Zeit, die die mobile Phase benötigt, um durch die Trennsäule zu wandern. Die lineare Geschwindigkeit u des Lösungsmittels berechnet sich demnach zu.

$$u = \frac{L}{t_0}$$

L : Länge der Trennsäule.

t_R : Retentionszeit; die Zeit, welche vom Einspritzen eines Stoffes bis zur Registrierung seines Peakmaximums verstreicht. Zwei verschiedene Stoffe werden dann getrennt, wenn ihre Retentionszeiten verschieden sind.

t'_R : Netto-Retentionszeit. Wie man aus der Zeichnung sieht, ist $t_R = t_0 + t'_R$

^a Es gilt: $w = 4\sigma$

σ : Standardabweichung des Gauß-Peaks

Ein Stoff, der von der stationären Phase nicht retentiert wird, erscheint bei t_0 am Trennsäulenende. t_0 ist die Aufenthaltszeit einer unverzögerten Substanz in der mobilen Phase und sollte für alle nicht retentierten Stoffe gleich sein. Die getrennten Stoffe unterscheiden sich in t'_R . t'_R ist die Nettoaufenthaltszeit in der stationären Phase. Je länger ein Stoff in der stationären Phase verweilt, desto später wird er eluiert. Die Retentionszeit ist von der Fließgeschwindigkeit der mobilen Phase und der Länge der Trennsäule abhängig. Strömt die mobile Phase langsam oder ist die Trennsäule lang, so ist t_0 groß und damit auch t_R . Besser ist der *Retentionsfaktor*, auch *k*-Wert, für die Charakterisierung einer Substanz geeignet.

$$k = \frac{t'_R}{t_0} = \frac{t_R - t_0}{t_0}$$

k ist von der Trennsäulenlänge und der Fließgeschwindigkeit der mobilen Phase unabhängig (wenn u nicht größer als 5 cm/s ist) und entspricht dem Molverhältnis der Komponenten in der stationären und mobilen Phase [10].

Der k -Wert ist mit dem *Verteilungskoeffizienten* K durch folgende Beziehung verknüpft^b:

$$k = K \frac{V_s}{V_m}$$

V_s : Volumen der stationären Phase der Trennsäule^c

V_m : Volumen der mobilen Phase in der Trennsäule

Zwei Komponenten einer Mischung werden nur getrennt, wenn sie sich in ihren k -Werten unterscheiden. Ein Maß dafür ist die *relative Retention* α , auch *Trennfaktor* genannt.

$$\alpha = \frac{k_2}{k_1} = \frac{t_{R_2} - t_0}{t_{R_1} - t_0} = \frac{K_2}{K_1}$$

Ist $\alpha = 1$, so werden die beiden Komponenten nicht getrennt, denn ihre Retentionszeiten sind gleich groß. Die *relative Retention* ist ein Maß für die Eigenschaft des chromatographischen Systems um zwei Stoffe trennen zu können,

^b Dies gilt nur im sogenannten linearen Bereich, wo k' von der Probenkonzentration unabhängig ist.

^c Retentionsvolumen $V_R = V \cdot t_R$ (V : Volumenstrom in ml/min).

d. h. für seine *Selektivität*, α lässt sich durch die Wahl von stationärer und mobiler Phase beeinflussen.

Die *Auflösung* R zweier benachbarter Peaks ist definiert durch den Quotienten aus dem Abstand der beiden Peakmaxima voneinander, d. h. der Differenz der beiden Retentionszeiten t_R , und dem arithmetischen Mittel aus den beiden Basisbreiten w^d . Die Basisbreite w ist die Strecke auf der Nulllinie, die von den Wendetangenten begrenzt wird (Abb. 5).

$$R = 2 \frac{t_{R_2} - t_{R_1}}{w_1 + w_2} = 1,18 \frac{t_{R_2} - t_{R_1}}{w_{1/2_1} + w_{1/2_2}}$$

$w_{1/2}$: Peakbreite auf halber Höhe des Peaks

Denn Zusammenhang zwischen der Auflösung, dem Trennfaktor (Selektivität), dem Retentionsfaktor und der Bodenzahl N gibt folgende Gleichung wieder:

$$R = \frac{1}{4} \sqrt{N} \frac{\alpha - 1}{\alpha} \frac{k}{k + 1}$$

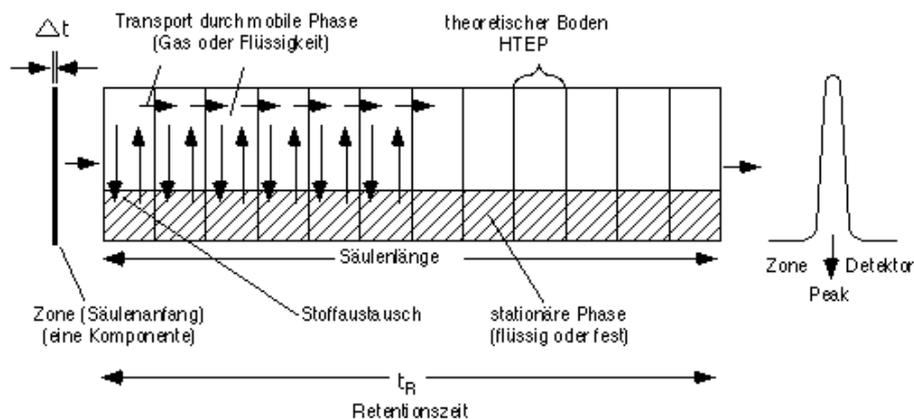


Abb. 6: Schematische Darstellung des Trennvorganges [12]

^d Die Gleichungen sind für Peakpaare von sehr ungleicher Fläche und für asymmetrische Peaks weniger gut geeignet.

Die Strecke, die für die Neueinstellung eines Gleichgewichtszustandes benötigt wird, bezeichnet man als *theoretische Trennstufe* oder „Boden“, und gemeinsam mit der Bodenhöhe charakterisiert sie die Trennsäule. Die Trennstufenhöhe H oder Bodenhöhe *HETP* (Height Equivalent of a Theoretical Plate, Höhe eines theoretischen Bodens) gibt die Strecke an, auf welcher sich das chromatographische Gleichgewicht einmal einstellt (Abb. 6). Mithilfe der Retentionszeit t_R am Peakmaximum und der Basisbreite des Peaks als Abstand der Schnittpunkte der Wendetangenten mit der Basislinie lassen sich die *Trennstufen* N (Bodenzahl) aus dem Chromatogramm ermittelt.

$$N = 16 \left(\frac{t_R}{w} \right)^2 \quad N = 5,54 \left(\frac{t_R}{w_{1/2}} \right)^2 \quad N = 2\pi \left(\frac{h_p t_r}{A} \right)$$

$w_{1/2}$: Peakbreite auf halber Höhe des Peaks

h_p : Peakhöhe

A : Peakfläche

Die Gleichungen geben nur dann korrekte Resultate, wenn der Peak *Gauß-Form* hat, dies ist bei realen Chromatogrammen kaum der Fall. Bei asymmetrischen Peaks gibt nur die Momentenmethode richtige Werte [10].

Annähernd richtige Werte ergibt die Gleichung:

$$N = 41,7 \frac{\left(\frac{t_R}{w_{0,1}} \right)^2}{T + 1,25}$$

$w_{0,1}$: Peakbreite in 10% der Höhe

T : Peaksymmetrie (Abb. 7)

$$T = \frac{b_{0,1}}{a_{0,1}}$$

$a_{0,1}$: Distanz von der Peakfront bis zum Maximum, gemessen bei 0,1 b

$b_{0,1}$: Distanz vom Maximum bis zum Peakende, gemessen bei 0,1 b

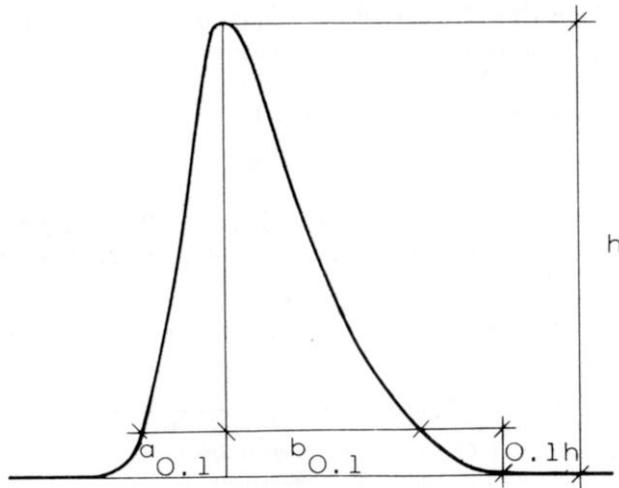


Abb.7: asymmetrischer Peak [Fehler! Textmarke nicht definiert.]

Der *HETP*-Wert (H) berechnet sich aus Länge der Trennsäule L geteilt durch die Anzahl der vorhandenen (theoretischen) *Trennstufen* N und wird in mm angegeben.

$$H = \frac{L}{N}$$

2.3.3 Dynamische Beschreibung

Dynamische Betrachtungen des chromatographischen Trennprozesses in der Trennsäule berücksichtigen die Massentransfer- und Diffusionsvorgänge, die zur Bandenverbreiterung beitragen. Dabei wird die *Trennstufenhöhe* H bzw. *Bodenhöhe* *HETP* (height equivalent to a theoretical plate) mit der mobilen Phase verknüpft. Es existiert eine optimale Fließgeschwindigkeit, bei der die Trennstufenhöhe minimal ist.

Die vereinfachte **van Deemter-Gleichung** beschreibt das Verhältnis von *Trennstufenhöhe* H und *Fließgeschwindigkeit* u , wobei u die durchschnittliche Geschwindigkeit der mobilen Phase ist. Die Faktoren A , B und C stehen für die Massentransfer- und Diffusionsvorgänge, die zur Bandenverbreiterung beitragen.

$$HETP = A + B/u + C u$$

A – Term (Streudiffusion)

Dieser Term beschreibt die Streudiffusion („Eddy-Diffusion“) in einer gepackten Trennsäule. In einer Trennsäulenpackung legen verschiedene Teilchen unterschiedliche lange Wege zwischen den Körnern zurück. Die Streudiffusion ist

abhängig von der Art des Füllmaterials, von der Korngröße, von der Packungsgüte und unabhängig von der Strömungsgeschwindigkeit [12].

$$A = 2\lambda \cdot d_p \quad \lambda: \text{Unregelmäßigkeitsfaktor} \quad d_p: \text{Partickeldurchmesser}$$

B - Term (Längsdiffusion)

Dieser Term beschreibt den Einfluss der molekularen Diffusion entlang der Trennsäulenachse (Axialdiffusion). Bei unendlich kleiner Strömungsgeschwindigkeit würde sich eine Verbindung nur aufgrund der Molekularbewegung in beide Trennsäulenrichtungen wandern und zu einer Peakverbreiterung beitragen. Die Axialdiffusion ist davon abhängig, wie lange sich die Probenmoleküle in der mobilen Phase befinden und somit von der Strömungsgeschwindigkeit [12].

$$B = \gamma \cdot D_m \quad \gamma: \text{Laborinthfaktor} \quad D_m: \text{Diffusionskoeffizient der mobilen Phase}$$

C - Term

Dieser Term beschreibt, mit welcher Geschwindigkeit sich Probenmoleküle zwischen der mobilen und stationären Phase verteilen. Mit steigender Strömungsgeschwindigkeit haben die Analyten immer weniger Zeit zur vollständigen Einstellung des Verteilungsgleichgewichtes zwischen der stationären und der mobilen Phase. Ein Teil der Probenmoleküle wird durch die mobile Phase schon vor der Gleichgewichtseinstellung weitertransportiert [12].

$$C = C_s + C_m \quad C_s = \frac{c \cdot d_f^2}{D_s} \quad C_m = \frac{\omega \cdot d_p^2}{D_m}$$

$$c: \text{Konstante} \quad d_f: \text{Filmdicke} \quad D_s: \text{Diffusionskoeffizient der stationären Phase} \quad \omega: \text{Säulenparameter}$$

Zusammengefasst ergibt sich eine Abhängigkeit der Trennstufenhöhe von der Strömungsgeschwindigkeit, mit der optimalen Fließgeschwindigkeit u_{opt} im Minimum des Graphen H (kleinste Trennstufenhöhe) (Abb. 8).

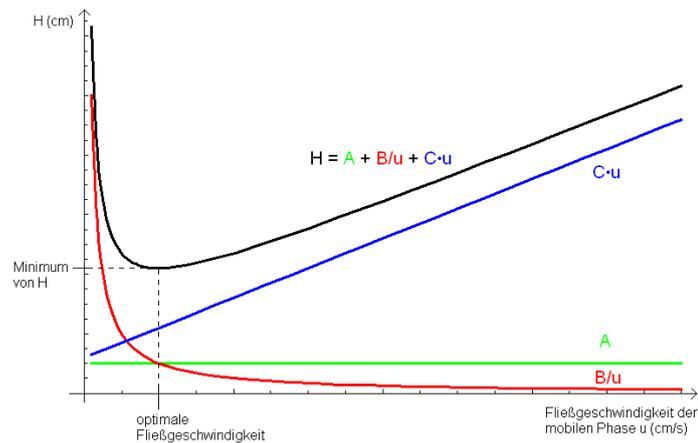


Abb. 8: van-Deemter-Kurve [13]

2.3.4 Arten der Chromatographie

Folgende Arten der Chromatographie waren für die Methodenentwicklung relevant:

Adsorptions-Chromatographie

Ein Adsorbens bildet die stationäre Phase bei der Adsorptions-Chromatographie. Beim Adsorptionsvorgang lagert sich ein, mit der mobilen Phase, herangetragenener Stoff an die Oberfläche der festen stationären Phase. Wiederholte Adsorptions – Desorptions Vorgänge an der Oberfläche der stationären Phase sind für die Auftrennung verantwortlich. Die auftretenden schwachen physikalischen Kräfte (van der Waals-Kräfte) oder die starken chemischen Anziehungskräfte (ionische Kräfte) bewirken diese Vorgänge. Eine Voraussetzung für die chromatographische Trennung ist, dass diese Grenzflächenreaktionen umkehrbar sind und bis zur Gleichgewichtseinstellung ablaufen.

Verteilungs-Chromatographie

Die Trennung der Substanzen bei der Verteilungs-Chromatographie beruht auf der unterschiedlichen Löslichkeit der Probesubstanzen in den beiden Phasen (stationär und mobil). Die Verteilung der Substanzen aus der Probe zwischen stationärer und

mobiler Phase folgt dem Nernstschen Verteilungsgesetz. Jede Substanz lässt sich durch eine temperaturabhängige Verteilungskonstante beschreiben. Nur solche Stoffgemische lassen sich verteilungschromatographisch trennen, deren Verteilungskoeffizienten sich deutlich unterscheiden.

Ionenaustausch-Chromatographie

Die stationäre Phase ist, bei der Ionenaustausch-Chromatographie, ionisch entgegengesetzt geladenen zur Probesubstanzen. Diese Technik wird fast ausschließlich für ionische oder ionisierbare Proben verwendet. Je stärker die Probeteilchen geladen sind, umso fester werden sie von der stationären Phase gebunden, umso länger ist ihre Retentionszeit. Als mobile Phasen verwendet man wässrige, abgepufferte Lösungen, bei denen der pH-Wert und die Polarität für die Steuerung der Retentionszeiten genutzt werden können.

Ausschluss-Chromatographie

Die stationäre Phase hat bei der Ausschluss-Chromatographie eine definierte Porengröße. Die Trennung beruht auf einem reinen "Siebeffekt" nach der Molekülgröße. Von der stationären Phase werden alle Probenmoleküle verzögert, die aufgrund ihrer Molekülgröße in die Poren passen. Alle größeren Moleküle werden ausgeschlossen und passieren die Trennsäule schneller.

2.3 Enantiomerentrennungsmethoden für Carvedilol

Zur Trennung der Enantiomere von (*R,S*)-Carvedilol werden hauptsächlich zwei Analysemethoden eingesetzt: Diese sind die Flüssigkeitschromatographie und die Elektrophorese [14,15,16,17]. Bei einigen Methoden wird der Analyt Carvedilol mit enantiomeren reinen Reagenzien derivatisiert, wie (+)-(*R*)-Phenylethylisocyanat [18], 2, 3, 4, 6-Tetra-*O*-Acetyl- β -*D*-Glucopyranosylisothiocyanat (GITC) [19,20], oder (+)-(*S*)-Naproxenchlorid [21] und anschließend mittels HPLC getrennt. Eine Trennung der underivatisierten Carvedilolenantiomere mittels Flüssigkeitschromatographie wurde bisher nur mit der Chiral-Stationäre-Phase (CSP) Chiracel OF [22] durchgeführt. Trennungen der Carvedilolenantiomere durch Kapillarelektrophorese wurden bisher mit Cyclodextrin- [14,16] oder Polyacrylamid belegte Kapillaren durchgeführt.

3 Praktischer Teil

3.1 Materialien und Geräte

3.1.1 Chemikalien

Carvedilol, sowohl in racematischer als auch in enantiomerenreiner Form, und seine Metaboliten stammten von Boehringer Mannheim (Mannheim, Deutschland). Die Lösungsmittel LiChrosolv Methanol gradient grade (MeOH), LiChrosolv Acetonitril gradient grade (MeCN) und Chloroform p.a (Cl₃CH) waren von Merck (Darmstadt, Deutschland). Die Essigsäure wurde bezogen von J.T.Baker (Griesheim, Deutschland). Triethylamin wurde von Fluka (Schweiz) geliefert. Doppeltdestilliertes Wasser (H₂O) wurde mit einer UHQ-Wasseraufbereitungsanlage von der Firma Veolia Systems (Wien, Österreich) hergestellt. Der interne Standard Propranolol wurde von Prof. Lindner zur Verfügung gestellt. Citronensäure - Monohydrat p. a. und Ameisensäure p. a. wurden von Merck erworben.

3.1.2 Geräte und apparativer Aufbau

Für die Probenvorbereitung wurden der Minischüttler M1 von IKA (Staufen, Deutschland) und die Zentrifuge Biofuge 28RS von Heraeus (Deutschland) verwendet.

Die Trennung der Enantiomere von Carvedilol wurde mit einer zweidimensionalen Flüssigkeits-Chromatographie durchgeführt. Die verwendete Trennsäulenschaltanordnung ist in der Abbildung 9 dargestellt.

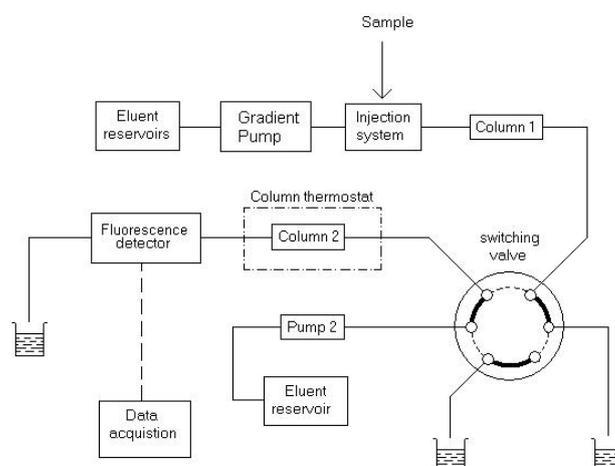


Abb.9: schematische Darstellung des chromatographischen Systems

In der 1. Dimension bestand das chromatographische System aus einem Merck-Hitachi Autosampler AS-4000A und der Gradientenpumpe Merck-Hitachi L-6200 (Deutschland).

Für die Vortrennung (Säule 1) wurde eine rostfreie Stahlsäule (35 x 4 mm I.D.) gefüllt mit LiChrosorb RP8 (10 µm), bzw. eine LiChrospher® RP4 ADS-Trennsäule (25 µm; 25 x 4 mm I.D.) von Merck verwendet.

Die verwendete Schalteinheit ELV 7000 stammte ebenfalls von Merck. Mithilfe eines Sechswegventils konnten Fraktionen von der ersten Trennsäule auf die zweite Trennsäule transferiert werden (heart-cut).

Die Eluentenförderung in der 2. Dimension wurde von einer Merck-Hitachi Pumpe L-6000 durchgeführt. Für die Enantiomerentrennung wurde die Tecoplanin-Trennsäule CSP-TE-SP-100 (250 x 4,5 mm I.D.) von Prof. F. Gasparini (Universita „La Sapienza“, Rom, Italien) verwendet.

Die Temperaturregelung der Trennsäule erfolgte mittels eines Säulenthmostats der Firma Thermotechnik Products (Langenzersdorf, Österreich).

Die Signaldetektion wurde mit dem Merck-Hitachi Fluoreszenz Detektor F-1080 durchgeführt. Der JACSO Fluoreszenz Detektor FP-920 (Tokyo, Japan) und der Detektor Merck Hitachi L-4200 UV-VIS wurden außerdem noch für die Methodenentwicklung verwendet.

Zur Datenerfassung und Datenauswertung wurde ein Nelson Interface Serie 760 mit der Chromatographiesoftware von Nelson Analytical (Manchester, USA) eingesetzt.

3.2 Trennsäulenmaterialien

3.2.1 LiChrospher® ADS

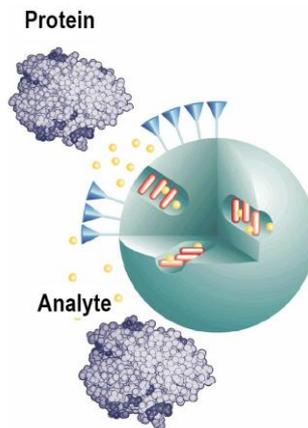


Abb.10: ADS-Material [23]

Die, für die Trennung in der 1. Dimension, verwendete LiChrospher® ADS-Trennsäule (Alkyl-Diol Silica) gehört zur Gruppe der Restricted Access Material (RAM) und ist ein speziell für die Abtrennung von Analyten aus einer biologischen Matrix entwickeltes Sorbent. Das Trennungsprinzip für RAM-Trennsäulen beruht auf einer Fraktionierung der Probe in Analyt- und Matrixfraktion durch die sterische Ausschluss-Chromatographie der Makromoleküle und einer reversed-phase Trennung der kleinen Moleküle, welche in die Poren diffundieren können (Abb. 10).

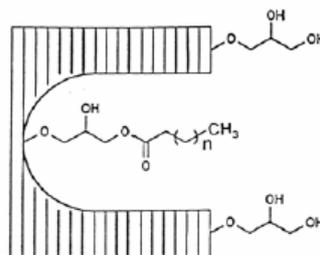


Abb.11: funktionelle Gruppen an der ADS-Oberfläche [24]

An der Außenseite der kugelförmigen hydrophilen Sorbentpartikel sind polare Diol-Gruppen gebunden. Makromoleküle wie Proteine zeigen keine oder nur eine geringe Wechselwirkung mit der polaren Oberfläche und werden somit unverzögert eluiert. Alkylketten an der Innenseite der porösen Partikeln generieren eine hydrophobe Oberfläche, die nur für niedermolekulare Analyten zugänglich ist (Abb. 11).

3.2.2 Teicoplanin

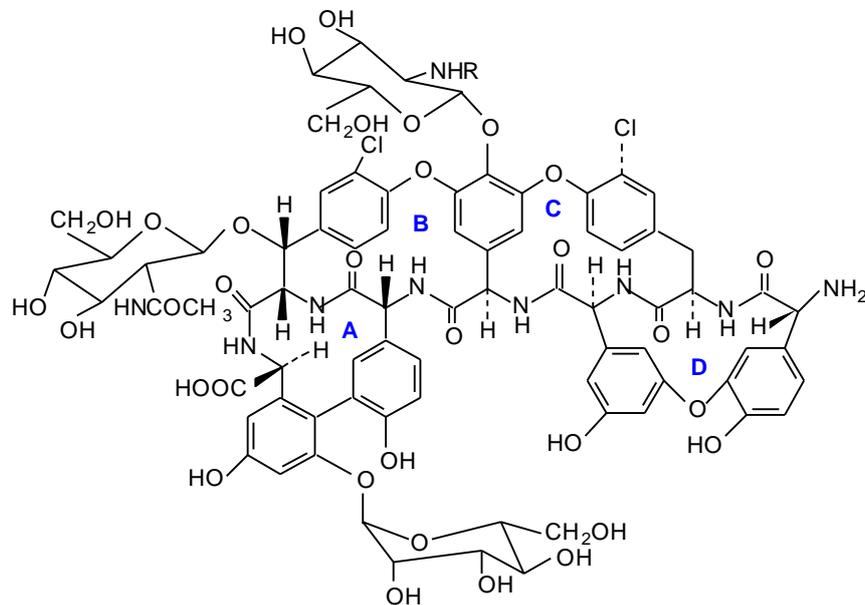


Abb.12: Teicoplanin [25]

Das zur Enantiomerentrennung in der 2. Dimension verwendete Teicoplanin-Säulenmaterial (TE) ist ein natürliches Glykopeptidantibiotikum, das über eine komplexe Molekularstruktur verfügt. Das Rückgrat ist eine Peptidkette, die mit aromatischen Gruppen ein System aus vier Ringen A-D bildet, das von polaren und ionisierbaren Gruppen sowie Zuckereinheiten umgeben ist (Abb. 12). Das zyklische Peptidrückgrat hat eine steife, schalenförmige Form mit einer definierten stereochemischen Anordnung. Es eignet sich gut für die enantioselektive Trennung. Das Teicoplanin mit seinen vielen Modifikationen lässt sich leicht an eine feste Matrix binden und wird häufig als Chiral-Stationäre-Phase (CSP) in der HPLC eingesetzt [26,27].

4 Methodenentwicklung

4.1 Säulenschaltmethode mit „on-column“

Deproteinierung

4.1.1 Eluenten- und Trennsäulenauswahl

Zur Trennung der Enantiomere wurde eine Teicoplanin-Trennsäule verwendet. Bei einer Direktinjektion von 20 μL (R,S)-Carvedilol auf die Trennsäule wurde eine Auflösung von $R = 1,42$ erzielt (Abb. 13).

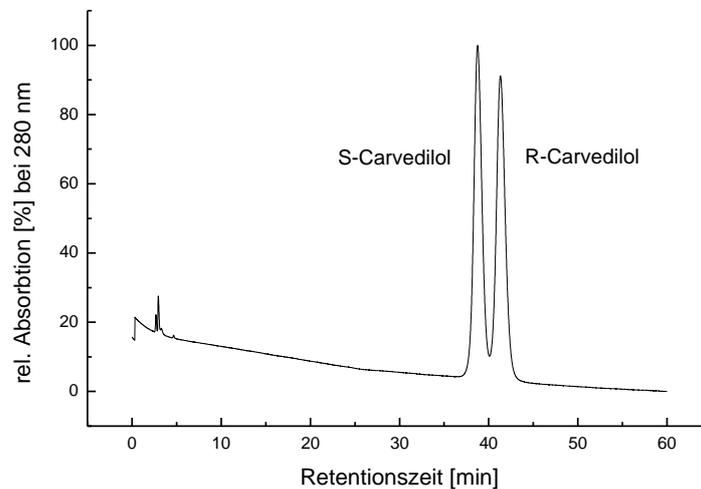


Abb. 13: Enantiomerentrennung auf einer neuer Teicoplanin-Trennsäule

Chromatographische Bedingungen:

Probe: (R,S)-Carvedilol (2,85 $\mu\text{g}/\text{ml}$ in Methanol)

Dosiervolumen: 20 μl

Fließgeschwindigkeit: $u = 1,0 \text{ mL}/\text{min}$

Trennsäule: CSP-TE-SP-100 (250 x 4,5 mm I.D.)

Trennsäulentemperatur: 25 $^{\circ}\text{C}$

Eluent: MeOH/MeCN (70:30, v/v) + 0,05 % Triethylammoniumacetat pH 6,5

Detektor: Merck-Hitachi L-4200 UV-VIS bei 280 nm

Zum Schutz bzw. zur Aufrechterhaltung der Effizienz der Trenneigenschaften der enantioselektiven Teicoplanin-Trennsäule war es notwendig die Plasmabestandteile mit großem Molekulargewicht (wie Proteine und Lipoproteine) und die meisten Lipide sowie andere störenden Komponenten aus der Matrix zu entfernen.

„On-Line“ Deproteinierung mit „Restricted-Access Medium“ (RAM) ist eine hoch entwickelte Methode für die Abtrennung von Proteinen mit einem Molekulargewicht > 15 kDalton von den Begleitkomponenten während des chromatographischen Trennprozesses [28,29,30]. Die Plasmaproben können direkt in das Trennungssystem injiziert werden ohne das eine vorhergehende Behandlung der Proben notwendig wäre. Wegen der hydrophilen Oberfläche werden die Proteine kaum zurückgehalten und ein Eindringen in die Poren der Festphase ist wegen ihrer Größe kaum möglich. Die kleinen Analyten hingegen dringen in die Poren der Festphase ein und werden so unter reversed-phase Bedingungen zurückgehalten. Die Erfahrungen, die am Institut bei der Bestimmung des polaren (*R*)- und (*S*)-Antenolol mit dieser ADS-Trennsäule gemacht wurden [31,32], dienten als Ausgangspunkt für die ersten Versuche zur Vortrennung in der 1. Dimension.

Für die ersten Versuche wurde ein Gradientenprogramm mit den Eluenten Wasser und Methanol gewählt. Da die Elutionskraft von Methanol zu gering war, wurde dieses durch Acetonitril ersetzt.

Versuche mit unterschiedlichen Fließgeschwindigkeiten (0,5-2,0 mL/min) zeigten bei einer Fließgeschwindigkeit von 1,0 mL/min die beste Peakform und Basislinie.

Es standen zwei RAM-Trennsäulen zur Auswahl, LiChrospher® RP4 ADS-Trennsäule und LiChrospher® RP18 ADS-Trennsäule. Der Unterschied zwischen den beiden Trennsäulen war nicht signifikant.

Eine akzeptable Peakbreite in der 1. Dimension wurde mit einem Gradienten von 90 % Acetonitril erreicht. Ein Chromatogramm von (*R,S*)-Carvedilol in der ersten Dimension mit einer Peakbreite $w = 2,0$ min zeigt Abb. 14.

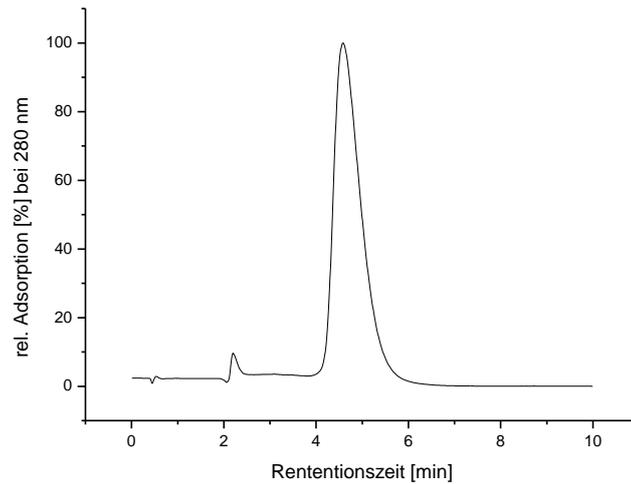


Abb. 14: Retention von (R,S)-Carvedilol auf LiChrospher®ADS

Chromatographische Bedingungen für die 1. Dimension:

Probe: (R,S)-Carvedilol (2,85 µg/ml in Methanol)

Dosierolumen: 20 µl

Trennsäule: LiChrospher® RP4 ADS

Eluent A: Tris-Puffer 0,01 M pH 5,0

Eluent B: MeCN

Detektor: Merck-Hitachi L-4200 UV-VIS, UV-Absorption 280 nm

Zeit (min)	B [%]	Fluss (ml/min) Pumpe 1
0,0	0	1,0
0,1	90	1,0
3,0	90	1,0
5,0	90	1,0
5,1	90	1,0
5,4	0	1,0
5,7	0	1,0
10,0	0	1,0

Die Trennung einer geschalteten (R,S)-Carvedilolfraktion auf die Tecoplanin-Trennsäule zeigt Abb. 15. Es wurde eine Auflösung von $R = 1,34$ für beide Enantiomere erzielt.

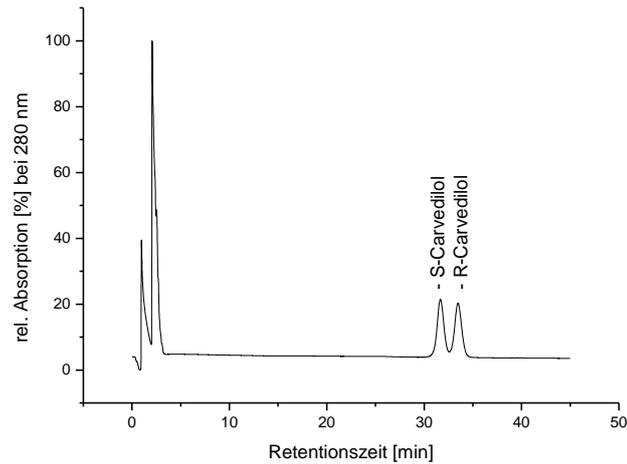


Abb. 15: Trennung einer geschalteten (R,S)-Carvedilolfraktion

Chromatographische Bedingungen:

1. Dimension

Probe: (R,S)-Carvedilol 2,85 µg/ml in Methanol

Dosiervolumen: 20 µl

Trennsäule: LiChrospher® RP4 ADS

Eluenten:

A: Tris-Puffer 0,01 M pH 5,0

B: MeCN

2. Dimension

Trennsäule: CSP-TE-SP-100

Temperatur: 25 °C

Eluent: MeOH/MeCN (70:30, v/v) + 0,05 % Triethylammoniumacetat pH 6,5

Fließgeschwindigkeit: $u = 1,0$ mL/min

Detektor: Merck-Hitachi L-4200 UV-VIS, UV-Absorption 280 nm

Zeit (min)	B [%]	Ereignis	Fluss (ml/min) Pumpe 1
0,0	0		1,0
0,1	90		1,0
3,0	90	Kopplung Säule 1+2	1,0
5,0	90		1,0
5,1	90		0,0
5,4	90	Entkopplung Säule 1+2	0,0
5,7	0	Start Datenerfassung und Pumpe2	1,0

Die Verwendung von 0,05 M Natriumacetat pH 5,0 (NaAc) anstelle von 0,01 M Tris(hydroxymethyl)-aminomethan pH 5,0 (Tris-Puffer) in der 1. Dimension zeigte keine signifikanten Unterschiede (Abb. 16) in der Peakform, allerdings kam es zu einer geringfügigen Verringerung der Retentionszeit.

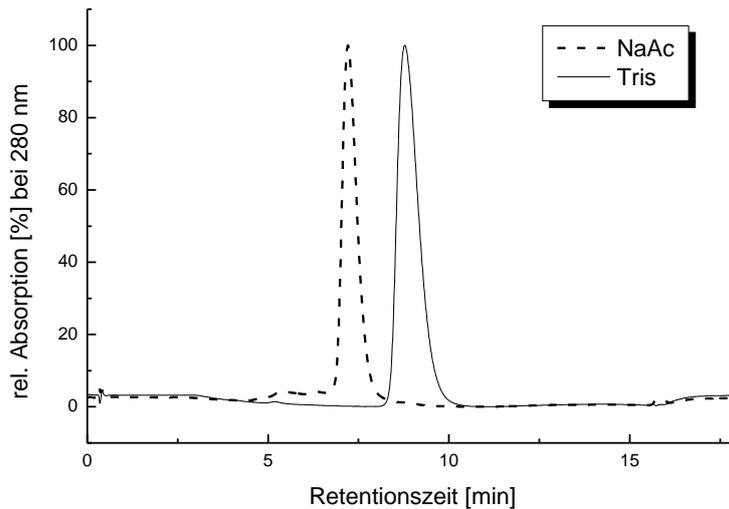


Abb. 16: Retention von Carvedilol auf LiChrospher® ADS mit NaAc oder Tris im Eluent A

Bei der Verwendung von NaAc in der 1. Dimension und anschließendem Säulenschalten auf die Tecoplanin-Trennsäule wurde keine Enantiomerentrennung in der 2. Dimension mehr erzielt. Mit Tris-Puffer als Eluent in der 1. Dimension wurde dagegen in der 2. Dimension eine Auflösung von $R = 1,31$ erzielt (Abb. 17).

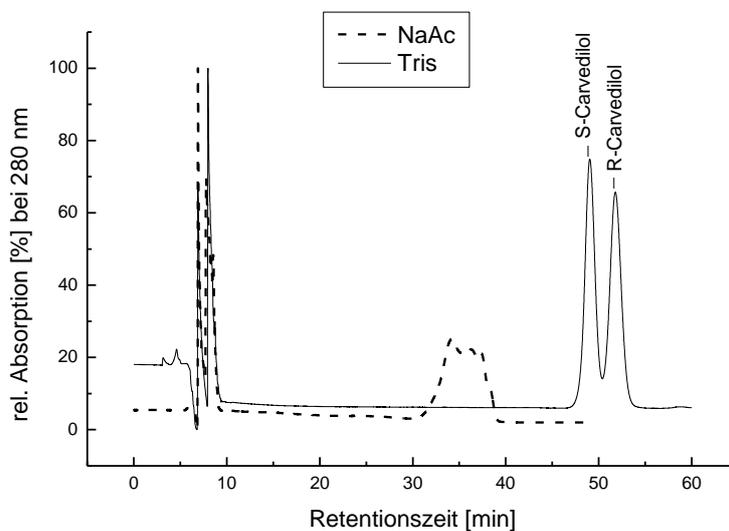


Abb. 17: Trennung von (R,S)-Carvedilol auf einer Tecoplanin - Trennsäule nach Säulenschaltung mit NaAc oder Tris im Eluent in der 1. Dimension

Die Analyse von verdünntem Plasma mit einer LiChrospher® ADS Trennsäule wurde unter folgenden Bedingungen durchgeführt:

1. Dimension

Probe: (R,S)-Carvedilol 285,77 ng/mL in Plasma

Dosierolumen: 20 µL

Trennsäule: LiChrospher® RP4 ADS

Eluenten:

A: Tris-Puffer 0,01 M pH 5,0

B: MeCN

C: MeOH

2. Dimension

Trennsäule: CSP-TE-SP-100

Temperatur: 25 °C

Eluent: MeOH/MeCN (70:30, v/v) + 0,05 % Triethylammoniumacetat pH 6,5

Fließgeschwindigkeit: $u = 1,0$ mL/min

Detektor: Merck-Hitachi L-4200 UV-VIS, UV-Absorption 280 nm

Zeit (min)	B [%]	C [%]	Fluss (ml/min) Pumpe 1	Ereignis
0,0	0	0	1,0	
10,0	0	0	1,0	
13,0	0	10	1,0	
18,0	0	10	1,0	
18,1	90	0	1,0	
20,0	90	0	1,0	Kopplung Säule 1+2
23,0	90	0	1,0	
23,1	90	0	0,0	
23,4	90	0	0,0	Entkopplung Säule 1+2
23,7	0	0	1,0	Start der Datenerfassung und Pumpe 2
30,0	0	0	1,0	
30,1	0	0	0,0	
80,0	0	0	0,0	Stopp Pumpe 2
80,1	0	0	1,0	Ende des Zyklus

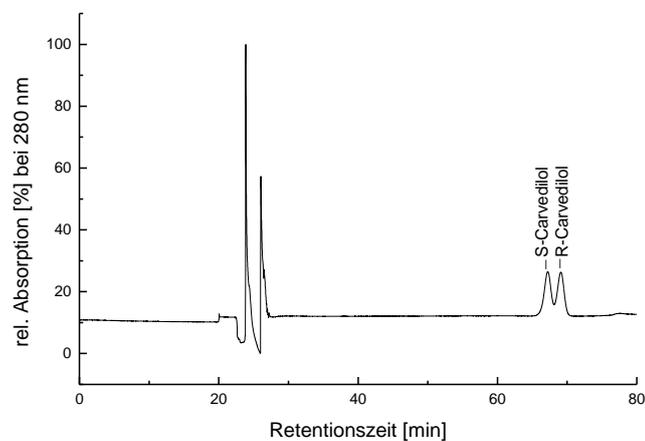
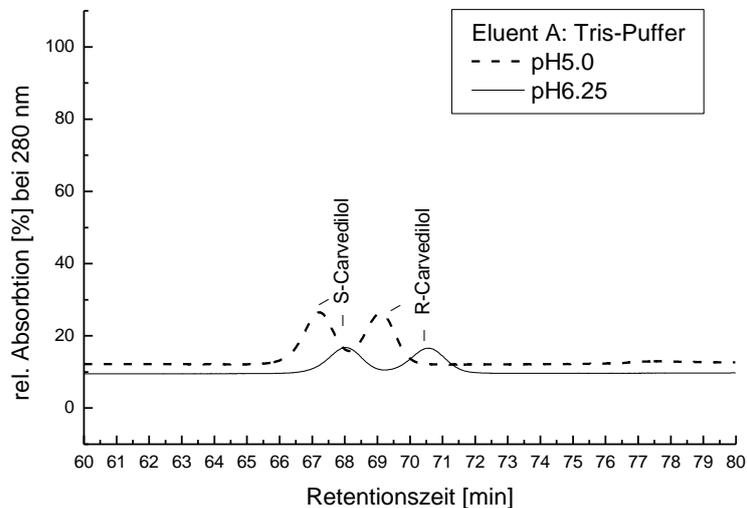


Abb. 18: Trennung einer geschalteten Fraktion von Plasma in der 2. Dimension

Durch eine Vergrößerung des Schaltintervalls auf 3 min kam es zu einer Verringerung der Auflösung in der 2. Dimension auf $R = 1,02$ (Abb. 18).

Um eine möglichst kleine Peakbreite in der 1. Dimension zu erzielen und damit das Transfervolumen möglichst klein zu halten, wurde die Gradientensteilheit erhöht. Eine Erhöhung des pH-Wertes des Tris-Puffers von 5,0 auf 6,5 in der 1. Dimension (Eluent A) hatte keinen Einfluss auf die Peakbreite von (R,S)-Carvedilol. während des Schaltintervalls.

Dennoch wurde eine signifikante Verbesserung der Trennleistung auf der enantioselektiven Teicoplanin-Trennsäule beobachtet. Die Auflösung verbesserte sich von $R = 1,02$ auf $R = 1,26$ (Abb. 19).



1

Abb.19: Auswirkung des pH-Wertes von Eluenten A auf die Auflösung in der 2. Dimension

In der Folge wurde anstelle einer UV-Detektion eine Fluoreszenzdetektion gewählt. Als Anregungswellenlänge für den Fluoreszenz Detektor FP-920 von der Firma JASCO wurde 285 nm, als Emissionswellenlänge 340 nm gewählt.

Nach der Analyse von einigen Plasmaproben kam es aber zu einer deutlichen Verschlechterung der Trennleistung auf der Tecoplanin-Trennsäule (Abb. 20).

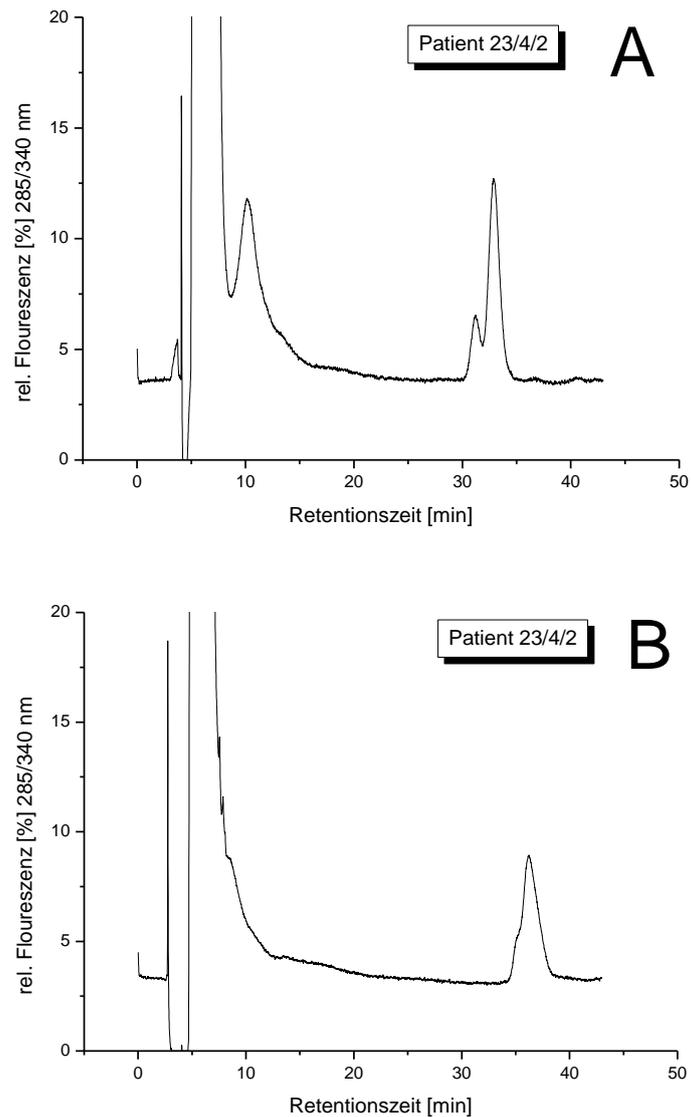


Abb. 20: Messung einer Patientenprobe zu Beginn einer Analysenreihe(A) und am Ende der Analysenreihe(B)

Chromatographische Bedingungen:

1. Dimension

Probe: Patientenprobe 23/4/2

Dosiervolumen: 50 μ L

Trennsäule: LiChrospher® RP4 ADS

Eluenten:

A: H₂O + 0,05 % Triethylammoniumacetat pH 4,0

B: MeCN/H₂O (70/30, v/v) + 0,05 % Triethylammoniumacetat pH 5,0

C: 10 % MeOH + 0,05 % Triethylammoniumacetat pH 4,0

2. Dimension

Trennsäule: CSP-TE-SP-100

Temperatur: 25 °C

Eluent: MeOH/MeCN (70:30, v/v) + 0,05 % Triethylammoniumacetat pH 5,0

Fließgeschwindigkeit: $u = 1,0$ mL/min

Detektor: JACSO Fluoreszenz Detektor FP-920, 285/340 nm

Zeit (min)	B [%]	C [%]	Fluss (ml/min) Pumpe 1	Ereignis
0,0	0	0	1,0	
10,0	0	0	1,0	
13,0	0	100	1,0	
16,0	0	100	1,0	
16,1	0	100	1,0	
16,2	100	0	1,0	
17,0	100	0	1,0	Kopplung Säule 1+2
20,0	100	0	1,0	Entkopplung Säule 1+2
20,1	100	0	0,0	Start Datenerfassung
20,4	100	0	0,0	
20,7	100	0	1,0	Start Pumpe 2
25,0	100	0	1,0	
28,0	0	0	1,0	
80,0	0	0	1,0	Stopp Pumpe 2
80,1	0	0	0,0	Ende des Zyklus

Die Trennungseffizienz der enantioselektive Trennsäule nahm stetig ab und eine zeitintensive Regeneration der Trennsäule wurde notwendig. Die Vermutung lag nahe, dass während des Schaltintervalls Lipide bzw. kleine Proteine auf die Teicoplanin-Trennsäule gelangten und dort die enantioselektiven Zentren blockierten.

Die Säulenschaltanordnung wurde durch ein zweites Säulenschaltventil erweitert, wodurch die Trennsäule in der 1. Dimension in umgekehrter Richtung gespült werden konnte (Abb. 21 a-d). Dies ermöglichte einerseits eine Reinigung der Trennsäule entgegen der Fließrichtung (back-flush) und zusätzlich wurde eine Verringerung der Peakbreite während des Transferzyklus angestrebt. Die dadurch erzielten Effekte waren allerdings sehr gering.

Stabile Analysebedingungen konnten nur durch eine Reduktion der dosierten Plasmamenge um einen Faktor 20 erzielt werden. Unter diesen Bedingungen erzielte Messwerte lagen aber unter der Bestimmungsgrenze der Methode.

Die Abbildungen 21a-d zeigen die schematische Darstellung des Säulenschaltsystems mit 2 Sechswegschaltventilen.

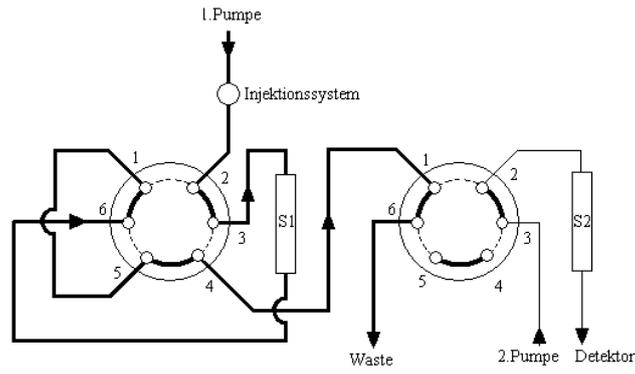


Abb. 21a: Fließrichtung in der 1. Dimension nach Dosierung der Probe

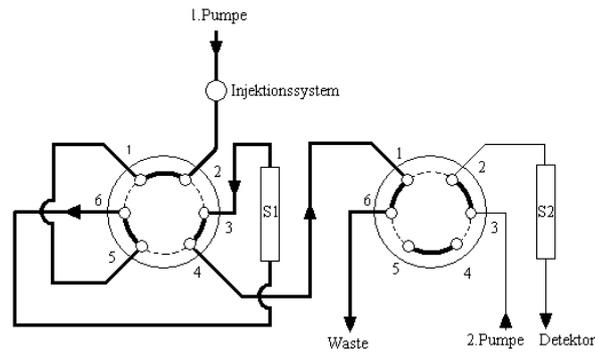


Abb. 21b: Umkehr der Fließrichtung in der 1. Dimension

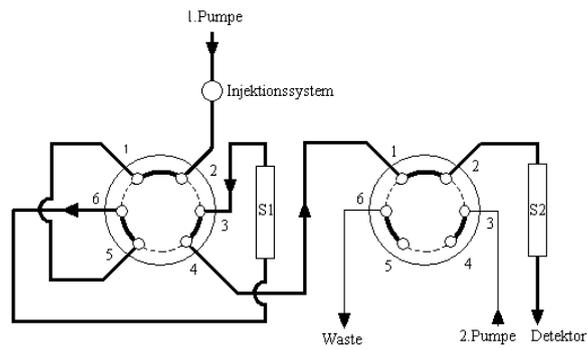


Abb. 21c: Kopplung Säule 1+2

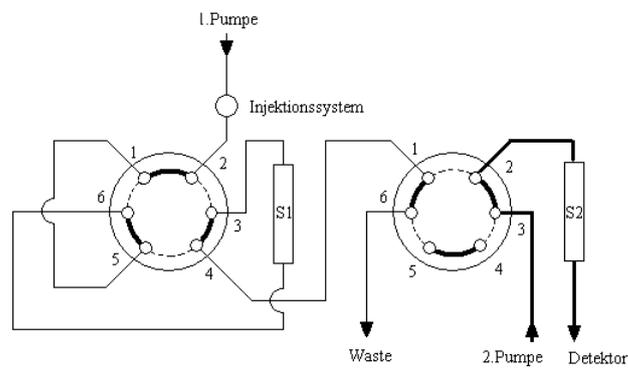


Abb. 21d: Entkopplung Säule 1+2

Trotz massivster Anstrengungen gelang es nicht, das Problem in den Griff zu bekommen. Die Ausarbeitung einer anderen Trennmethode war nötig. Für die Probenvorbereitung wurde daher eine Flüssig-Flüssig Extraktionsmethode entwickelt. Die Trennleistung der enantioselektiven Teicoplanin-Trennsäule wurde in einer aufwendigen und zeitintensiven Reinigungsprozedur teilweise wiederhergestellt. Dazu wurde die Teicoplanin-Trennsäule über Nacht mit dem Eluent Methanol-Acetonitril-Triethylammoniumacetat (70:30:0,05; v/v/w) und anschließend mit 1-Propanol bei einem Fluss von 0,1 mL/min 2 Tage lang gespült.

4.1.2 Blindwert

Wenn man bei einer Leerwertmessung (Injektion einer Lösung ohne Analyten) eine Detektion von Probenkomponenten durch auftretende Peaks im Chromatogramm feststellt, spricht man von Blindwert. Bei den Messungen mit (*R,S*)-Carvedilol Standards wurde sowohl in der 1. als auch 2. Dimension ein Blindwert gefunden.

Es wurde versucht durch Gegenpaarionenlösungen mögliche Ionenaustauschereffekte auf der LiChrospher® ADS-Trennsäule, die als Ursache für die Entstehung eines Blindwertes angesehen wurde, zu unterdrücken.

Es wurden folgende Salz- und Ionenpaarlösungen verwendet: je 2 mM Tetrabutylammoniumhydrosulfat, Tetrapentylammoniumbromid, Tetramethylammoniumchlorid und eine 0,05 M Natriumacetat (pH 5,0) + 0,1 M Kaliumchlorid-Lösung. Versuche bei unterschiedlichen pH-Werten zeigten keine oder nur eine geringe Unterdrückung des Blindwertes.

Letztlich wurde das Injektionssystem als Quelle der Verunreinigung identifiziert. Eine Reinigung des Injektionssystems reduzierte den Blindwert bei der Dosierung von Plasma erheblich, bei einer Dosierung mit Wasser wurde fast kein Blindwert mehr festgestellt.

Zusätzlich wurde die Trennsäule in der 1. Dimension nach jedem Analysenlauf im Back-Flush Verfahren gespült.

Eine Reinigung der ADS-Trennsäule mit Methanol bzw. einer Mischung von Propanol-Acetonitril und einer wässrigen Lösung von Ameisensäure (pH 2,5) wurde nach jedem Analysengang durchgeführt.

Die Verwendung von Stahlkapillaren anstelle von Peekkapillaren, Ersatz des Rotorseals des Autosamplers und Ansäuern der Plasmaproben mit Ameisensäure (pH 2,5) führte zu einer dauerhaften Verringerung des Blindwertes.

4.1.3 Metaboliten

Bei der oralen Administration erfolgt durch den Stoffwechsel im Organismus eine Metabolisierung von Carvedilol ("first-pass"-Effekt). Die Struktur der Metaboliten ist in Kapitel 2.2 Abb. 2 angegeben.

Wie aus dem Chromatogramm (Abb. 22) ersichtlich ist, liegen auf der LiChrospher® ADS-Trennsäule die Retentionszeiten der einzelnen Metaboliten im Elutionsintervall von (*R,S*)-Carvedilol im selben Bereich. Nach Transfer der Fraktion von Carvedilol und der Metaboliten auf die enantioselektive Teicoplanin-Trennsäule wurde folgende Trennung durchgeführt (Abb. 23).

Es erfolgte eine Auftrennung der Metaboliten untereinander als auch von (*R,S*)-Carvedilol, sodass eine Bestimmung der Metaboliten grundsätzlich möglich wäre. Dies wurde aber im Rahmen der Untersuchung aus zeitlichen Gründen nicht durchgeführt.

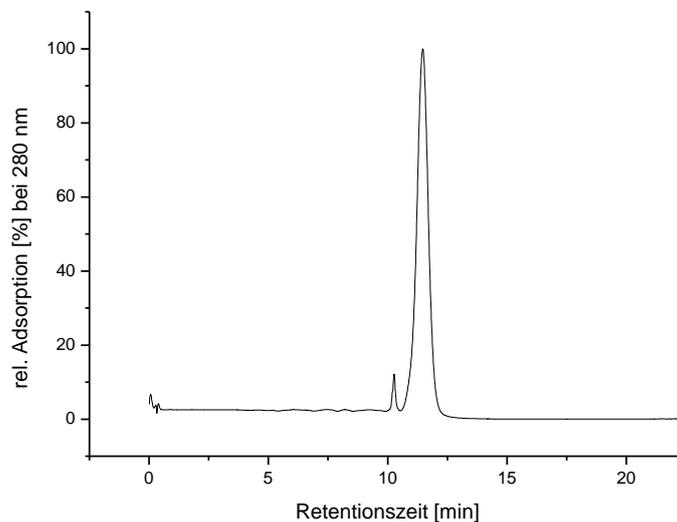


Abb. 22: Chromatogramm von (*R,S*)-Carvedilol, Metaboliten M2, M4 und M14 in der 1. Dimension

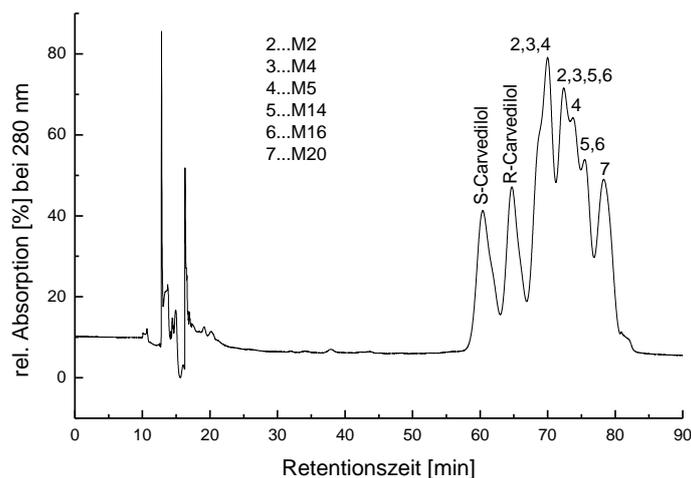


Abb. 23: Chromatogramm von (R,S)-Carvedilol und seiner Metaboliten in der 2. Dimension

Chromatographische Bedingungen:

1. Dimension

Dosiervolumen: 20 μ L Mischstandardlösung

Trennsäule: LiChrospher® RP4 ADS

Eluenten

A: Tris-Puffer 0,01 M pH 6,25

B: MeCN

C: MeOH

2. Dimension

Trennsäule: CSP-TE-SP-100

Temperatur: 25 °C

Eluent: MeOH/MeCN (70:30, v/v) + 0,05 % Triethylammoniumacetat pH 5,0

Fließgeschwindigkeit: $u = 1,0$ mL/min

Detektor: Merck-Hitachi L-4200 UV-VIS bei 280 nm

Zeit (min)	B [%]	C [%]	Fluß (ml/min) Pumpe 1	Ereignis
0,0	0	0	1,0	
1,0	0	0	1,0	
4,0	0	10	1,0	
9,0	0	10	1,0	
9,1	90	0	1,0	
10,0	90	0	1,0	Kopplung Säule 1+2
13,0	90	0	1,0	
13,1	90	0	0,0	
13,4	90	0	0,0	Entkopplung Säule 1+2
13,7	0	0	1,0	Start Pumpe 2
20,0	0	0	1,0	
20,1	0	0	0,0	
80,0	0	0	0,0	Stop Pumpe 2
80,1	0	0	1,0	Ende des Zyklus

4.2 Flüssig-Flüssig Extraktion mit Säulenschalten

4.2.1 Flüssig-Flüssig Extraktion

Eine häufig verwendete Methode zur Extraktion von (*R*)- und (*S*)-Carvedilol aus biologischen Proben ist die Flüssig-Flüssig Extraktion. Diethylether wird oft wegen seiner hohen Extraktionsausbeuten verwendet [6,14,16,19]. Die Zugabe eines internen Standards ist für eine genaue und richtige Quantifizierung von Vorteil.

Bei der Bestimmung der Extraktionsausbeute von Carvedilol aus Plasma wurde Plasma 5 min bei 15000 rpm zentrifugiert, dann wurden 500 μ L des Überstandes entnommen und mit 500 μ L Wasser, das den internen Standard Propranolol enthielt, verdünnt. Nach 5 min Schütteln mit dem Minischüttler M1 IKA wurden 500 μ L verdünntes Plasma mit 500 μ L organischem Lösungsmittel extrahiert (15 min bei 1300 min^{-1} geschüttelt und 20 min bei 15000 rpm zentrifugiert). Die organische Phase wurde mit 500 μ L 0,1 M Citronensäure extrahiert (15 min bei 1300 min^{-1} geschüttelt und 20 min bei 15000 rpm zentrifugiert). Ein aliquoter Anteil (50 μ L) wurde in das HPLC-System injiziert.

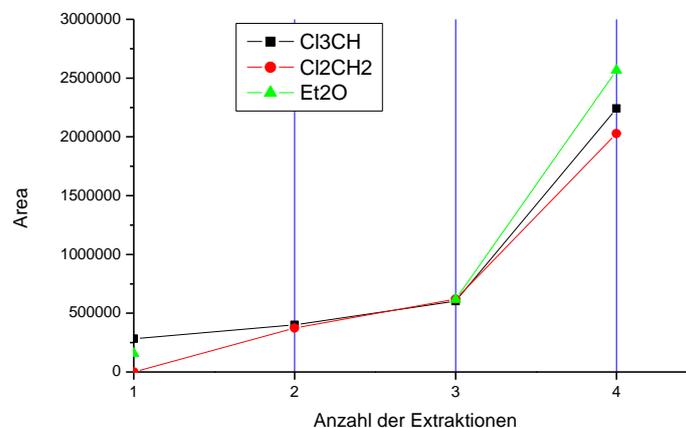


Abb. 24: Effizienz der Extraktion von (*R,S*)-Carvedilol aus Plasma mit unterschiedlichen Extraktionsmitteln

Die Verwendung von Trichlormethan, Dichlormethan und Diethylether bei der Extraktion von (*R,S*)-Carvedilol aus Plasma ergab vergleichbare Ausbeuten (Abb. 24). Wegen der höheren spezifischen Dichte und der geringeren Flüchtigkeit wurde Trichlormethan für die Extraktion der Proben verwendet.

Die Wiederfindung nach der Extraktion von Plasma zeigte eine starke Abhängigkeit vom pH-Wert. Bei einem pH-Wert von 3,0 ist die relative Wiederfindung um einen Faktor 10 größer als bei einem pH-Wert von 4,0 (Abb. 25).

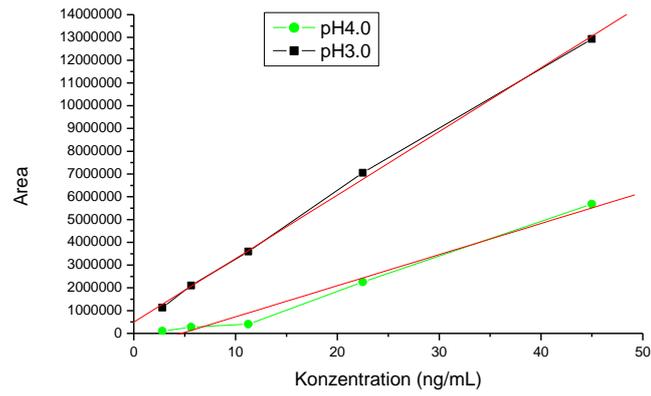


Abb. 25: Wiederfindung von (R,S)-Carvedilol nach Extraktion von Plasma bei pH 3,0 und pH4,0

Bei einem pH-Wert von 3,0 lag die Wiederfindung dieser Methode für (S)-Carvedilol zwischen 96,2 und 102,3 % und für (R)-Carvedilol zwischen 96,1 und 103,1 % (n = 5).

4.2.2 Chromatographie

Durch Alterung der enantioselektive Teicoplanin-Trennsäule konnte nur mehr eine Auflösung von $R < 0,80$ erreicht werden. Die Verringerung der Trennsäulentemperatur von 25 °C auf 5 °C erhöhte die Auflösung auf $R = 1,46$. Als Nebeneffekt wurde auch eine Erhöhung der Fluoreszenzausbeute für die beiden Analyten festgestellt (Abb. 26).

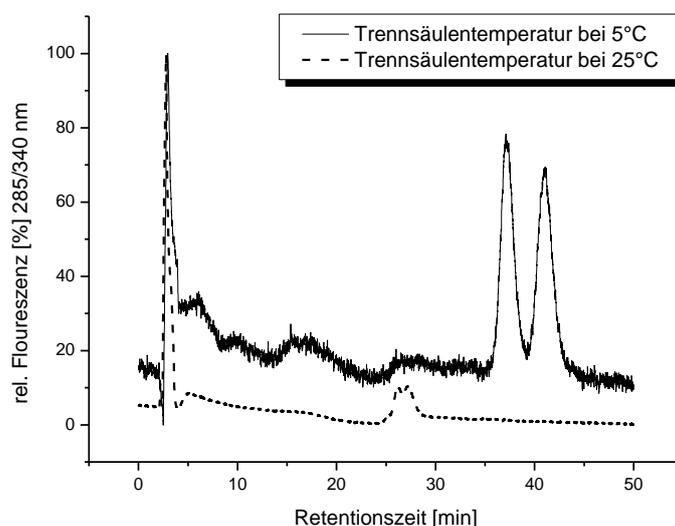


Abb. 26: Einfluss der Temperatur auf die Auflösung und die Detektionsempfindlichkeit von (R,S)-Carvedilol

Chromatographische Bedingungen:

Probe: (R,S)-Carvedilol 11,25 ng/mL in Wasser pH 3,0

Dosiervolumen: 50 μ L

Isokratische Pumpe: Merck-Hitachi L-6000 A

Trennsäule: CSP-TE-SP-100

Temperatur: 25 ° bzw. 5 °C

Eluent: MeOH/MeCN (70:30, v/v) + 0,05 % Triethylammoniumacetat pH 5,0

Fließgeschwindigkeit: $u = 1,0$ mL/min

Detektor: JACSO Fluoreszenz Detektor FP-920, 285/340 nm

Die Umstellung des Detektors von der Anregungswellenlänge $\lambda_{\text{ex}} = 285$ nm auf $\lambda_{\text{ex}} = 247$ nm und der Emissionswellenlänge von $\lambda_{\text{em}} = 340$ nm auf $\lambda_{\text{em}} = 344$ nm bracht eine Verdoppelung der Empfindlichkeit [33].

Die enantioselektive Trennsäule wurde durch eine LiChrosorb RP8 Vorsäule geschützt. Um einen maximalen Schutz für die analytische Trennsäule zu gewährleisten, wurde diese Vorsäule nach jeweils 50 Analysen ersetzt. Durch diese Maßnahme wurden reproduzierbare Trennbedingungen erreicht. Eine Automatisierung der Analysen wurde dadurch möglich.

Durch einen technischen Defekt des verwendeten JACSO Fluoreszenzdetektors FP-920 wurde ein Austausch notwendig. Bei dem neuen Detektor Merck-Hitachi Fluoreszenzdetektors F-1080 wurden dieselbe Anregungswellenlänge $\lambda_{\text{ex}} = 247 \text{ nm}$ und Emissionswellenlänge $\lambda_{\text{em}} = 344 \text{ nm}$ verwendet.

Die Probenanalysen erfolgten mit den unten angeführten Parametern. Die Retentionszeit von (*R,S*)-Carvedilol in der 1. Dimension wurde nach jedem Vorsäulenwechsel überprüft und das Schaltintervall an die Retentionszeit angepasst.

Geräte und chromatographische Bedingungen für die Analyse von (*R,S*)-Carvedilol in Plasma nach einer Flüssig-Flüssig-Extraktion (Abb. 9):

1. Dimension

Dosiervolumen: 50 μL

Autosampler: Merck-Hitachi AS-4000A

Gradientenpumpe: Merck-Hitachi L-6200

Trennsäule I: RP8 (10 μm) 35 x 4 mm I.D

Eluenten:

A: H_2O +0,05 % Triethylammoniumacetat pH 4,0

B: MeOH/MeCN (70:30, v/v) + 0,05 % Triethylammoniumacetat pH 5,0

C: MeCN

Schaltventil: ELV 7000

2. Dimension

Isokratische Pumpe: Merck-Hitachi L-6000 A

Fließgeschwindigkeit: $u = 1,0 \text{ mL/min}$

Trennsäule: CSP-TE-SP-100 (250 x 4,5 mm I.D.)

Trennsäulenthmostat: Thermotechnik Products

Trennsäulentemperatur: 5 $^{\circ}\text{C}$

Eluenten: MeOH/MeCN (70:30, v/v) + 0,05 % Triethylammoniumacetat pH 5,0

Detektor: Merck-Hitachi Fluoreszenz Detektor F-1080, 247/344

Interface: Nelson Analytical Serie 760

Zeit (min)	A [%]	B [%]	C [%]	Fluß (ml/min) Pumpe 1	Ereignis
0,0	60	40	0	1,0	Injektion
2,0	60	40	0	1,0	
15,0	25	75	0	1,0	Kopplung Säule 1+2
19,0	25	75	0	1,0	
19,1	25	75	0	0,0	
19,4	25	75	0	0,0	Entkopplung Säule 1+2,
19,7	25	75	0	1,0	Start Datenerfassung 2. Dimension
20,7	0	0	1	1,0	Start Pumpe 2
30,0	0	0	1	1,0	
45,0	60	0	0	1,0	
50,0	60	0	0	1,0	

Repräsentative Analysenchromatogramme sind in Abb. 27 und 28 dargestellt.

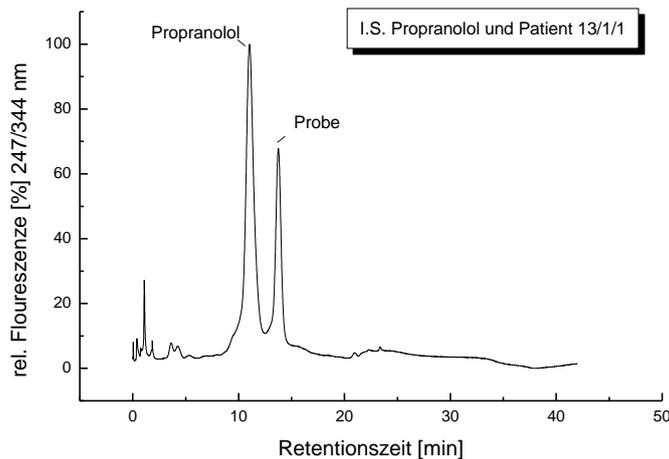


Abb. 27: repräsentatives Chromatogramm der Trennung einer Plasmaprobe in der 1. Dimension nach einer Flüssig-Flüssig-Extraktion

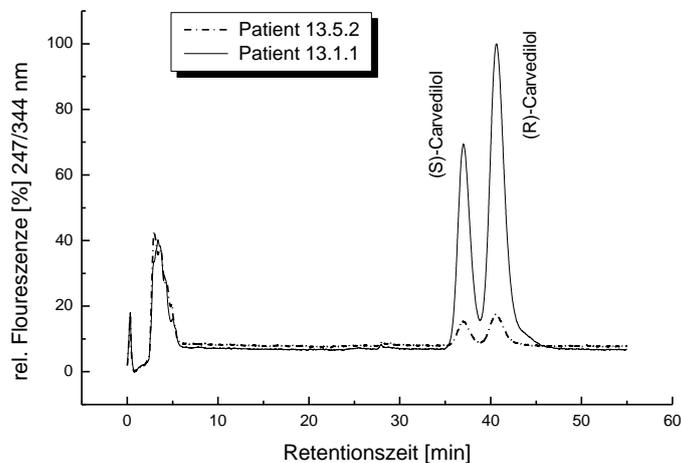


Abb. 28: repräsentative Chromatogramme von Plasmaproben mit einem hohen und niederen Gehalt an (R)- und (S)-Carvedilol

4.2.3 Kalibrierung

Für eine Stammlösung wurden 21,3 mg (*R,S*)-Carvedilol in 10 mL Methanol aufgelöst und davon wurde eine Verdünnungsreihe erstellt. Leerplasma wurde mit unterschiedlichen Mengen (*R,S*)-Carvedilol und internem Standard Propranolol (2,6 µg/mL in Wasser) dotiert. Folgende Konzentrationen an (*R*)- bzw. (*S*)-Carvedilol in Plasma wurden analysiert: 1,1 – 2,2 – 4,5 – 9,0 – 17,9 – 34,9 ng/mL.

Lineare Eichfunktionen (n=6): (*S*)-Carvedilol $y=1,68069 \times 10^6 x - 566613$ ($r=0,99954$, Abb. 29) und (*R*)-Carvedilol $y=1,79294 \times 10^6 x - 592046$ ($r=0,99939$, Abb. 30).

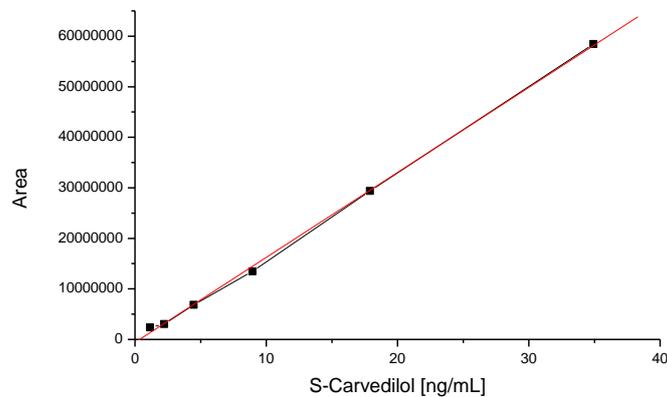


Abb. 29: lineare Eichfunktion von (*S*)-Carvedilol in Plasma

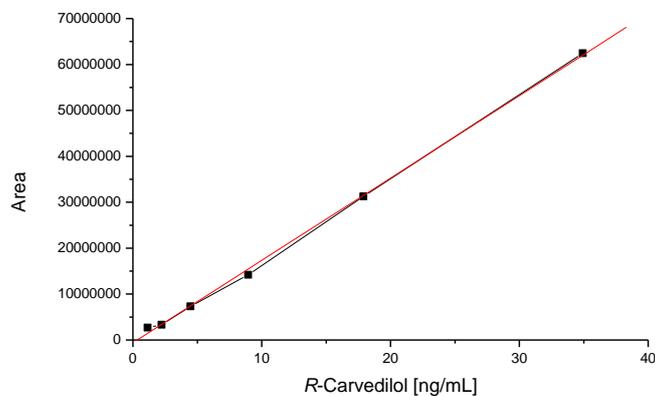


Abb. 30: lineare Eichfunktion von (*R*)-Carvedilol mit in Plasma

Die Wiederholgenauigkeit der Methode schwankte zwischen 3-8 % für 4 ng/mL (*R*)-Carvedilol und zwischen 3-12 % für 4 ng/mL (*S*)-Carvedilol. Für 45 ng/mL betrug die Wiederfindung 3 % bei beiden Enantiomere. Für die Tag zu Tag Wiederholgenauigkeit wurde 5-9 % für 4 ng/mL (*R*)- bzw. (*S*)-Carvedilol, und 5 % für beide Enantiomere bei einer Konzentration von 45 ng/mL (*R*)- bzw. (*S*)-Carvedilol gefunden (n=5).

4.2.4 Anwendung

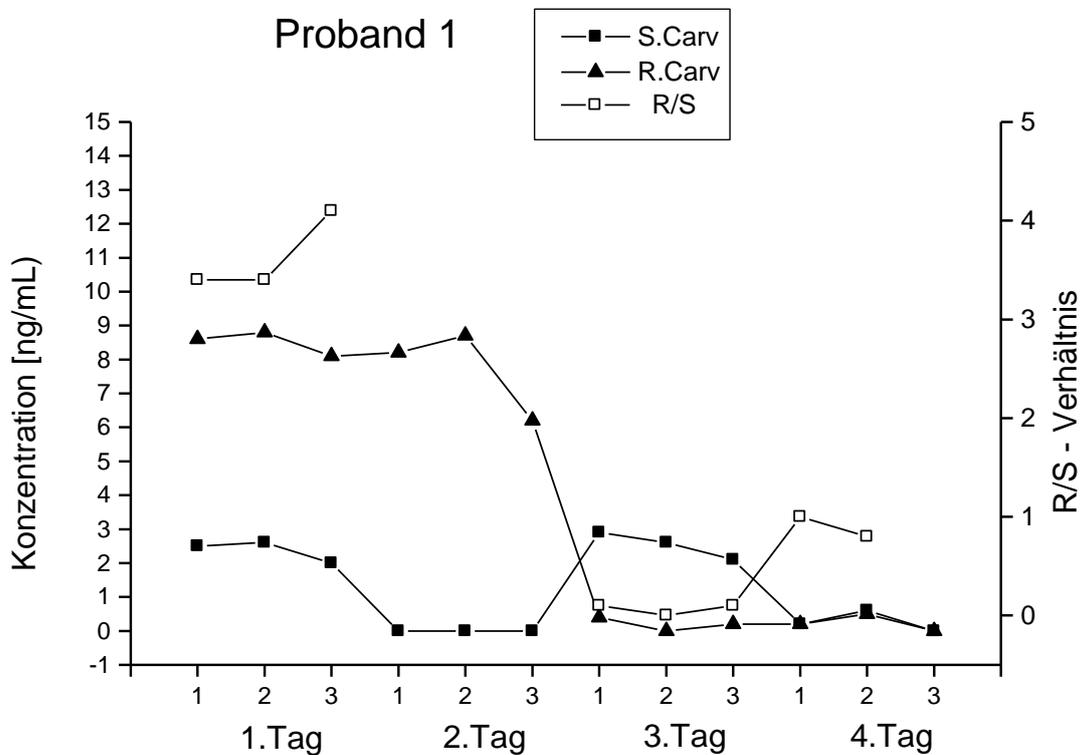
Die oben beschriebene Methode wurde für die Messung von mehr als 400 Humanplasmaproben angewendet. In einer Doppelblindstudie wurden Patienten, die unter arteriellem Bluthochdruck leiden, mit 25 mg (*R,S*)-Carvedilol behandelt und die Carvedilol-Konzentration in deren Blut wurde während einer Übungsphase und in Ruhelage bestimmt. Die Belastung auf einem Fahrradergometer erfolgte drei Stunden nach der oralen Verabreichung. Blutproben wurden vor der Übung, am Ende der Belastung und nach 15 min Ruhephase genommen. Die Konzentration von (*R*)-Carvedilol im Plasma war im Allgemeinen höher als die Konzentration von (*S*)-Carvedilol.

Manchen Probanden wurde die halbe Dosis der reinen Enantiomerenform von (*R*)- oder (*S*)-Carvedilol verabreicht und der gleiche Belastungstest durchgeführt. Die Ergebnisse zeigten, dass die Belastungsübungen keinen Einfluss auf die Konzentration des (*S*)-Carvedilol im Blut hatten. Angaben über die Methode, pharmakokinetische Daten und eine Diskussion der Resultate im Kontext mit anderen Beta-Blockern wurden veröffentlicht [34,35,36].

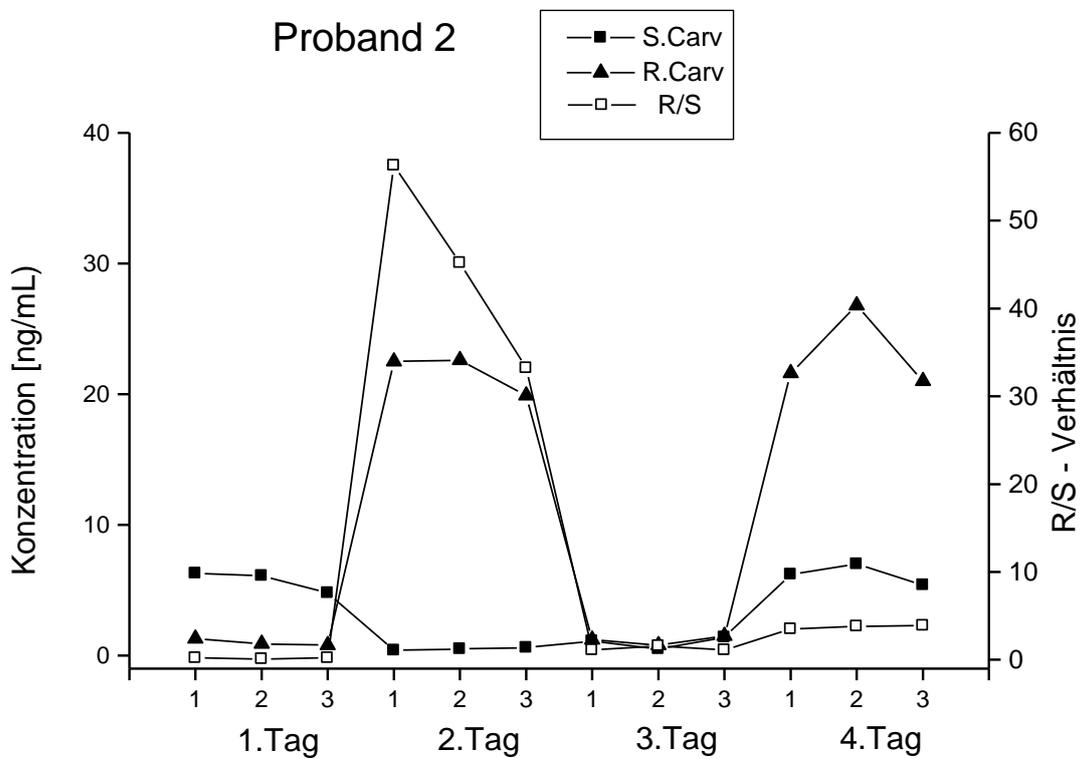
5 Analysenresultate

1.Zahl: Patienten- oder Probandennummer ;.2.Zahl: Tag ; 3.Zahl: 1=Ruhe/2=Belastung/3=Erholung

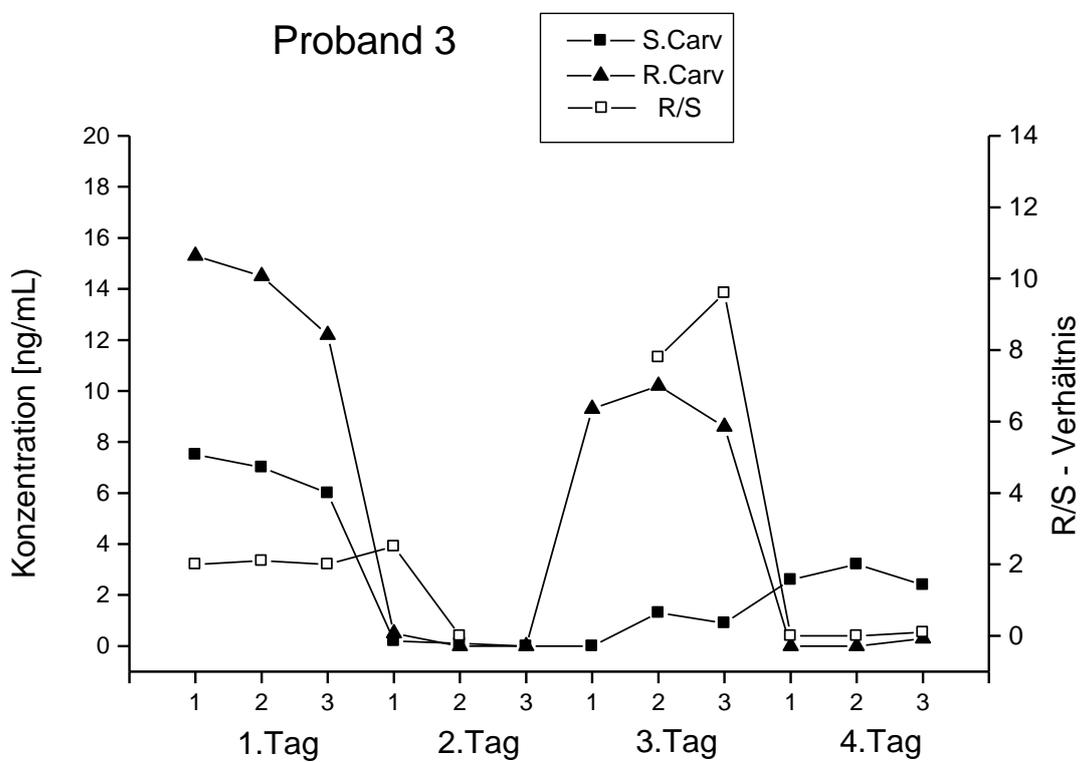
Proband 1				
Tag	Belastung	S -Carvedilol [ng/mL]	R -Carvedilol [ng/mL]	R/S-Verhältnis
1	1	2,5	8,6	3,4
	2	2,6	8,8	3,4
	3	2,0	8,1	4,1
2	1	0	8,2	-
	2	0	8,7	-
	3	0	6,2	-
3	1	2,9	0,4	0,1
	2	2,6	0	0
	3	2,1	0,2	0,1
4	1	0,2	0,2	1,0
	2	0,6	0,5	0,8
	3	0	0	-



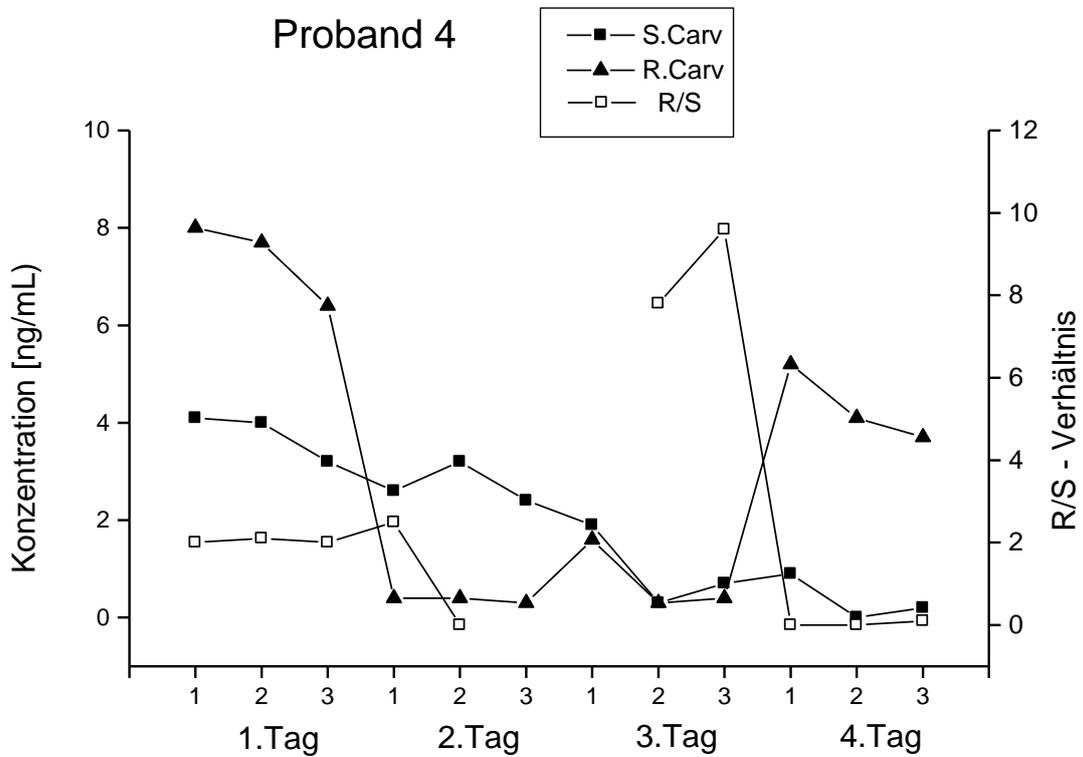
Proband 2				
Tag	Belastung	S -Carvedilol [ng/mL]	R -Carvedilol [ng/mL]	R/S-Verhältnis
1	1	6,3	1,3	0,2
	2	6,1	0,9	0,1
	3	4,8	0,8	0,2
2	1	0,4	22,5	56,3
	2	0,5	22,6	45,2
	3	0,6	19,9	33,2
3	1	1,1	1,2	1,1
	2	0,5	0,8	1,6
	3	1,4	1,5	1,1
4	1	6,2	21,6	3,5
	2	7,0	26,8	3,8
	3	5,4	21,0	3,9



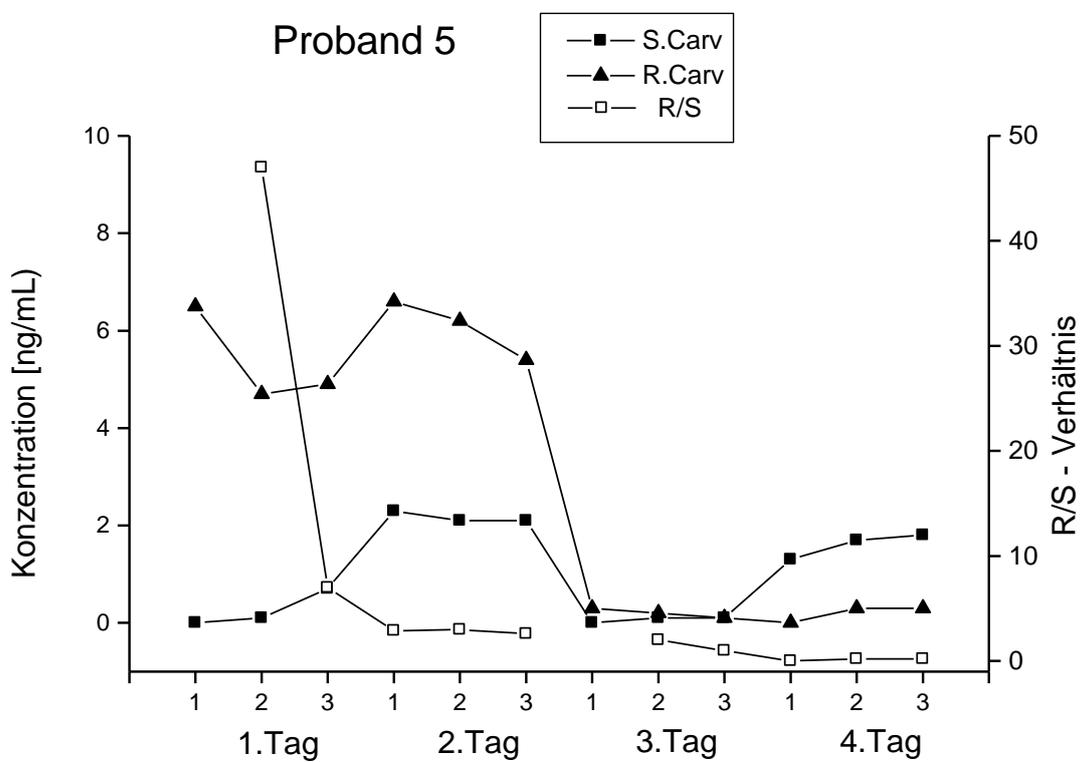
Proband 3				
Tag	Belastung	S -Carvedilol [ng/mL]	R -Carvedilol [ng/mL]	R/S-Verhältnis
1	1	7,5	15,3	2,0
	2	7,0	14,5	2,1
	3	6,0	12,2	2,0
2	1	0,2	0,5	2,5
	2	0,1	0	0
	3	0	0	-
3	1	0	9,3	-
	2	1,3	10,2	7,8
	3	0,9	8,6	9,6
4	1	2,6	0	0
	2	3,2	0	0
	3	2,4	0,3	0,1



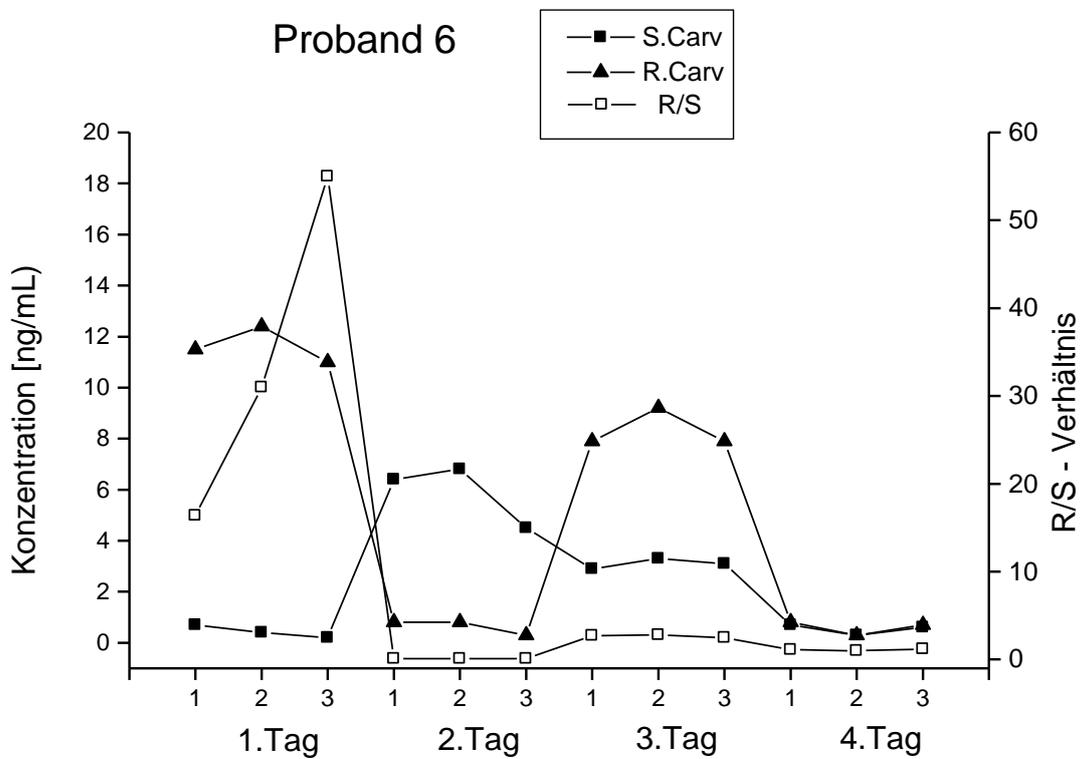
Proband 4				
Tag	Belastung	S -Carvedilol [ng/mL]	R -Carvedilol [ng/mL]	R/S-Verhältnis
1	1	4,1	8,0	2,0
	2	4,0	7,7	1,9
	3	3,2	6,4	2,0
2	1	2,6	0,4	0,2
	2	3,2	0,4	0,1
	3	2,4	0,3	0,1
3	1	1,9	1,6	0,8
	2	0,3	0,3	1,0
	3	0,7	0,4	0,6
4	1	0,9	5,2	5,0
	2	0	4,1	-
	3	0,2	3,7	18,5



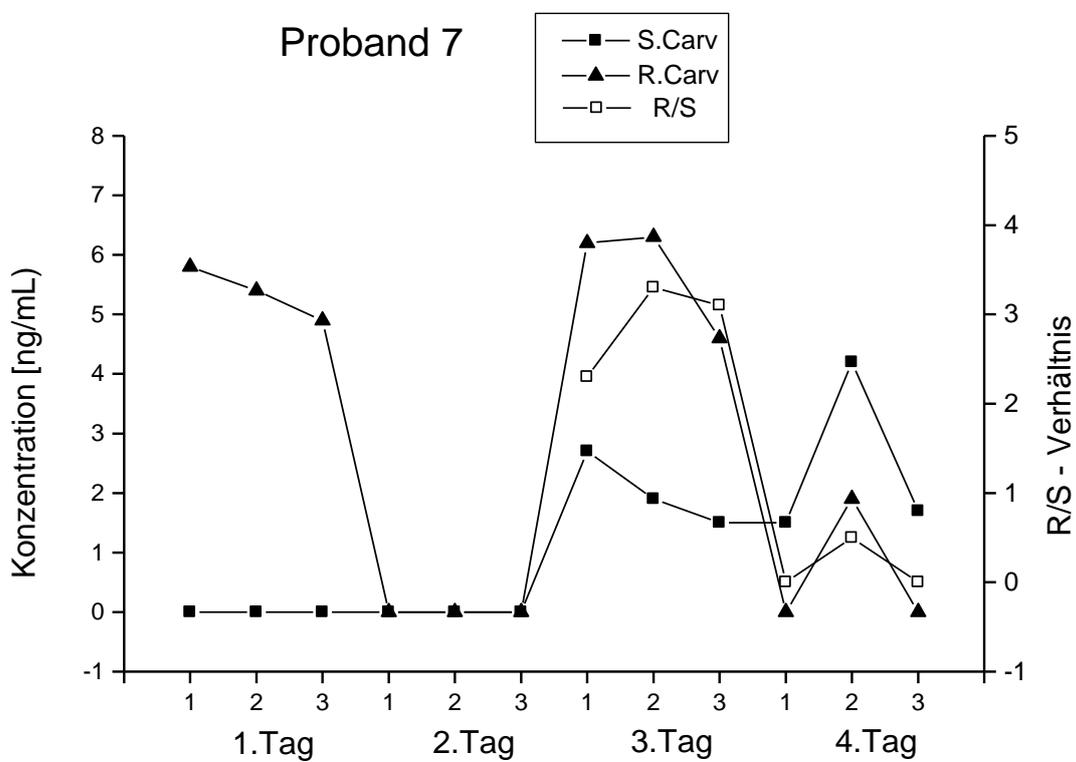
Proband 5				
Tag	Belastung	S -Carvedilol [ng/mL]	R -Carvedilol [ng/mL]	R/S-Verhältnis
1	1	0	6,5	-
	2	0,1	4,7	47
	3	0,7	4,9	7
2	1	2,3	6,6	2,9
	2	2,1	6,2	3,0
	3	2,1	5,4	2,6
3	1	0	0,3	-
	2	0,1	0,2	2,0
	3	0,1	0,1	1,0
4	1	1,3	0	0
	2	1,7	0,3	0,2
	3	1,8	0,3	0,2



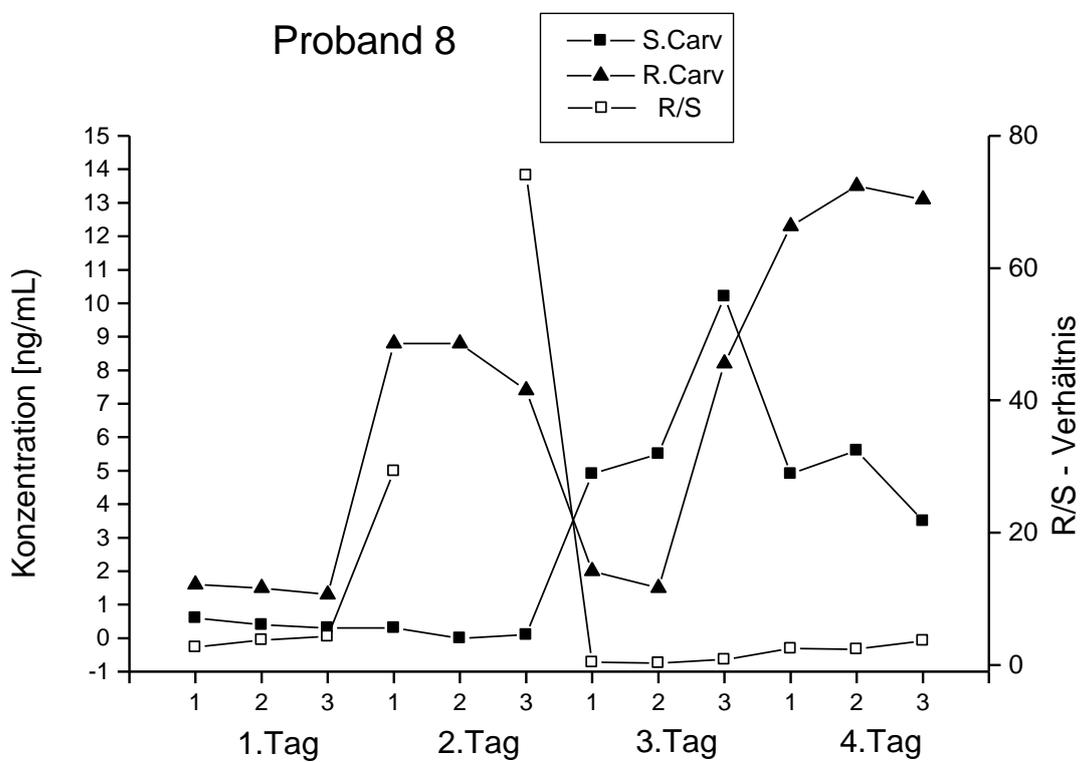
Proband 6				
Tag	Belastung	S -Carvedilol [ng/mL]	R -Carvedilol [ng/mL]	R/S-Verhältnis
1	1	0,7	11,5	16,4
	2	0,4	12,4	31,0
	3	0,2	11,0	55,0
2	1	6,4	0,8	0,1
	2	6,8	0,8	0,1
	3	4,5	0,3	0,1
3	1	2,9	7,9	2,7
	2	3,3	9,2	2,8
	3	3,1	7,9	2,5
4	1	0,7	0,8	1,1
	2	0,3	0,3	1,0
	3	0,6	0,7	1,2



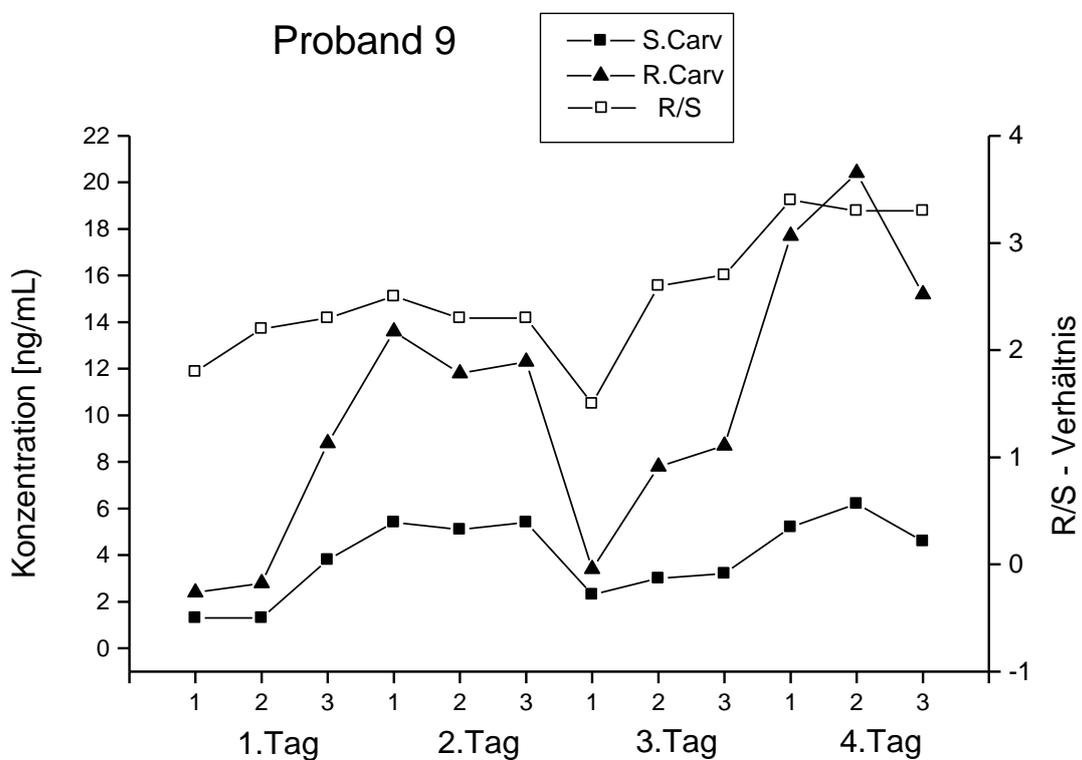
Proband 7				
Tag	Belastung	S -Carvedilol [ng/mL]	R -Carvedilol [ng/mL]	R/S-Verhältnis
1	1	0	5,8	-
	2	0	5,4	-
	3	0	4,9	-
2	1	0	0	-
	2	0	0	-
	3	0	0	-
3	1	2,7	6,2	2,3
	2	1,9	6,3	3,3
	3	1,5	4,6	3,1
4	1	1,5	0	0
	2	4,2	1,9	0,5
	3	1,7	0	0



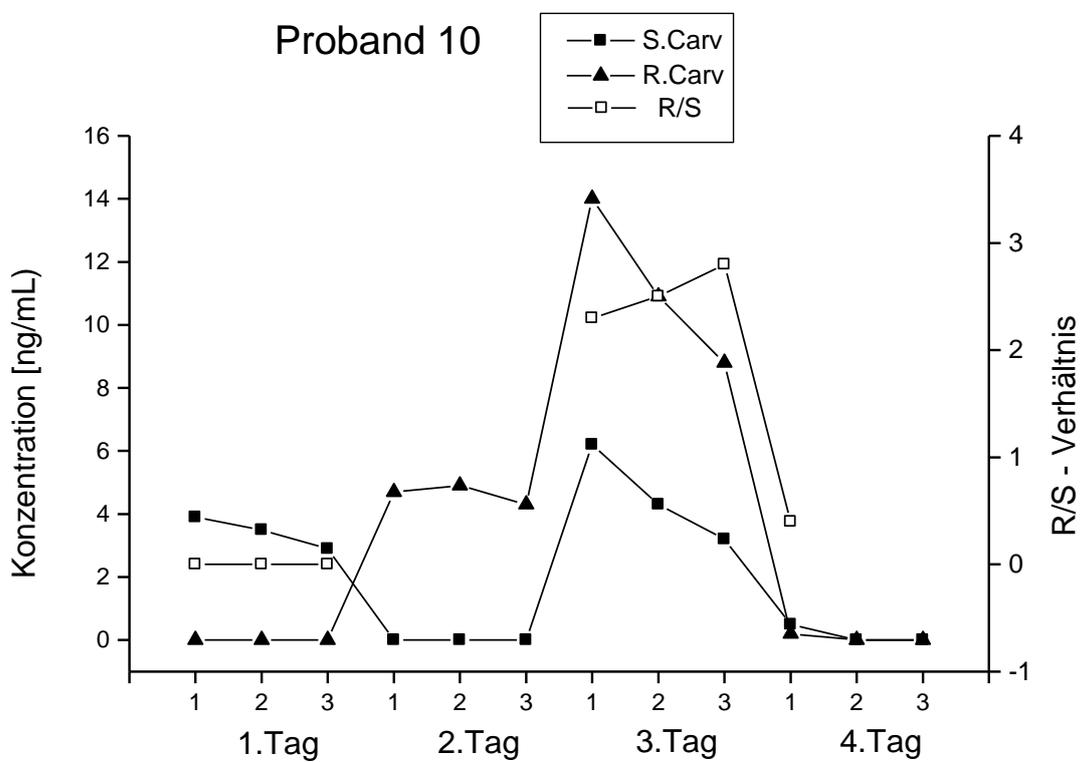
Proband 8				
Tag	Belastung	S -Carvedilol [ng/mL]	R -Carvedilol [ng/mL]	R/S-Verhältnis
1	1	0,6	1,6	2,7
	2	0,4	1,5	3,8
	3	0,3	1,3	4,3
2	1	0,3	8,8	29,3
	2	0	8,8	-
	3	0,1	7,4	74
3	1	4,9	2,0	0,4
	2	5,5	1,5	0,3
	3	10,2	8,2	0,8
4	1	4,9	12,3	2,5
	2	5,6	13,5	2,4
	3	3,5	13,1	3,7



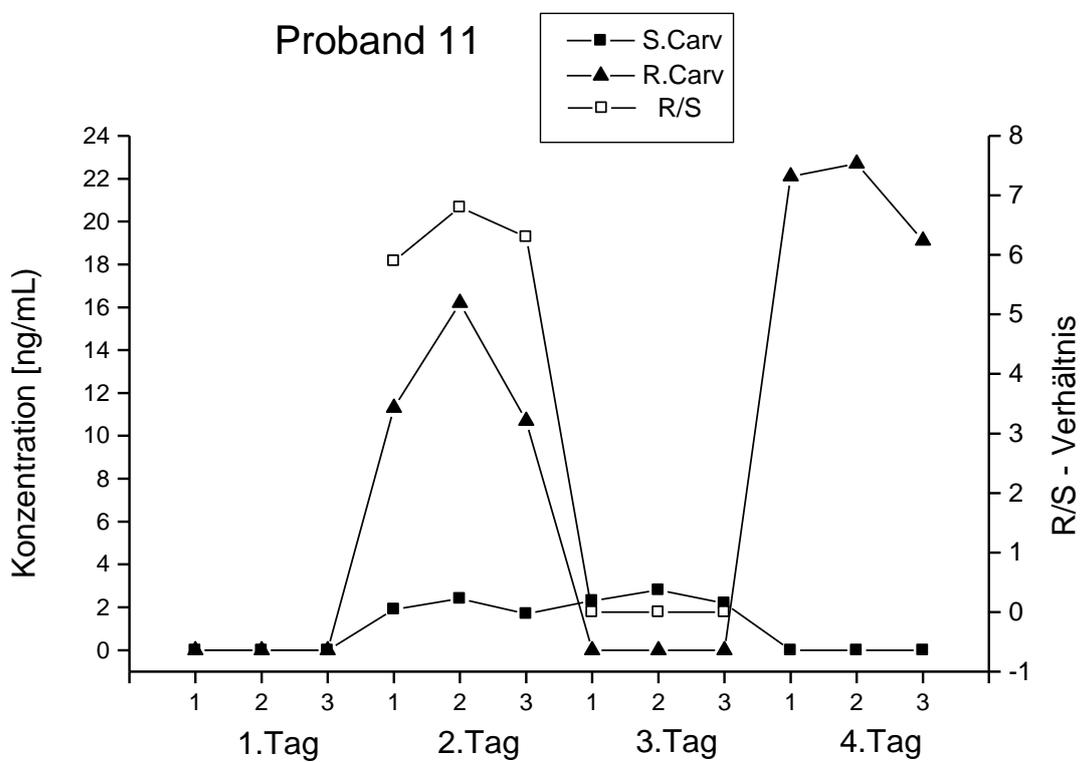
Proband 9				
Tag	Belastung	S -Carvedilol [ng/mL]	R -Carvedilol [ng/mL]	R/S-Verhältnis
1	1	1,3	2,4	1,8
	2	1,3	2,8	2,2
	3	3,8	8,8	2,3
2	1	5,4	13,6	2,5
	2	5,1	11,8	2,3
	3	5,4	12,3	2,3
3	1	2,3	3,4	1,5
	2	3	7,8	2,6
	3	3,2	8,7	2,7
4	1	5,2	17,7	3,4
	2	6,2	20,4	3,3
	3	4,6	15,2	3,3



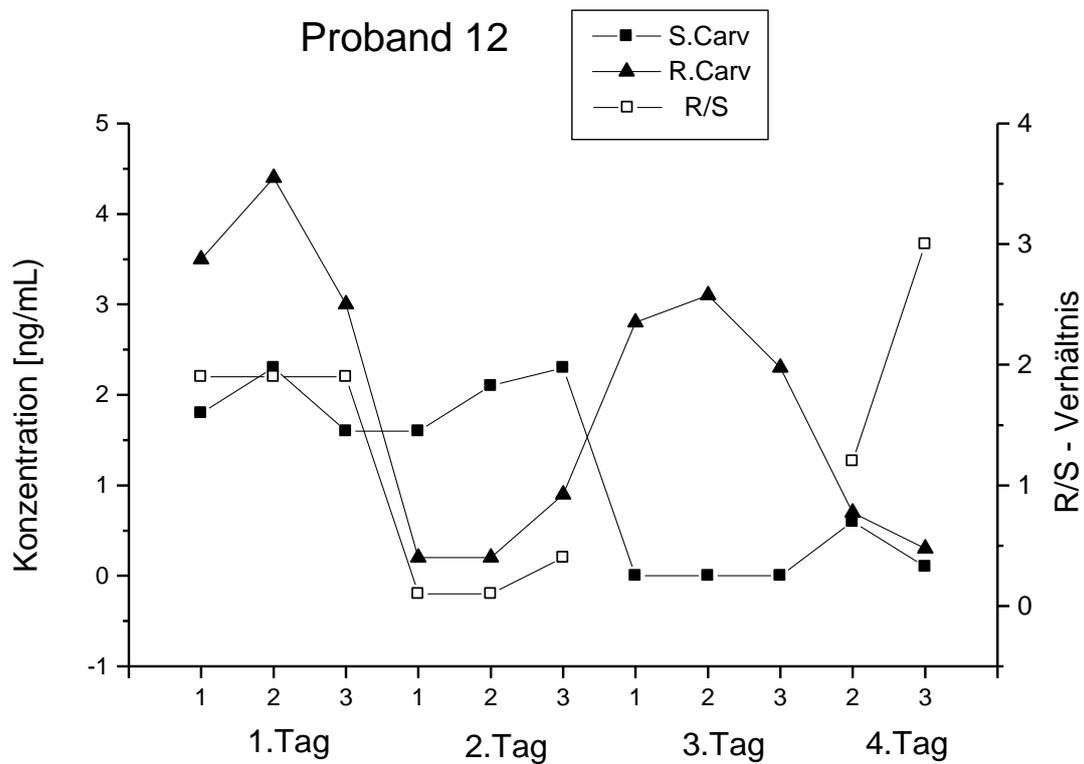
Proband 10				
Tag	Belastung	S -Carvedilol [ng/mL]	R -Carvedilol [ng/mL]	R/S-Verhältnis
1	1	3,9	0	0
	2	3,5	0	0
	3	2,9	0	0
2	1	0	4,7	-
	2	0	4,9	-
	3	0	4,3	-
3	1	6,2	14	2,3
	2	4,3	10,9	2,5
	3	3,2	8,8	2,8
4	1	0,5	0,2	0,4
	2	0	0	-
	3	0	0	-



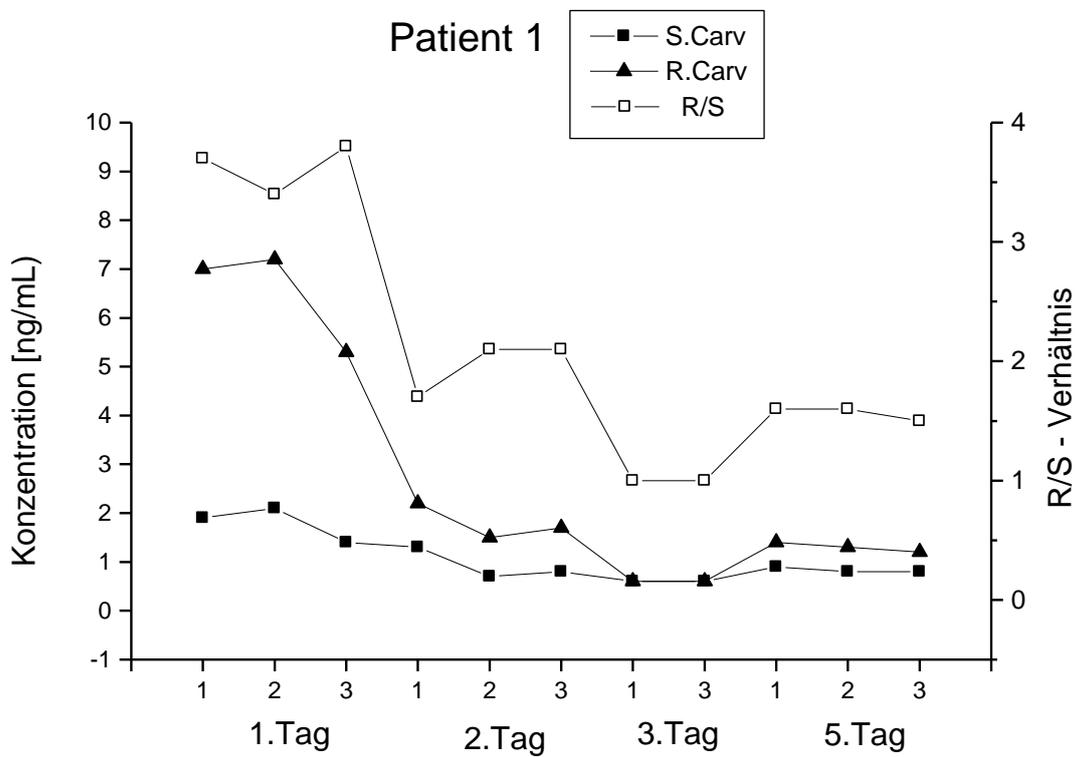
Proband 11				
Tag	Belastung	S -Carvedilol [ng/mL]	R -Carvedilol [ng/mL]	R/S-Verhältnis
1	1	0	0	-
	2	0	0	-
	3	0	0	-
2	1	1,9	11,3	5,9
	2	2,4	16,2	6,8
	3	1,7	10,7	6,3
3	1	2,3	0	0
	2	2,8	0	0
	3	2,2	0	0
4	1	0	22,1	-
	2	0	22,7	-
	3	0	19,1	-



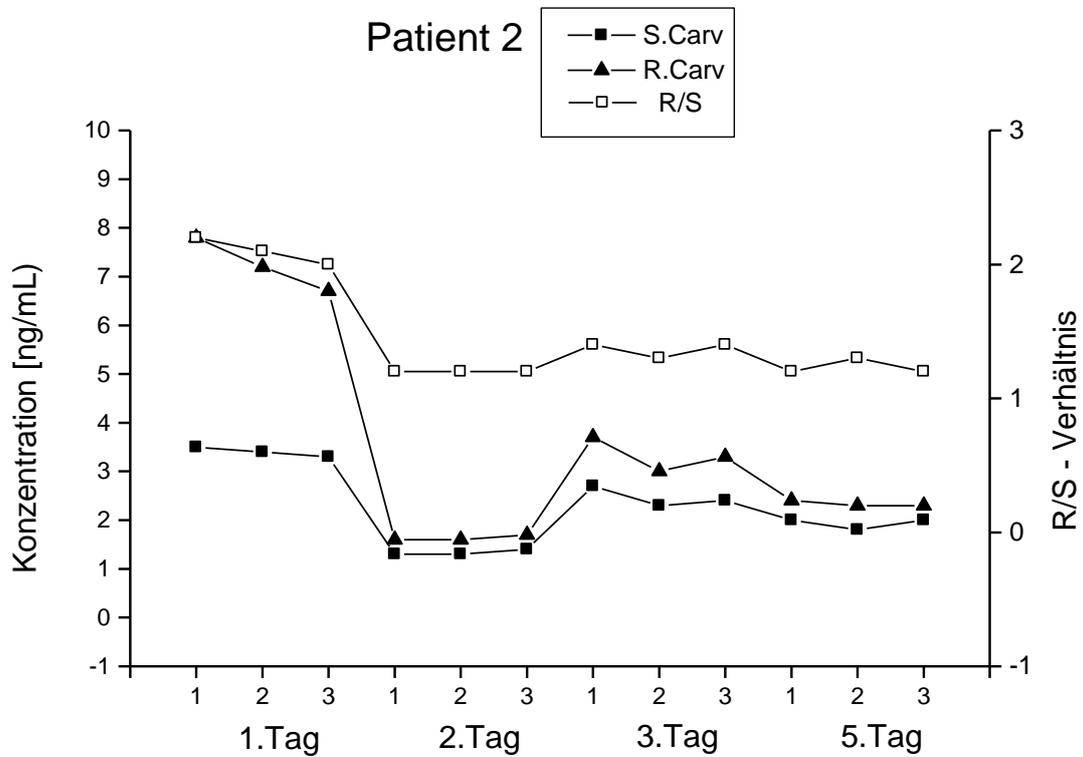
Proband 12				
Tag	Belastung	S -Carvedilol [ng/mL]	R -Carvedilol [ng/mL]	R/S-Verhältnis
1	1	1,8	3,5	1,9
	2	2,3	4,4	1,9
	3	1,6	3,0	1,9
2	1	1,6	0,2	0,1
	2	2,1	0,2	0,1
	3	2,3	0,9	0,4
3	1	0	2,8	-
	2	0	3,1	-
	3	0	2,3	-
4	2	0,6	0,7	1,2
	3	0,1	0,3	3,0



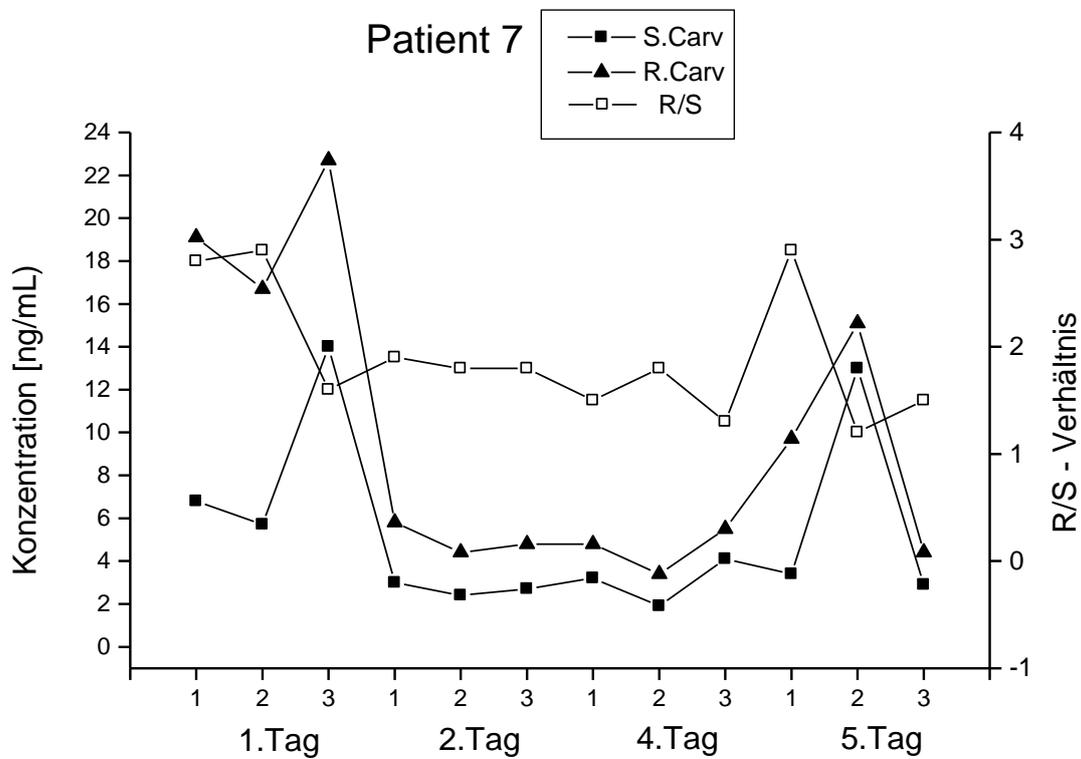
Patient 1				
Tag	Belastung	S -Carvedilol [ng/mL]	R -Carvedilol [ng/mL]	R/S-Verhältnis
1	1	1,9	7	3,7
	2	2,1	7,2	3,4
	3	1,4	5,3	3,8
2	1	1,3	2,2	1,7
	2	0,7	1,5	2,1
	3	0,8	1,7	2,1
3	1	0,6	0,6	1
	3	0,6	0,6	1
5	1	0,9	1,4	1,6
	2	0,8	1,3	1,6
	3	0,8	1,2	1,5



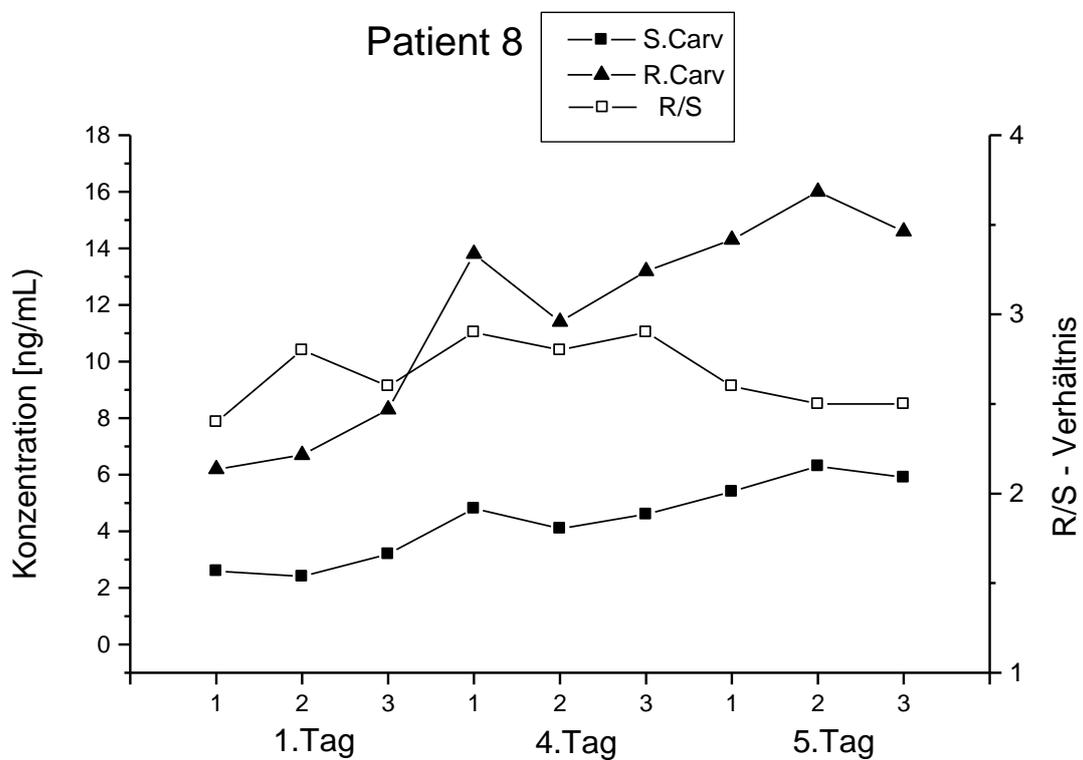
Patient 2				
Tag	Belastung	S -Carvedilol [ng/mL]	R -Carvedilol [ng/mL]	R/S-Verhältnis
1	1	3,5	7,8	2,2
	2	3,4	7,2	2,1
	3	3,3	6,7	2
2	1	1,3	1,6	1,2
	2	1,3	1,6	1,2
	3	1,4	1,7	1,2
3	1	2,7	3,7	1,4
	2	2,3	3	1,3
	3	2,4	3,3	1,4
5	1	2	2,4	1,2
	2	1,8	2,3	1,3
	3	2	2,3	1,2



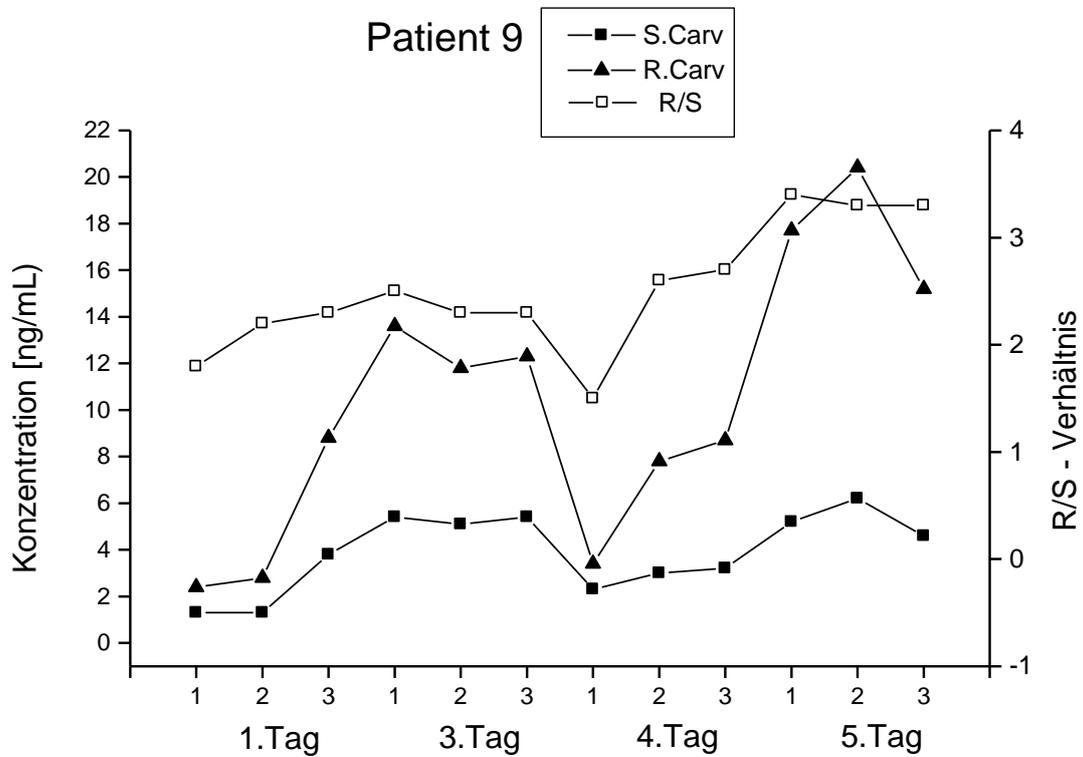
Patient 7				
Tag	Belastung	S -Carvedilol [ng/mL]	R -Carvedilol [ng/mL]	R/S-Verhältnis
1	1	6,8	19,1	2,8
	2	5,7	16,7	2,9
	3	14	22,7	1,6
2	1	3,0	5,8	1,9
	2	2,4	4,4	1,8
	3	2,7	4,8	1,8
4	1	3,2	4,8	1,5
	2	1,9	3,4	1,8
	3	4,1	5,5	1,3
5	1	3,4	9,7	2,9
	2	13,0	15,1	1,2
	3	2,9	4,4	1,5



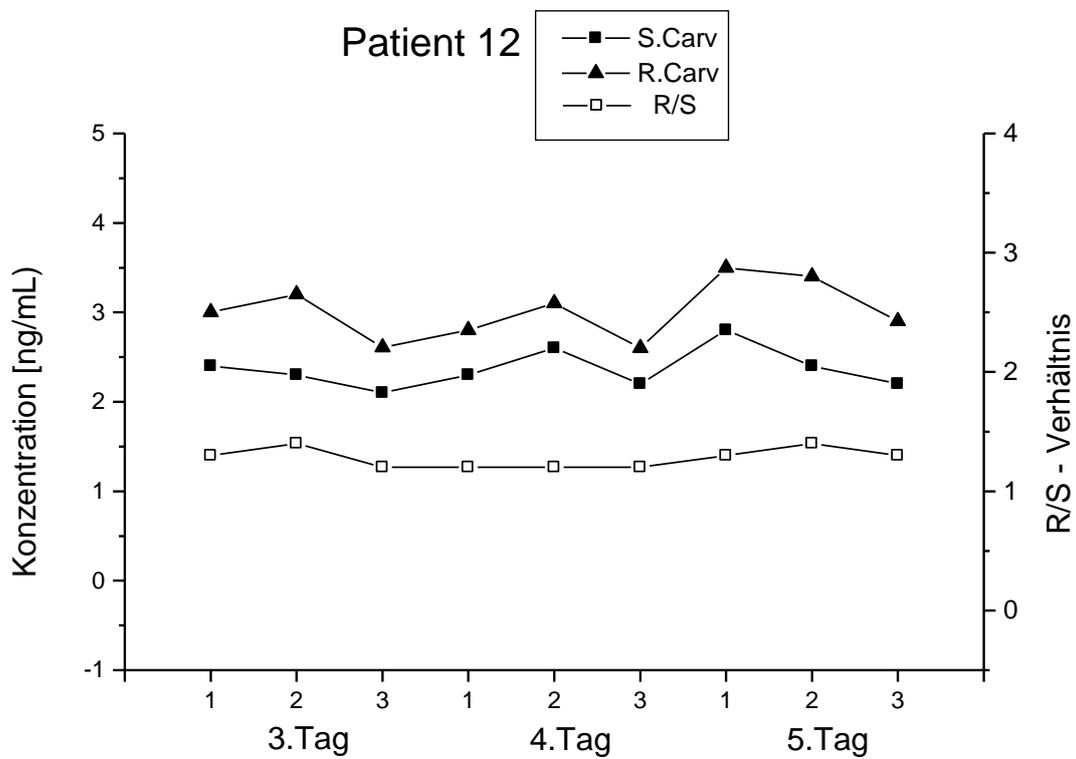
Patient 8				
Tag	Belastung	S -Carvedilol [ng/mL]	R -Carvedilol [ng/mL]	R/S-Verhältnis
1	1	2,6	6,2	2,4
	2	2,4	6,7	2,8
	3	3,2	8,3	2,6
4	1	4,8	13,8	2,9
	2	4,1	11,4	2,8
	3	4,6	13,2	2,9
5	1	5,4	14,3	2,6
	2	6,3	16,0	2,5
	3	5,9	14,6	2,5



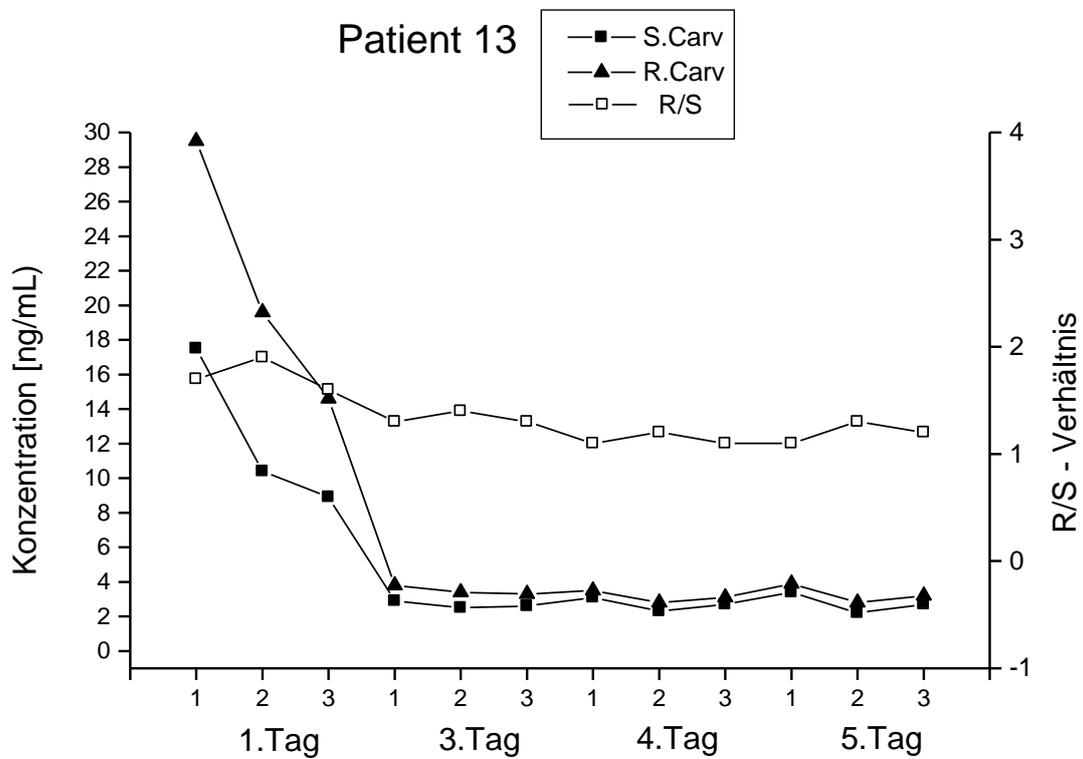
Patient 9				
Tag	Belastung	S -Carvedilol [ng/mL]	R -Carvedilol [ng/mL]	R/S-Verhältnis
1	1	1,3	2,4	1,8
	2	1,3	2,8	2,2
	3	3,8	8,8	2,3
3	1	5,4	13,6	2,5
	2	5,1	11,8	2,3
	3	5,4	12,3	2,3
4	1	2,3	3,4	1,5
	2	3	7,8	2,6
	3	3,2	8,7	2,7
5	1	5,2	17,7	3,4
	2	6,2	20,4	3,3
	3	4,6	15,2	3,3



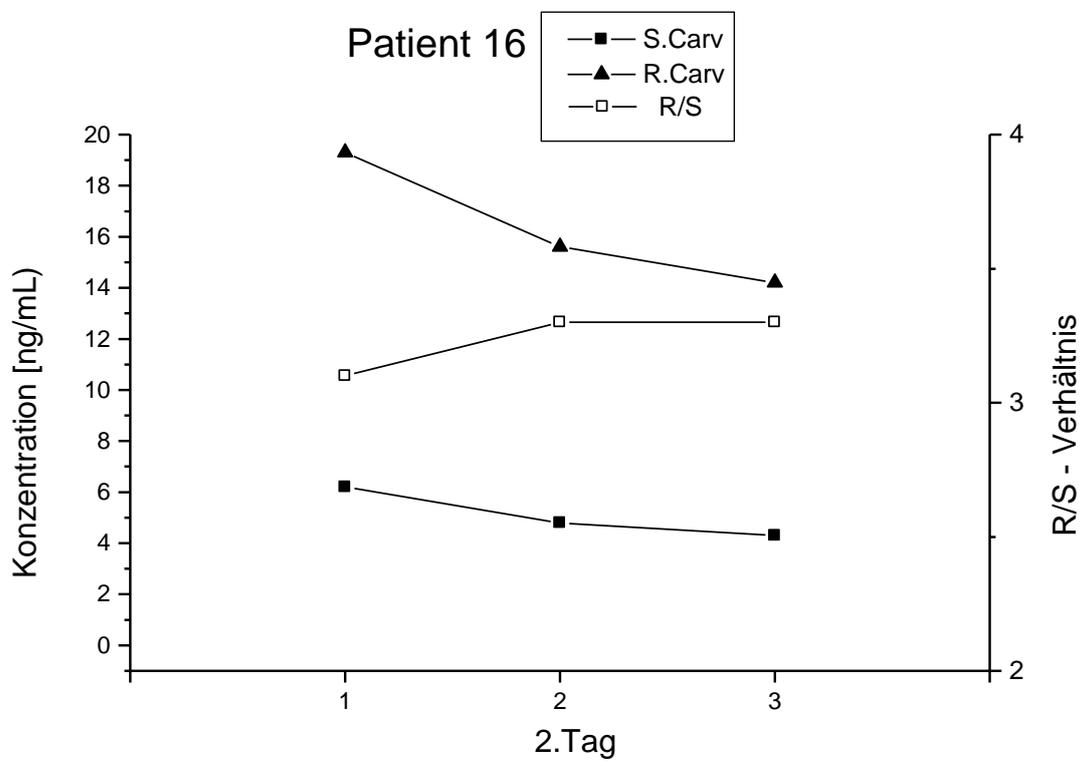
Patient 12				
Tag	Belastung	S -Carvedilol [ng/mL]	R -Carvedilol [ng/mL]	R/S-Verhältnis
3	1	2,4	3,0	1,3
	2	2,3	3,2	1,4
	3	2,1	2,6	1,2
4	1	2,3	2,8	1,2
	2	2,6	3,1	1,2
	3	2,2	2,6	1,2
5	1	2,8	3,5	1,3
	2	2,4	3,4	1,4
	3	2,2	2,9	1,3



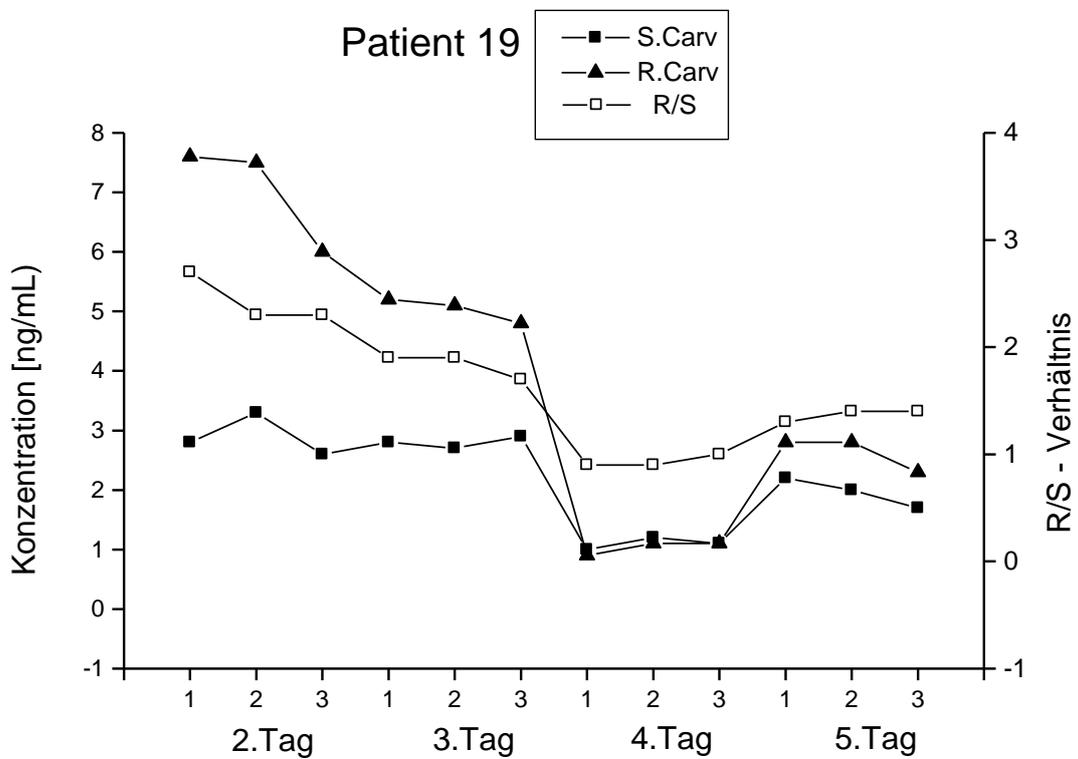
Patient 13				
Tag	Belastung	S -Carvedilol [ng/mL]	R -Carvedilol [ng/mL]	R/S-Verhältnis
1	1	17,5	29,5	1,7
	2	10,4	19,6	1,9
	3	8,9	14,6	1,6
3	1	2,9	3,8	1,3
	2	2,5	3,4	1,4
	3	2,6	3,3	1,3
4	1	3,1	3,5	1,1
	2	2,3	2,8	1,2
	3	2,7	3,1	1,1
5	1	3,4	3,9	1,1
	2	2,2	2,8	1,3
	3	2,7	3,2	1,2



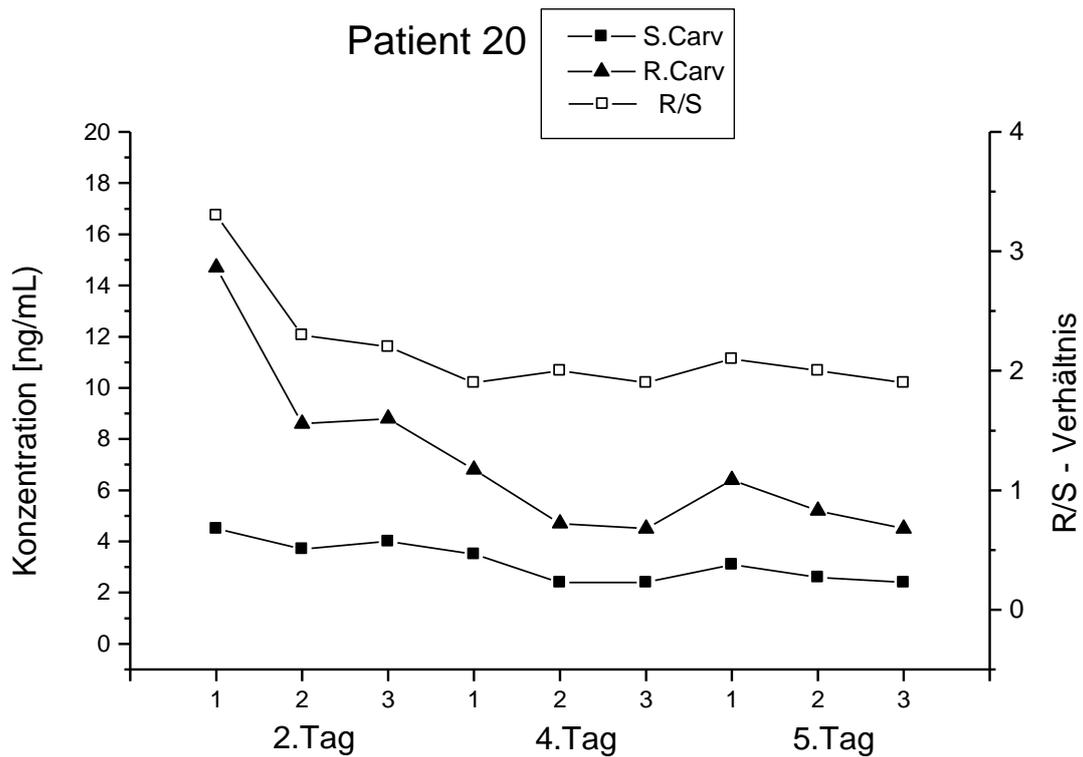
Patient 16				
Tag	Belastung	S -Carvedilol [ng/mL]	R -Carvedilol [ng/mL]	R/S-Verhältnis
2	1	6,2	19,3	3,1
	2	4,8	15,6	3,3
	3	4,3	14,2	3,3



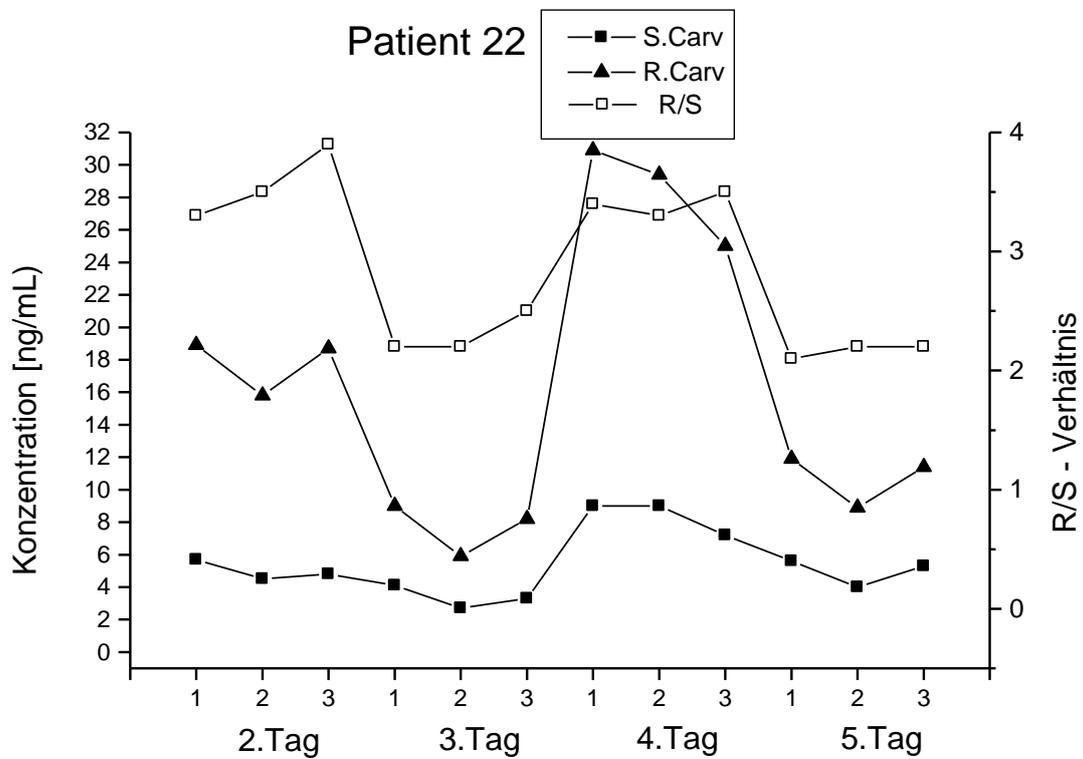
Patient19				
Tag	Belastung	S -Carvedilol [ng/mL]	R -Carvedilol [ng/mL]	R/S-Verhältnis
2	1	2,8	7,6	2,7
	2	3,3	7,5	2,3
	3	2,6	6,0	2,3
3	1	2,8	5,2	1,9
	2	2,7	5,1	1,9
	3	2,9	4,8	1,7
4	1	1,0	0,9	0,9
	2	1,2	1,1	0,9
	3	1,1	1,1	1,0
5	1	2,2	2,8	1,3
	2	2,0	2,8	1,4
	3	1,7	2,3	1,4



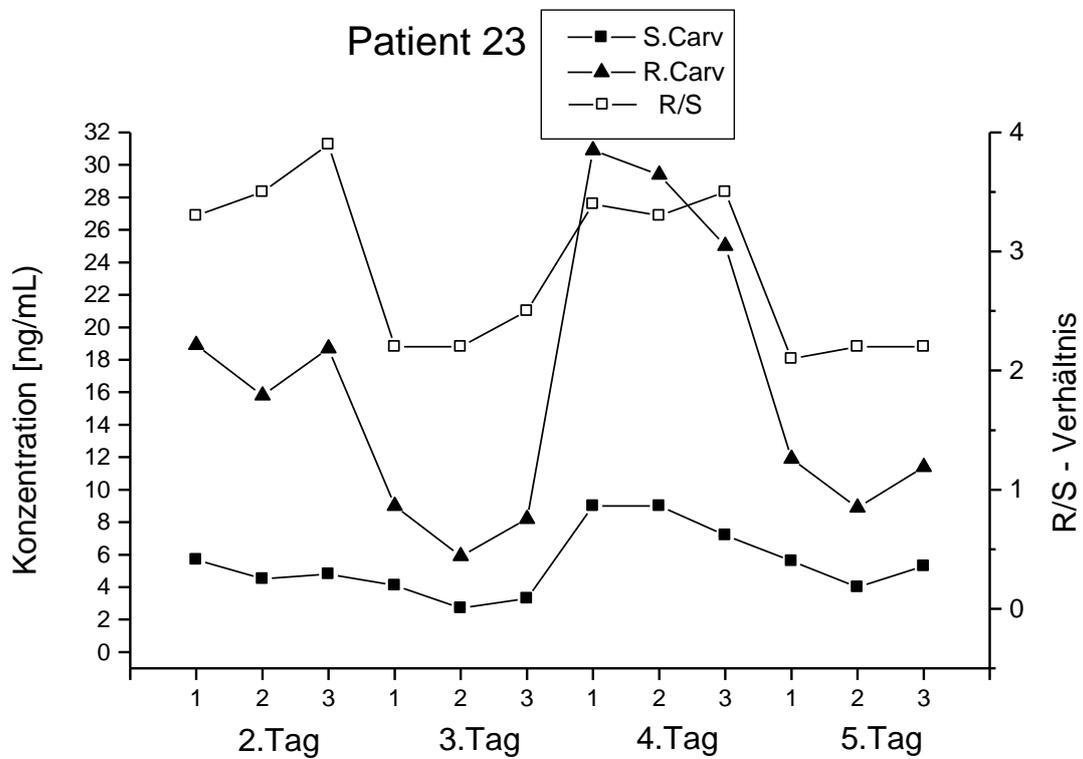
Patient 20				
Tag	Belastung	S -Carvedilol [ng/mL]	R -Carvedilol [ng/mL]	R/S-Verhältnis
2	1	4,5	14,7	3,3
	2	3,7	8,6	2,3
	3	4,0	8,8	2,2
4	1	3,5	6,8	1,9
	2	2,4	4,7	2
	3	2,4	4,5	1,9
5	1	3,1	6,4	2,1
	2	2,6	5,2	2,0
	3	2,4	4,5	1,9



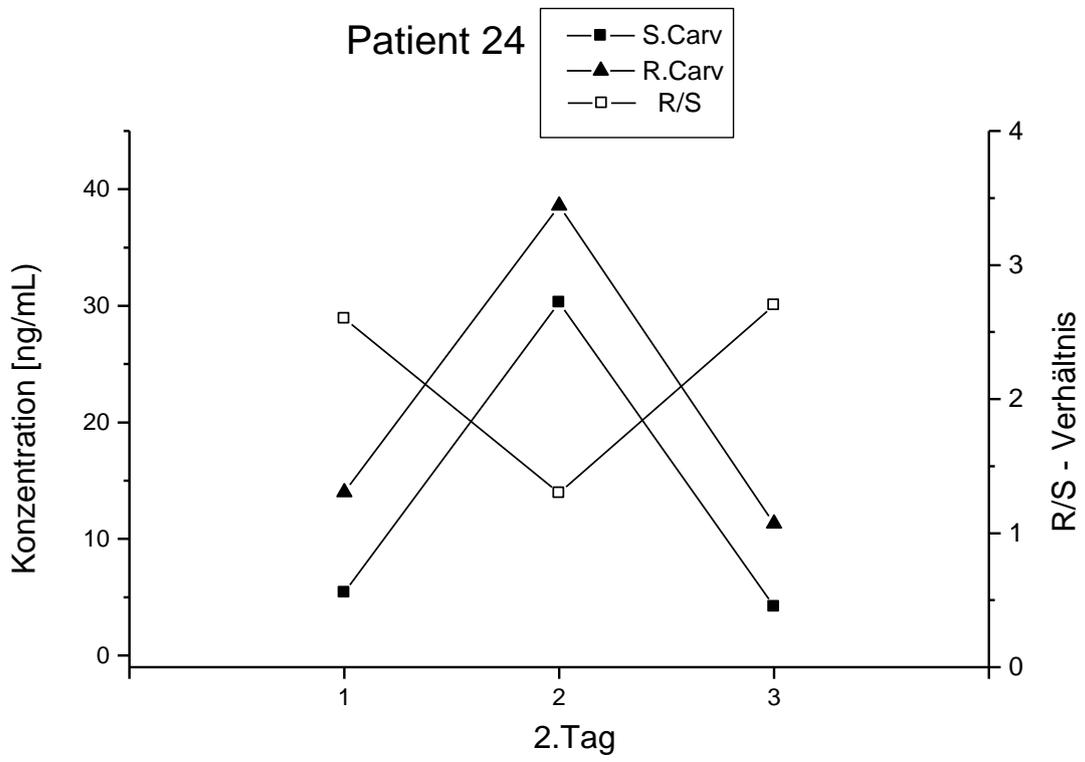
Patient 22				
Tag	Belastung	S -Carvedilol [ng/mL]	R -Carvedilol [ng/mL]	R/S-Verhältnis
2	1	4,5	8,2	1,8
	2	4,1	7,1	1,7
	3	2,8	5,5	2,0
3	1	1,2	1,4	1,2
	2	1,1	1,3	1,2
	3	1,0	1,1	1,1
4	1	1,0	1,6	1,6
	2	1,0	1,6	1,6
	3	0,9	1,4	1,6
5	1	0,9	1,0	1,1
	2	0,9	1,0	1,1
	3	1,0	1,0	1,0



Patient 23				
Tag	Belastung	S -Carvedilol [ng/mL]	R -Carvedilol [ng/mL]	R/S-Verhältnis
2	1	5,7	18,9	3,3
	2	4,5	15,8	3,5
	3	4,8	18,7	3,9
3	1	4,1	9	2,2
	2	2,7	5,9	2,2
	3	3,3	8,2	2,5
4	1	9	30,9	3,4
	2	9	29,4	3,3
	3	7,2	25	3,5
5	1	5,6	11,9	2,1
	2	4	8,9	2,2
	3	5,3	11,4	2,2



Patient 24				
Tag	Belastung	S -Carvedilol [ng/mL]	R -Carvedilol [ng/mL]	R/S-Verhältnis
2	1	5,4	14	2,6
	2	30,3	38,6	1,3
	3	4,2	11,3	2,7



6 Literatur- und Abbildungsverzeichnis

- 1 Schmidt, R. F. & Thews, G. *Physiologie des Menschen* **1995**, 26. Auflage
- 2 Estler, H.-J., Ahlemeyer, B. *Pharmakologie und Toxikologie* **2000**
- 3 Feuerstein, G.; Yue, T.-L.; Ma, X.; Ruffolo, R. *Cardiovasc. Drug. Rev.* **1994**, 12, 85-104
- 4 Ruffolo, R. R. jr. et al. *Cardiovasc Drugs Ther.* **1997**, 11, 247-256
- 5 Taschenbuch der Arzneibehandlung, Angewandte Pharmakologie
- 6 Gehr, T.W.B; Tenero, D.M.; Boyle, D.A.; Qian, Y.; Sica, D.A.; Shusterman, N.H. *Eur. J. Clin. Pharmacol.* **1999**, 55, 269-277
- 7 McTavish, D.; Campoli-Richards, D.; Sorkin, E.M. *Drugs* **1993**, 45, 232-258
- 8 Feuerstein, G.Z.; Ruffolo, R.R. *Eur. Heart J (Suppl. B)* **1996**, 11, 247-256
- 9 Feuerstein, G.Z.; Bril, A.; Ruffolo, R.R. *Am. J. Cardiol.* **1997**, 80, 41L-45L
- 10 Meyer, V. R. *Praxis der Hochleistungs- Flüssigchromatographie* **1994**
- 11 www.chemiedidaktik.unisiegen.de/archiv/museum/Chrom.html
- 12 Grefer, Klaus; FSU Meldorf *Chromatographie* **1997**
- 13 de.wikipedia.org/w/index.php?title=Bild:Van-Deemter_png
- 14 Behn, F.; Michels, S; Læer, S; Blaschke, G. *J. Chromatogr. A.* **2001**, 755, 111-117
- 15 Ren, X.Q.; Dng, Y.Y.; Liu, J.Y.; Huang, A.J.; Liu, H.W.; Sun Y.L.; Sun, Z.P. *Chromatographia* **1999**, 50, 363-368
- 16 Clohs, L.; McErlane, K.M. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **2001**, 24, 545-554
- 17 Oravcova, J.; Sojkova, D.; Lindner, W. *J. Chromatogr. B.* **1996**, 682, 349-357
- 18 Stahl, E.; Baumgartner, U.; Henke, D.; Schölmerich, J.; Mutschler, E.; Spahn-Langguth, H. *Chirality* **1993**, 5, 1-7
- 19 Eisenberg, E.J.; Patterson, W.R.; Kahn, G.C. *J. Chronatogr.* **1989**, 493, 105-115
- 20 Bartsch, W.; Sponer, G.; Strein, K.; Muller-Beckmann, B.; Kling, L.; Bohm, E.; Martin, U.; Bore, H.O. *Eur. J. Clin. Pharmacol.* **1990**, 38, 104-107
- 21 Sphan, H.; Henke, W.; Langguth, P.; Schloss, J.; Mutschler E. *Arch. Pharm.* **1990**, 323, 465-469
- 22 Fuijmaki, M.; Shintani, S.; Hokusui, H *Drug Metab. Dispos.* **1991**, 19, 749-753
- 23 LiChrospher® ADS Application Guide, Iristechnologies, USA
- 24 LC-integrated Sample Preparation with Alkyl Diol Silica, Iristechnologies, USA
- 25 *CHIROBIOTIC HANDBOOK*, astec 5th Edition **2004**, USA
- 26 D'Acquarica, I; Gasparini, F.; Misti, D.; Zappia, G., Cimarelli, C., Palmieri, G.; Carotti, A; Cellamare, S; Villani, C. *Asymmetry* **2000**, 11, 2375-2385

-
- 27 Gasparini, F.; D'Acquarica, I.; Misti, D.; Pierini, M.; Villani, C. *Pure Appl. Chem.* **2003**, 75, No2-3, 407-412
- 28 Boos, K.-S.; Rudolphi, A. *LC-GC* **1997**, 15, 602-611
- 29 Boos, K.-S.; Rudolphi, A. *LC-GC* **1997**, 15, 814-823
- 30 Schafer, C.; Lubda, D.; Boos, K.-; Unger, K.K. *Bioforum Int.* **2001**, 5, 120-123
- 31 Kraushofer, T. *Diplomarbeit* Universität Wien 1998
- 32 Lamprecht, G.; Kraushofer, T.; Stoschitzky, K.; Linder, W. *J. Chromatogr. B* **2000**, 740, 219-226
- 33 Hokama, N.; Hobara, N.; Kameya, H.; Ohshiro, S.; Sakanashi, M. *J. Chromatogr. B* **1999**, 732, 233-238
- 34 Lamprecht G., Gruber L., Stoschitzky K., Linder, W. *Chromatographia Sup.* **2002**, 56, S-25 – S-29 (siehe Anhang)
- 35 Stoschitzky, K.; Zweiker, R.; Klein, W.; Zitta, S.; Gruber, L.; Lamprecht, G.; Lindner, W. *J. Cardiovasc. Pharmacol.* **2002**, 39(1), 58-60
- 36 Stoschitzky, K.; Koshucharova, G.; Zweiker, R.; Lercher, P.; Maier, R., Klein, W.; Zitta, S.; Gruber, L.; Lamprecht, G.; Lindner, W. *Cardiovasc. Drugs Ther.* **2002**, 16(2), 133-140

7 Zusammenfassung

Es wurden zwei HPLC-Säulenschalt-Methoden für die enantioselektive Trennung und Bestimmung von (R)- und (S)-Carvedilol in Plasma ausgearbeitet. Eine Deproteinierung vom Plasma erfolgte entweder durch Dosieren einer verdünnten, angesäuerten Plasmaprobe auf eine LiChrospher® RP4 ADS-Trennsäule oder durch Flüssig-Flüssig-Extraktion mit Trichlormethan und Rückextraktion in 0,1 M Citronensäure. In beiden Fällen wurde eine Vortrennung mittels Gradientenelution durchgeführt und anschließend die Carvedilol Fraktion „on-line“ auf eine enantioselektive Teicoplanin-Trennsäule transferiert. Die Trennung der Enantiomere von Carvedilol wurde isokratisch mit einem Eluentengemisch von Methanol-Acetonitril-Triethylammoniumacetat (70:30:0,05; v/v/w) als mobile Phase durchgeführt.

Mit der verwendeten Fluoreszenzdetektion wurde ein Quantifizierungslimit von 0,30 ng/mL für (R)-Carvedilol und 0,26 ng/mL für (S)-Carvedilol erreicht.

Obwohl die Bedingungen für eine „on-line“ Vortrennung der Plasmaproteine mittels einer LiChrospher® RP 18 ADS-Trennsäule optimiert wurden, war die ausgearbeitete Methode nicht stabil genug für die Analyse einer großen Anzahl von Plasmaproben. Der Transfer von Plasmakomponenten, während des Schaltintervalls, führte zu einer zunehmenden Verschlechterung der enantioselektiven Trennleistung der Teicoplanin-Trennsäule. Als Alternative wurde eine Flüssig-Flüssig-Extraktionsmethode mit anschließender Mehrsäulen-Chromatographie ausgearbeitet. Diese Methode erwies sich in der Praxis als stabil und robust für die Analyse einer großen Anzahl von Plasmaproben.

8 Abstract

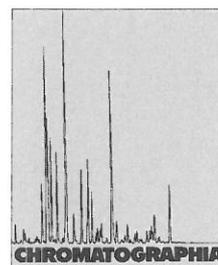
There were two HPLC column-switching methods worked out for the enantioselective separation and determination of (R)- and (S)-carvedilol in plasma. A deproteinization of plasma was carried out either by feeding a dilute of, acidified plasma sample to a LiChrospher ® ADS RP4 column, or by liquid-liquid extraction and back extraction with trichloromethane in 0.1 M citric acid. In both cases, a preliminary separation was performed using gradient elution on the carvedilol group and subsequently transferred "on-line" to an enantioselective Teicoplanin column. The separation of the enantiomers of carvedilol was carried out isocratically with an eluent mixture of methanol-acetonitrile-triethylammonium (70:30:0,05, v / v / w) as the mobile phase.

With the fluorescence detection used, a quantification limit of 0.30 ng / mL for (R)-carvedilol and 0.26 ng / mL for (S)-carvedilol was reached.

Although the conditions for an "on-line" pre-separation of plasma proteins using a LiChrospher ® RP-18 ADS column were optimized, the elaborated method was not stable enough for the analysis of a large number of plasma samples. The transfer of plasma components during the switching interval, led to a progressive deterioration of the enantioselective separation efficiency of the teicoplanin column. Alternatively, a liquid-liquid extraction method with subsequent multi-column chromatography was developed. This method proved in practice to be stable and robust for the analysis of a large number of plasma samples.

9 Anhang

Enantioselective Analysis of (*R*)- and (*S*)-Carvedilol in Human Plasma by High-Performance Liquid Chromatography



CHROMATOGRAPHIA
2002, 56, Suppl., S-25-S-29

G. Lamprecht^{1*} / L. Gruber¹ / K. Stoschitzky² / W. Lindner¹

¹ Institute of Analytical Chemistry, University of Vienna, Waehringerstrasse 38, 1090 Vienna, Austria; E-Mail: guenther.lamprecht@univie.ac.at

² Karl Franzens University, Department of Medicine, Division of Cardiology, Graz, Austria

Key Words

Column liquid chromatography
Enantiomer separation
Column switching
Teicoplanin column
Carvedilol

Summary

An HPLC column-switching method has been developed and validated for the enantioselective determination of (*R*)- and (*S*)-carvedilol in human plasma. Sample preparation was performed either off-line, by extraction with trichloromethane and back-extraction into 0.01 M aqueous citric acid which was injected on to a LiChrosorb RP 8 column, or on-line, by injecting diluted (0.1 M formic acid) plasma on to a LiChrosorb ADS column. In both instances separation was performed by gradient elution and on-line transfer of the fraction containing the carvedilol on to an enantioselective Teicoplanin column. The enantiomers of carvedilol were separated isocratically by use of methanol-acetonitrile-triethylammonium acetate, 70:30:0.05 (v/v/w), as mobile phase. With fluorescence detection the limits of quantitation were 0.30 ng mL⁻¹ for (*R*)-carvedilol and 0.26 ng mL⁻¹ for (*S*)-carvedilol; these were sufficient to enable investigation of the effect of exercise on plasma concentrations of (*R*)- and (*S*)-carvedilol after oral administration of either the racemate or the pure enantiomers.

Although the operating conditions were optimized for sample preparation by on-line deprotection on a LiChrospher RP 18 ADS column, the complete method was insufficiently rugged for analysis of large numbers of plasma samples – the enantioselectivity of the Teicoplanin column deteriorated too rapidly because of the transfer of enantioselectivity-poisoning interferences which could not be suppressed sufficiently. In contrast the liquid-liquid sample-extraction procedure combined with column switching resulted in a analytical method with long-term stability.

Introduction

Carvedilol [1[carbazolyl-(4-oxy)-3-[(2-methoxyphenoxyethyl)amino]-2-propanol],

Presented at Balaton Symposium '01 on High-Performance Separation Methods, Siófok, Hungary, September 2–4, 2001

an antihypertensive drug, is a non-selective β -adrenergic antagonist and blocker of α_1 -adrenoceptors used to treat hypertension, angina, and congestive heart failure [1–3]. It is also a powerful antioxidant [3–5] which can protect major organs (e. g. heart, kidneys, brain, vascula-

ture) from damage; this is advantageous in the treatment of chronic hypertension [6].

The chemical structure of carvedilol (Figure 1) contains one chiral centre, resulting in two enantiomers. Although both enantiomers are equally potent α_1 -adrenoceptor antagonists, β -blockade is exerted mainly by (*S*)-carvedilol [7].

Reported methods for analysis of the enantiomers of carvedilol are based either on liquid chromatography [8] or electrophoresis [9–12]. In some methods the enantiomers of carvedilol are derivatized with enantiomerically pure reagents such as (+)-(*R*)-phenylethyl isocyanate [13], 2,3,4,6-tetra-*O*-acetyl- β -D-glucopyranosylisothiocyanate (GITC) [14], or (+)-(*S*)-naproxen chloride [15] and separated 'indirectly' as diastereomers by HPLC. 'Direct' separation of underivatized carvedilol enantiomers has been accomplished on chiral stationary phases such as Chiralcel OF [8]. Separations by capillary electrophoresis have been performed in cyclodextrin- [9, 11] or polyacrylamide-coated [12] capillaries. Detection limits were rather low, but could be improved by use of laser-excitation fluorescence detection [9].

The aim of this study was development of an HPLC method for enantioselective analysis of (*R*)- and (*S*)-carvedilol in plasma. A newly developed macrocyclic antibiotic stationary phase based on Teicoplanin was used in a multidimensional column switching arrangement using, originally, either a restricted-access material (RAM) precolumn for injection of diluted plasma or a reversed-phase precolumn for sample solutions resulting from liquid-liquid extraction.

Original

Chromatographia Supplement Vol. 56, 2002

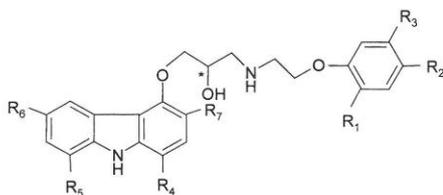
S-25

0009-5893/00/02

S-25-05

§ 03.00/0

© 2002 Friedr. Vieweg & Sohn Verlagsgesellschaft mbH



	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄	R ₅	R ₆	R ₇
Carvedilol (M0)	OCH ₃	H	H	H	H	H	H
M2	OH	H	H	H	H	H	H
M4	OCH ₃	OH	H	H	H	H	H
M5	OCH ₃	H	OH	H	H	H	H
M14	OCH ₃	H	H	OH	H	H	H
M16	OCH ₃	H	H	H	OH	H	H
M20	OCH ₃	H	H	H	H	OH	H
M21	OCH ₃	H	H	H	H	H	OH

Figure 1. The structures of carvedilol and its metabolites.

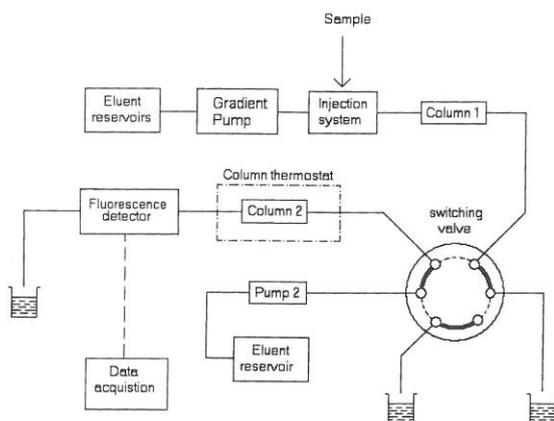


Figure 2. Schematic diagram of the system used for two-dimensional chromatography. Column 1 was RP8 or ADS, column 2 was Teicoplanin. The mobile phases and timed events used are listed in Tables I and II.

Experimental

Chemicals

(*R*)- and (*S*)-Carvedilol, (*R,S*)-carvedilol, and its metabolites were obtained from Hoffmann-La Roche (Basel, Switzerland). Triethylamine was purchased from Fluka, all other chemicals were from E. Merck (Darmstadt, Germany).

Sample Preparation

Sample preparation was performed either off-line by liquid-liquid extraction of the analytes or on-line by chromatographic separation of high-molecular-weight proteins.

Liquid-Liquid Extraction

Plasma (1.0 mL) was centrifuged (model Biofuge 28RS; Heraeus, Germany) at 15000 rpm (5 min) and an aliquot (250 μ L) was diluted with water (250 μ L).

The solution was extracted with chloroform (500 μ L) by means of a shaker (Mini shaker M1; IKA, Germany) operating at a frequency of 1300 min^{-1} (20 min). The layers were separated by centrifugation at 15000 rpm (20 min). Aqueous citric acid (0.1 M, 500 μ L) was added to the organic phase and the carvedilol enantiomers were re-extracted into the acidic aqueous phase by shaking at a frequency of 1300 min^{-1} (15 min). The layers were separated at 15000 rpm (20 min) and the aqueous solution was used for chromatography.

On-Line Sample Preparation

Plasma (1.0 mL) was centrifuged at 15000 rpm (5 min) and supernatant (100 μ L) was mixed with aqueous formic acid (0.1 M, 100 μ L) and injected directly on to the restricted-access material (RAM) column.

Chromatography

Separation of the carvedilol enantiomers was performed by two-dimensional liquid chromatography on a system coupling a reversed-phase or RAM column on-line with a Teicoplanin column. The arrangement used for column-switching is outlined schematically in Figure 2.

An aliquot (50 μ L) of the sample (either liquid-liquid extract or diluted plasma) was injected into the chromatograph, on to column 1, by means of an auto sampler (model AS-4000A; E. Merck). The sample for on-line sample preparation was separated on a short (30 mm \times 4 mm i. d.) LiChroCART LiChrosorb ADS column (E. Merck), that from liquid-liquid extraction on a 35 mm \times 4 mm i. d., 10 μ m particle size, LiChrosorb RP 8 column. Gradient elution of column 1 was performed by means of a gradient pump (model L-6200; E. Merck) at 1.0 mL min^{-1} (Tables I and II).

The fraction containing the carvedilol enantiomers was switched, by means of an electrically driven switching valve (model ELV 7000; E. Merck), on to an enantioselective Teicoplanin CSP-TE-SP-100 column (250 mm \times 4 mm i. d.), obtained from F. Gasparrini [16, 17]. This column was cooled to 5 $^{\circ}\text{C}$ by means of a column thermostat (Thermotechnik Products, Langenzersdorf, Austria). Separation of the enantiomers was achieved by means of an isocratic pump (model L-6000; E. Merck) at 1.0 mL min^{-1} (Tables I and II).

Detection was performed by fluorescence emission (Model F-1080 detector; E. Merck), by excitation at 247 nm (λ_{Ex}) and measurement of the emission at 344 nm (λ_{Em}). The detector signals were digitized by means of a chromatography data system (model 760; Nelson analytical, USA).

Calibration and Validation

Calibration of the system was performed by analysis of (*R,S*)-carvedilol dissolved in blank plasma samples in the concentration range 1.1–45 ng mL⁻¹ ($n = 5$) for each enantiomer.

Results and Discussion

Sample Preparation

For protection of the enantioselective Teicoplanin column and to maintain its resolving efficiency it was imperative to remove not only proteinaceous plasma components of high molecular-weight (e. g. proteins, lipoproteins, etc.) but also many of the lipids and other disturbing components. This can be achieved by a variety of methods, e. g. precipitation by acids, liquid-liquid extraction, solid-phase extraction, or by use of different on-line column switching arrangements.

On-Line Deproteinization

On-line deproteinization by use of restricted access media (RAM) is a sophisticated means of separating proteins of molecular mass >15 kDalton from analyte components during the chromatographic separation process [18–20]. Plasma samples can usually be injected directly without pretreatment and, because of the hydrophilic outer surface, proteins are barely retarded and are excluded from entering the pores. Small analytes, however, enter the pores and are retained by a reversed-phase mechanism. We have previously used this technique for successful determination of the very polar (*R*)- and (*S*)-atenolol [21]. (*R,S*)-Carvedilol is much more lipophilic and is strongly retained on the LiChrospher RP4 ADS and LiChrospher RP18 ADS columns. Both of these performed similarly and their sample clean-up properties were comparable. A blank reading of (*R,S*)-carvedilol was suppressed by slight acidification of the samples. Trans-

Table I. Column-switching timetable and events for the ADS column.

Time (min)	Event*
0.0	Injection of 50- μ L sample, start of linear gradient programme, Pump 1, Column 1: mobile phase 100% A, flow rate 1.0 mL min ⁻¹
10.0	Column 1, mobile phase 90% A + 10% B
13.0–16.2	Column 1, mobile phase 100% C
16.3	Column 1, mobile phase 100% B
17.0	Column 1 connected to column 2
20.0	Column 2 disconnected, start of Pump 2
20.0–28.0	Column 1, mobile phase 100% B
28.1–31.9	Column 1: linear gradient to 100% A
32.0	Re-equilibration of Column 1, mobile phase 100% A
42.0	End of cycle

* Mobile phases: A, 0.05% triethylammonium acetate; B, acetonitrile-0.05% triethylammonium acetate, 70:30 (v/v); C, 0.05% triethylammonium acetate-methanol, 90:10 (v/v).

Table II. Column-switching timetable and events for the RP 8 column.

Time (min)	Event*
0.0	Injection of 50- μ L sample, start of programme, Pump 1, Column 1: mobile phase 60% A + 40% B, flow rate 1.0 mL min ⁻¹
2.0	Start of linear gradient programme, Column 1, mobile phase 60% A + 40% B
12.0	Column 1 connected to column 2,
16.0	Column 2 disconnected, mobile phase 25% A + 75% B
16.1	Start of Pump 2, Column 2: mobile phase 100% B, flow rate 1.0 mL min ⁻¹
17.0–27.0	Column 1, mobile phase 100% C
27.1–31.9	Column 1: linear gradient to 60% B + 40% A
32.0	Re-equilibration of Column 1, mobile phase 60% A + 40% B
42.0	End of cycle

* Mobile phases: A, 0.05% triethylammonium acetate; B, methanol-acetonitrile-triethylammonium acetate, 70:30:0.05 (v/v/w); C, acetonitrile.

fer of the retained analytes to the enantioselective Teicoplanin column was performed by column switching (Figure 2), by application of a step gradient up to 80% acetonitrile. Although conditions for separation and column switching were optimized we could analyse few plasma samples before the separation efficiency of the enantioselective column decreased rapidly, necessitating time-consuming regeneration. We assumed that lipids and small lipoproteins, washed from the ADS column by the step gradient during the heart-cut transfer, severely contaminated the quite sensitive analytical column. Stable operating conditions could be achieved only by 20-fold reduction of the amount of sample loaded on to the ADS column; under these conditions, however, the limit of quantitation was unacceptable.

Although we devoted much effort to solving these problems, we were finally forced to develop an alternative method, liquid-liquid extraction, for sample preparation.

Liquid-Liquid Extraction

A method frequently used for sample preparation in the analysis of (*R*)- and (*S*)-carvedilol in biological samples is liquid-

liquid extraction with organic solvents then re-extraction into acidic aqueous solutions. Most methods reported in the literature use diethyl ether as solvent, because recoveries are high [2, 11, 14]. Handling of diethyl ether is, however, rather problematic – because of its high volatility an internal standard is required for precise quantitation. Our experience showed that recoveries achieved by use of trichloromethane were comparable, but that use of this solvent resulted in fewer problems, because of its high specific density. Recoveries from liquid-liquid extraction were between 96.6 and 108.0% for (*R*)-carvedilol and between 98.4 and 107.6% for (*S*)-carvedilol.

Two-Dimensional HPLC – First Dimension

As outlined above, use of an ADS column in the first dimension resulted in seriously limited long-term stability of the enantioselective column. A liquid-liquid extraction procedure was therefore developed and the aqueous sample solution was injected on to a short RP 8 column, on which a crude separation was achieved. Compared with the ADS column, carvedi-

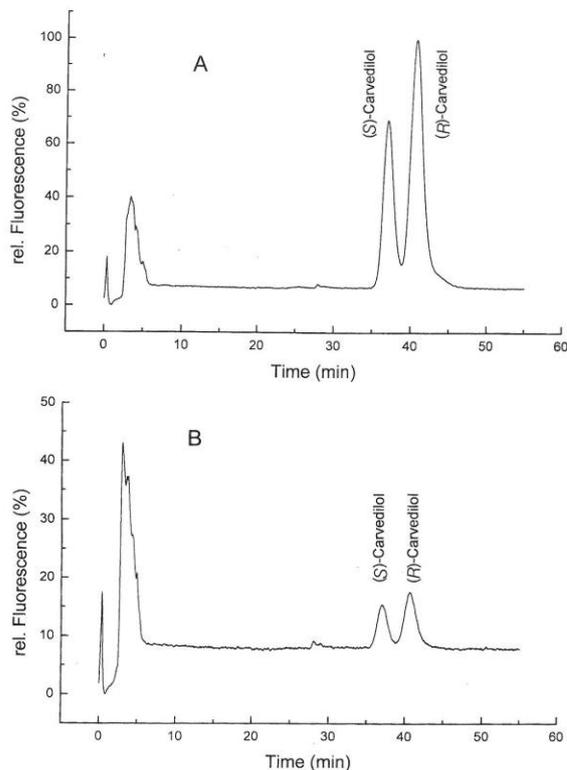


Figure 3. Separation of a transferred fraction of human plasma extract, containing high (A) and low (B) concentrations of (*R*- and (*S*)-carvedilol, on Teicoplanin CSP-TE-SP100. Concentrations: (A) 17.5 ng mL⁻¹ (*S*)-carvedilol, 29.5 ng mL⁻¹ (*R*)-carvedilol; (B) 2.2 ng mL⁻¹ (*S*)-carvedilol, 2.8 ng mL⁻¹ (*R*)-carvedilol.

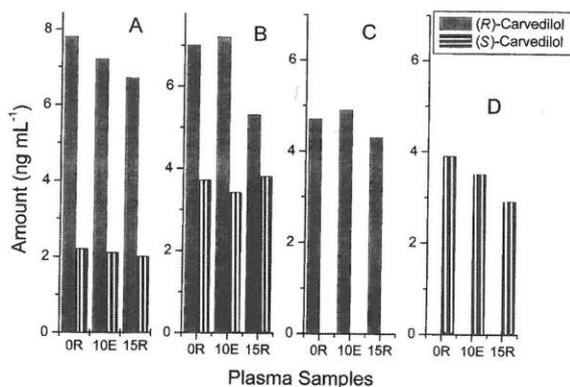


Figure 4. Plasma concentrations of (*R*- and (*S*)-carvedilol 3 h after oral administration of 25 mg (*R,S*)-carvedilol (A, B), 12.5 mg (*R*)-carvedilol (C), and 12.5 mg (*S*)-carvedilol (D) at rest (0R), after exercise for 10 min (10E), and after recovery for 15 min (15R). Samples A and B were from patients, C and D from healthy volunteers.

lol was more retained, and with a markedly better peak shape.

Optimization of the elution conditions with regard to transfer volume and separation efficiency was, however, im-

peded because enantioselectivity on the Teicoplanin column was strongly influenced by the composition of the mobile phase in the transfer zone, which was determined by the switching interval. For in-

stance, alkali metal and alkaline earth cations, counter-ions of many buffer salts, completely suppressed the resolution of the enantiomers and only ammonium salts could be used. Another condition affecting the separation of the enantiomers on the second column was mobile phase pH. Changing the pH of the mobile phase in the first dimension (first column) from 5.0 to 6.25 resulted in 25% improvement in the resolution of the enantiomers of carvedilol. Elution of carvedilol from the RP 8 column was performed with a linear gradient and a heart-cut transfer to the second column, thus achieving efficient separation from most accompanying and interfering components. The precolumn was replaced routinely after 50 samples to maintain the performance and enantioselectivity of the Teicoplanin column.

Two-Dimensional HPLC – Second Dimension

Separation of the (*R*) and (*S*) enantiomers of carvedilol transferred in the heart-cut fraction was performed isocratically. The enantiomers of carvedilol were well separated from each other and from several carvedilol metabolites we had tested as potential interferences (listed in Figure 1).

As expected, the enantioselectivity was influenced by temperature, and was better at lower temperatures. Reducing the temperature from 25 °C to 5 °C improved the resolution of the enantiomers by a factor of 1.87.

None of the plasma samples analysed resulted in matrix interferences and chromatograms such as those shown in Figure 3 were obtained routinely. It should, however, be mentioned that the time required for one analysis was rather long, although unattended analysis could be performed overnight to achieve acceptable sample throughput.

Application

The method described above was applied to the analysis of more than 400 human plasma samples. Patients suffering from essential arterial hypertension were treated with racemic (*R,S*)-carvedilol (25 mg) and the effect on plasma concentration was examined at rest and during exercise. Three hours after oral administration exercise was performed on a bicycle ergometer with increasing workload. Sam-

ples were taken before exercise, at the end of exercise, and after recovery for 15 min. Concentrations of (*R*)-carvedilol in plasma were generally higher than those of (*S*)-carvedilol; (*R*):(*S*) ratios were between 2 and 3 (Figures 4A, B).

Half-doses of enantiomerically pure (*R*)- and (*S*)-carvedilol were also administered and the same exercise procedure was followed (Figures 4C, D). The results indicated that exercise does not affect plasma concentrations of (*S*)-carvedilol. A detailed presentation of the relevant pharmacokinetic data, and discussion of the results in context with those from other beta-blockers, can be found elsewhere [22, 23].

Calibration and Validation

For 1.1–45 ng mL⁻¹ ($n = 5$) of each enantiomer correlation coefficients were >0.9993 for the linear calibration functions estimated. The corresponding regression functions were: for (*R*)-carvedilol, $y = 5.58 \times 10^{-7}x + 0.330$ ($r = 0.9994$); for (*S*)-carvedilol, $y = 5.95 \times 10^{-7}x + 0.337$ ($r = 0.9995$).

Limits of quantitation (*LOQ*) of 0.30 and 0.26 ng L⁻¹ were calculated for (*R*)- and (*S*)-carvedilol, respectively.

The reproducibility of the method varied between 3 and 8% for 4 ng L⁻¹ (*R*)-carvedilol and between 3 and 12% for the same concentration of (*S*)-carvedilol; the reproducibility for a concentration of

45 ng L⁻¹ was 3% for both enantiomers. For day-to-day reproducibility relative standard deviations were 5 and 9%, respectively, for 4 ng L⁻¹ (*R*)- and (*S*)-carvedilol, and 5% for both enantiomers at 45 ng L⁻¹ ($n = 5$).

Acknowledgement

The authors are obliged to Professor F. Gasparrini for providing the enantioselective Teicoplanin column.

References

- [1] McTavish, D.; Campoli-Richards, D.; Sorokin, E.M. *Drugs* **1993**, *45*, 232–258.
- [2] Gehr, T.W.B.; Tenero, D.M.; Boyle, D.A.; Qian, Y.; Sica, D.A.; Shusterman, N.H. *Eur. J. Clin. Pharmacol.* **1999**, *55*, 269–277.
- [3] Ruffolo, R.R.; Feuerstein, G.Z. *Cardiovasc. Drugs Ther.* **1997**, *11*, 247–256.
- [4] Feuerstein, G.Z.; Ruffolo, R.R. *Eur. Heart J. (Suppl. B)* **1996**, *17*, 24–29.
- [5] Feuerstein, G.; Yue, T.-L.; Ma, X.; Ruffolo, R. *Cardiovasc. Drug Rev.* **1994**, *12*, 85–104.
- [6] Feuerstein, G.Z.; Bril, A.; Ruffolo, R.R. *Am. J. Cardiol.* **1997**, *80*, 41L–45L.
- [7] Bartsch, W.; Sponer, G.; Strein, K.; Muller-Beckmann, B.; Kling, L.; Bohm, E.; Martin, U.; Borbe, H.O. *Eur. J. Clin. Pharmacol.* **1990**, *38*, 104–107.
- [8] Fujimaki, M.; Shintani, S.; Hakusui, H. *Drug Metab. Dispos.* **1991**, *19*, 749–753.
- [9] Behn, F.; Michels, S.; Laer, S.; Blaschke, G. *J. Chromatogr. A* **2001**, *755*, 111–117.
- [10] Ren, X.Q.; Dong, Y.Y.; Liu, J.Y.; Huang, A.J.; Liu, H.W.; Sun, Y.L.; Sun, Z.P. *Chromatographia* **1999**, *50*, 363–368.
- [11] Clohs, L.; McErlane, K.M. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **2001**, *24*, 545–554.
- [12] Oravcova, J.; Sojkova D.; Lindner, W. *J. Chromatogr. B* **1996**, *682*, 349–357.
- [13] Stahl, E.; Baumgartner, U.; Henke, D.; Scholmerich, J.; Mutschler, E.; Spahn-Langguth, H. *Chirality* **1993**, *5*, 1–7.
- [14] Eisenberg, E.J.; Patterson, W.R.; Kahn, G.C. *J. Chromatogr.* **1989**, *493*, 105–115.
- [15] Spahn, H.; Henke, W.; Langguth, P.; Schloos, J.; Mutschler, E. *Arch. Pharm.* **1990**, *323*, 465–469.
- [16] D'Acquarica, I.; Gasparrini, F.; Misti, D.; Villani, C.; Carotti, A.; Cellmare, S.; Muck, S. *J. Chromatogr. A* **1999**, *857*, 145–155.
- [17] Berthod, A.; Chen, X.; Kullman, J.P.; Armstrong, D.W.; Gasparrini, F.; D'Acquarica, I.; Villani, C.; Carotti, A. *Anal. Chem.* **2000**, *72*, 1767–1780.
- [18] Boos, K.-S.; Rudolph, A. *LC-GC* **1997**, *15*, 602–611.
- [19] Boos, K.-S.; Rudolph, A. *LC-GC* **1997**, *15*, 814–823.
- [20] Schafer, C.; Lubda, D.; Boos, K.-S.; Unger, K.K. *Bioforum Int.* **2001**, *5*, 120–123.
- [21] Lamprecht, G.; Kraushofer, T.; Stoschitzky, K.; Lindner, W. *J. Chromatogr. B* **2000**, *740*, 219–226.
- [22] Stoschitzky, K.; Zweiker, R.; Klein, W.; Zitta, S.; Gruber, L.; Lamprecht, G.; Lindner, W. *J. Cardiovasc. Pharmacol.* **2001**, in press.
- [23] Stoschitzky, K.; Koshucharova, G.; Zweiker, R.; Lercher, P.; Maier, R.; Klein, W.; Zitta, S.; Gruber, L.; Lamprecht, G.; Lindner, W. *Cardiovasc. Drugs Ther.* submitted for publication.

Received: Dec 6, 2001
Revised manuscript
received: Jan 4, 2002
Accepted: Feb 7, 2002

10 Lebenslauf

Leonhard Gruber

21. Oktober 1959 geboren in Mödling

- Bis 1974 Grundschulausbildung in Mödling
- 1974–1978 Fachschule für Elektrotechnik, Höhere Technische Lehranstalt -
Mödling
- 1978 Abschlussprüfung der Fachschule für Elektrotechnik
- Ab 1985 Berufsbegleitende Sekundäre und Tertiäre Ausbildung
- 1985–89 Bundesgymnasium und Bundesrealgymnasium für Berufstätige in
Wien 1150
- 1989 Matura
- Ab 1989 Studium der Chemie an der Universität Wien
- 1995/96 Studienaufenthalt in England, Universität Warwick
- 1999 Mitarbeit in der Arbeitsgruppe Ultrafast Dynamics an der Universität
Wien, bei Prof. Kauffmann
- 2000 Beginn der Diplomarbeit am Institut für Analytische Chemie der
Universität Wien bei Prof. Dr. Wolfgang Lindner mit dem Thema:
Enantioselektive Bioanalytik des Beta - Adrenozeptor - Antagonisten
Carvedilol und seiner Metaboliten in Blutplasma mittels HPLC -
Mehrsäulen Chromatographie