

## SEPARÁCIA ENANTIOMÉROV DIMETINDENU V LIEKCH KAPILÁRNOU IZOTACHOFORÉZOU\*

KUBAČÁK P., MIKUŠ, P., VALÁŠKOVÁ I., HAVRÁNEK E.

Univerzita Komenského v Bratislave, Farmaceutická fakulta, Katedra farmaceutickej analýzy a nukleárnej farmácie, SR

### SÚHRN

#### Separácia enantiomérov dimetindenu v liekoch kapilárnou izotachoforézou

Kapilárna izotachoforéza bola využitá na separáciu a stanovenie enantiomérov dimetindenu v rôznych liekových formách. Bolo preskúšaných niekoľko typov chirálnych selektorov vo viacerých elektrolytových systémoch s rôznym zložením a rôznym pH. Optimálny vodiaci elektrolyt bol tvorený 10 mmol/l octanom draselným a kyselinou octovou do výslednej hodnoty pH 4,8 s prídavkom 4 mmol/l karboxyetyl- $\beta$ -cyklodextrínu ako chirálneho selektora a 0,2% metylhydroxyetylcelulózy (m-HEC) na potlačenie elektroosmotického toku. Ako zakončujúci elektrolyt sa použil  $\beta$ -alanín s koncentráciou 5 mmol/l. Bola hodnotená presnosť, správnosť, linearita, robustnosť a selektivita vypracovanej ITP metódy. Predúprava vzorky pred analýzou spočívala v rozpustení a nariadení príslušnej liekovej formy s obsahom dimetindenu demineralizovanou vodou na požadovanú koncentráciu. Takto upravená vzorka bola priamo dávkovaná do prístroja.

**K l ú č o v é s l o v á:** izotachoforéza – chirálna separácia – dimetinden – liek – elektroforéza

**Čes. slov. Farm., 2006; 55, p. 32–35**

### SUMMARY

#### Separation of Dimetinden Enantiomers in Drugs by Means of Capillary Isotachopheresis

Capillary isotachopheresis was employed to separate and determine dimethinden enantiomers in various dosage forms. Several types of chiral selectors were tested in various electrolyte systems of different composition and different pH. The optimal leading electrolyte was composed of 10 mmol/l potassium acetate and acetic acid to achieve pH 4.8 with an addition of 4 mmol/l carboxyethyl- $\beta$ -cyclodextrin as the chiral selector and 0.2 % of methylhydroxyethylcellulose (m-HEC) to suppress the electroosmotic flow. The terminating electrolyte was  $\beta$ -alanine of a concentration of 5 mmol/l. The evaluation included the precision, correctness, linearity, robustness, and selectivity of the elaborated ITP method. The pretreatment of the sample prior to analysis consisted in the dissolution and dilution of the appropriate dimethinden-containing dosage form with demineralized water to achieve the required concentration. Such a pretreated sample was directly dosed into the apparatus.

**K e y w o r d s:** isotachopheresis – chiral separation – dimethinden – drug – electrophoresis

**Čes. slov. Farm., 2006; 55, p. 32–35**

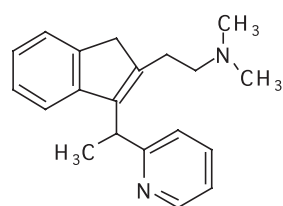
*Má*

H<sub>1</sub>-antihistaminikum dimetinden (obr. 1) [2-[1-[2-[(2-dimetylamino)etyl]inden-3-yl]etyl]pyridín] sa používa na liečbu bežných alergických reakcií. Z hľadiska chemickej štruktúry sa zaraďuje medzi silne účinné arylalkylamínové H<sub>1</sub>-antihistaminiká 1. generácie. Má stredne vyjadrený sedatívny účinok a bol u neho popísaný aj stabilizujúci účinok na membrány žírnych buniek. Inhibuje taktiež pôsobenie ďalších mediátorov včasnej hypersenzitívnej reakcie (serotonín a bradykinín), čím vyvoláva zníženie zvýšenej permeability kapilár. Okrem

liečby alergickej nádchy, urtikárie a angioedému sa jeho výrazný antipruriginózný účinok využíva pri liečbe rôznych kožných ochorení. Maximálny účinok dosahuje za 2–4 hodiny po aplikácii a 5–10 % absorbovaného množstva sa vylučuje nezmenené močom <sup>1)</sup>.

Separáciu enantiomérov dimetindenu sa doteraz zaoberalo niekoľko prác, a to najmä v maticiacich biologického pôvodu. Kapilárna zónová elektroforéza (CZE) bola použitá na stanovenie jeho enantiomérov v ľudskom moči <sup>2, 3)</sup>, sére a moči potkanov <sup>4)</sup> a pri štúdiu opačnej

\*Predchádzajúca časť: Čes. slov. Farm., 2005, 54, 231-234.



Obr. 1. Vzorec dimetindenu

migrácie enantiomérov dimetindenu vplyvom rôznych cyklodextrínov s využitím metód NMR <sup>5)</sup> a ionizačnej hmotnostnej spektroskopie a kryštalografie <sup>6)</sup>. Metódou CZE bol dimetinden chirálne separovaný spolu s inými bázickými liečivami s využitím metylovaného  $\beta$ -CD <sup>7)</sup> a bol tiež sledovaný vplyv organických aditív prídavných do základného elektrolytu na jeho chirálnu separáciu <sup>8)</sup>. Na stanovenie enantiomérov dimetindenu v biologickom materiále bola využitá aj metóda HPLC <sup>9-12)</sup>.

Cieľom našej práce bolo vypracovanie podmienok (zloženie a pH elektrolytového systému, typ a koncentrácia chirálneho selektora) pre separáciu a kvantifikáciu enantiomérov dimetindenu v troch jeho liekových formách (Fenistil® kapsule, Fenistil® kvapky a Fenistil® gél) metódou kapilárnej izotachoforézy (ITP) v jednej analýze, ako aj zhodnotenie validačných parametrov použitej metodiky.

## POKUSNÁ ČASŤ

### Chemikálie a roztoky

Použité roztoky vodiacich a zakončujúcich elektrolytov (ich zloženie je uvedené v tabuľke 1) boli získané z Chemického ústavu PRIF UK v Bratislave. Racemát dimetinden maleinát dodala MP Biomedicals, Inc., USA, Fenistil® kapsule (obsah dimetindenu 4mg v 1 kapsule), Fenistil® kvapky (obsah dimetindenu 1mg v 1ml roztoku) a Fenistil® gél (obsah dimetindenu 1mg v 1g gélu) boli od výrobcu Novartis Consumer Health SA, Nyon, Švajčiarsko. Nesubstituované cyklodextríny ( $\alpha$  a  $\beta$ ) a hydroxypropyl- $\beta$ -cyclodextrín (HP- $\beta$ -CD) boli získané z Aldrich Co. (Steinheim, Nemecko) a karboxyetyl- $\beta$ -cyclodextrín (CE- $\beta$ -CD) od CycloLab Ltd. (Budapešť, Maďarsko). Voda používaná na prípravu roztokov bola demineralizovaná reverznou osmózou na stĺpci zmesného ionexu zariadením Rowapur a dočistená zariadením Ultrapur (obidva Premier, Arizona, USA).

### Príprava vzoriek

Obsah desiatich kapsúl s obsahom dimetindenu bol zväžený a následne homogenizovaný. Množstvo zmesi zodpovedajúce 8 mg dimetindenu bolo suspendované v 40 ml demineralizovanej vody po dobu 24 hodín. 5 ml tejto suspenzie bolo podrobené centrifugácii (5000 ot/min) po dobu 10 min a po nariadení supernatantu na výslednú koncentráciu 100 mg/l dávkané (30  $\mu$ l) priamo do prístroja cez jednorázový membránový filter (veľkosť pórov 1,2  $\mu$ m).

10 g gélu (obsahujúce 10 mg dimetindenu) sa rozpustilo v 50 ml demineralizovanej vody. Z tohto roztoku sa pred analýzou pripravili merané vzorky riedením vodou na výslednú koncentráciu 100 mg/l a priamo dávkané do prístroja cez jednorázový membránový filter (1,2  $\mu$ m).

Tab. 1. Zloženie elektrolytových systémov

Vodiaci elektrolyt	ES 1	ES 2
rozpušťač	H <sub>2</sub> O	H <sub>2</sub> O
vodiaci kation	K <sup>+</sup>	K <sup>+</sup>
koncentrácia (mmol/l)	10	10
protiión	CH <sub>3</sub> COOH	CH <sub>3</sub> COOH
pH	4,8	4,8
aditívum	m-HEC	m-HEC
koncentrácia (% w/v)	0,2	0,2
chirálny selektor	-	CE- $\beta$ -CD
koncentrácia (mmol/l)	-	4
Zakončujúci elektrolyt		
rozpušťač	H <sub>2</sub> O	H <sub>2</sub> O
zakončujúci kation	$\beta$ -alanín	$\beta$ -alanín
koncentrácia (mmol/l)	5	5

Kvapky s obsahom dimetindenu boli riedené priamo pred analýzou na požadovanú koncentráciu (100 mg/l) a dávkané priamo do prístroja.

### Prístroje

Izotachoforetické merania boli uskutočnené na prístroji CS Isotachophoretic Analyser (Villa-Labeco, Spišská Nová Ves, SR) v jednodolínovom usporiadaní (dĺžka 160 mm, vnútorný priemer 800  $\mu$ m) a vodivostnou detekciou. Zber dát a vyhodnocovanie výsledkov bolo realizované počítačom. ITP analýzy boli uskutočnené v kationickom režime s priamym injektovaním vzoriek, dávkaný objem 30  $\mu$ l, hnací prúd 250  $\mu$ A, teplota laboratórna, dĺžka analýzy 11 minút.

## VÝSLEDKY A DISKUSIA

V práci boli sledované podmienky pre separáciu a stanovenie enantiomérov dimetindenu metódou kapilárnej izotachoforézy (ITP). Keďže ide o bázické liečivo, merania boli robené v kationickom režime, pričom výber elektrolytových systémov líšiacich sa zložením a pH vychádzal z práce <sup>13)</sup>. V týchto systémoch sa optimalizoval typ a koncentrácia chirálneho selektora vzhľadom na čo najväčšiu enantioseparačnú účinnosť. Keďže pri hodnotách pH vodiaceho elektrolytu menších ako 4,4 dochádzalo pri použití chirálneho selektora s koncentráciou potrebnou na enantioseparáciu dimetindenu k posunu zóny analytu do zóny zakončujúceho iónu (pri menších koncentráciách chirálneho selektora dimetinden migroval v samostatnej zóne, ale chirálne nerozseparovaný), bol pre ďalšie merania vybraný elektrolytový systém s hodnotou pH vodiaceho elektrolytu 4,8 (ES 1 v tabuľke 1). Tento systém sa používal pre achirálnu separáciu dimetindenu.

Ako chirálne selektory boli skúšané nesubstituované cyklodextríny ( $\alpha$ -CD s koncentráciou 1–50 mmol/l a  $\beta$ -CD s konc. 1–10 mmol/l, a tiež substituované cyklodextríny (neutrálny HP- $\beta$ -CD s konc. 1–50 mmol/l

Tab. 2. Hodnotenie presnosti ITP metódy stanovenia enantiomérov dimetindenu v elektrolytovom systéme č. 2 pri dávkovaní 30  $\mu$ l štandardného roztoku racemátu dimetindenu s koncentráciou 100 mg/l

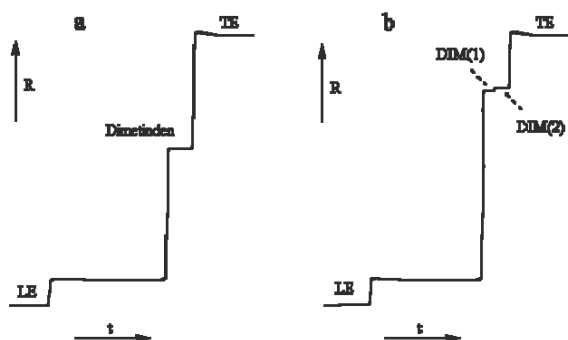
Relatívna smerodajná odchýlka $s_r$ (%), n = 6				
	opakovateľnosť		reprodukovateľnosť	
	enantiomér 1	enantiomér 2	enantiomér 1	enantiomér 2
relatív. výška skoku (RSH)	0,49	0,55	0,61	0,42
dĺžka zóny	0,75	0,63	0,82	0,77

Tab. 3. Stanovenie dimetindenu a pomeru jeho enantiomérov v jednotlivých liekových formách v elektrolytovom systéme č. 2

Lieková forma	deklarovaný obsah	stanovený obsah	relat. smer. odch. $s_r$ (%)	pomer enantiomérov (%)	
				enantiomér 1	enantiomér 2
Fenistil® kapsule	4 mg/1 kapsulu	98,87	1,93	49,12	50,88
Fenistil® kvapky	1 mg/1 ml kvap.	99,68	0,91	49,24	50,76
Fenistil® gél	1 mg/1 g gélu	101,89	1,04	48,97	51,03

Tab. 4. Hodnoty výťažnosti ITP metódy zistené štandardným prídavkom dimetindenu do liekových foriem v elektrolytovom systéme č. 1 (achirálny) a č. 2 (chirálny)

lieková forma	Pridané množstvo (mg/l)	stanovené množstvo (mg/l) $\pm s_r$ (%)		výťažnosť (%)	
		achirálny	chirálny	achirálny	chirálny
Fenistil® kapsule	50	49,05 $\pm$ 1,82	48,83 $\pm$ 1,57	98,10	97,66
Fenistil® kvapky	50	49,54 $\pm$ 1,75	48,94 $\pm$ 1,89	99,08	97,88
Fenistil® gél	50	49,48 $\pm$ 1,53	49,06 $\pm$ 1,92	98,97	98,12



Obr. 2. Izotachoforeogramy vodných roztokov lieku Fenistil® kvapky v elektrolytovom systéme č. 1 (a) a č. 2 (b) Koncentrácia dimetindenu 100 mg/l, dávkovaný objem 30  $\mu$ l, hnačí prúd 250  $\mu$ A, DIM(1) a DIM(2) – enantioméry dimetindenu, LE – vodiaci elektrolyt, TE – zakončujúci elektrolyt, R, t – rastúci odpor a čas

a nabitý CE- $\beta$ -CD s konc. 1-6 mmol/l, ktorý mal hodnotu náboja opačnú ako analyt, takže migroval opačným smerom). Použitie  $\alpha$ -CD,  $\beta$ -CD a HP- $\beta$ -CD ako chirál-

ných selektorov vo všetkých skúšaných koncentráciách sa ukázalo ako nevhodné, pretože síce dochádzalo k ich interakcii s dimetindenom, ale nie k jeho chirálnej separácii ( $\alpha$ -CD a  $\beta$ -CD) alebo bola enantioseparácia nedostatočná (HP- $\beta$ -CD). Najlepšie výsledky boli dosiahnuté použitím CE- $\beta$ -CD s koncentráciou 4 mmol/l (pri jeho koncentrácii menšej ako 2 mmol/l nedochádzalo k enantioseparácii dimetindenu a pri jeho koncentrácii väčšej ako 6 mmol/l dimetinden migroval v zóne zakončujúceho iónu), takže pre separáciu enantiomérov dimetindenu sa používal elektrolytový systém s prídavkom CE- $\beta$ -CD (ES 2 v tabuľke 1).

Po optimalizácii separačných podmienok boli hodnotené niektoré validačné parametre (linearita, presnosť, správnosť, robustnosť, limit detekcie a kvantifikácie) navrhutej ITP metódy. Linearita bola hodnotená na piatich rôznych koncentráciách v rozsahu kalibračných meraní 40 až 200 mg/l pre každý enantiomér dimetindenu. Vyhodnotením kalibračných závislostí  $y = a + bx$  ( $a$  – úsek na osi  $y$ ;  $b$  – smernica priamky) boli získané regresné rovnice  $y = -0,0846 + 0,1183x$  (enantiomér 1) a  $y = -0,0713 + 0,1224x$  (enantiomér 2), s hodnotou korelačného koeficientu 0,9994 pre obidve priamky, čo potvrdzuje dobrú linearitu kalibračných závislostí.

Presnosť izotachoforetického stanovenia bola hodno-

tená na základe opakovaných stanovení (n=6) roztoku štandardu (racemát dimetindenu) s koncentráciou 100 mg/l, pričom vzorky boli analyzované v priebehu jedného dňa s použitím rovnakých pracovných roztokov. Pre posúdenie reprodukovateľnosti boli pripravené a analyzované vzorky (n=6) za rovnakých pracovných podmienok. Analýzu vykonával iný pracovník, za použitia iných roztokov, ktorých zloženie však bolo rovnaké ako v predchádzajúcom prípade. Merania boli robené na dvoch prístrojoch, líšiacich sa dĺžkami kapilár. Tolerancia hodnôt pH elektrolytových systémov bola  $\pm 0,4$  jednotky. Týmto bola zároveň overená robustnosť metódy. Relatívne smerodajné odchýlky (s.) hodnotenia presnosti ITP stanovení jednotlivých enantiomérov sú uvedené v tabuľke 2.

Detekčný limit pre stanovenie enantiomérov dimetindenu dosiahnutý za pracovných podmienok, pri ktorých sa analyzovali reálne vzorky, má hodnotu 9 mg/l pre obidva enantioméry a za medzu stanovenia možno pokladať koncentráciu 18 mg/l taktiež pre obidva enantioméry.

Validovaná metóda bola použitá na stanovenie celkového množstva dimetindenu a pomeru jeho enantiomérov v troch liekových formách (Fenistil® kapsule, Fenistil® kvapky a Fenistil® gél), pričom výsledky jednotlivých stanovení sú uvedené v tabuľke 3. Správnosť metódy je vyjadrená ako výťažnosť (%), ktorá bola hodnotená kompletnou analýzou šiestich modelových vzoriek metódou štandardného prídavku (50 %). Výsledky analýz uvádza tabuľka 4. Keďže hodnoty výťažnosti boli blízke 100 %, môžeme metódu považovať za správnu.

Obrázok 2 uvádza príklady reálnych izotachoforeogramov vodných roztokov lieku Fenistil® kvapky v elektrolytovom systéme č. 1 (a) a č. 2 (b). Z uvedených záznamov je zrejmé, že za daných pracovných podmienok neinterferujú žiadne iné zložky prítomné v analyzovaných vzorkách, čo potvrdzuje selektivitu stanovenia.

Z dosiahnutých výsledkov vyplýva, že nami navrhnutá metodika je jednoduchá, rýchla, presná, selektívna a poskytuje reprodukovateľné výsledky. Výhodou je nielen krátky čas analýz a minimálna predúprava vzorky, ale

aj nízke prevádzkové náklady a tiež nízka spotreba chirálneho selektora, čo robí z navrhnutej ITP metódy dobrú alternatívu k bežne používaným analytickým metódam. Potenciál metódy spočíva taktiež v jej možnosti použitia ako prekoncentračnej a preseparačnej techniky pri on-line spojení s inými metódami, najmä CZE.

Práca je súčasťou výskumného programu podporovaného v rámci grantových úloh č. 1/1196/04 a č. 1/2310/05 grantovou agentúrou MŠ SR VEGA.

## LITERATÚRA

1. **Vávrová, H.:** Remedica, 2001; 11, 47-54.
2. **Heuermann, M., Blaschke, G.:** Pharmazie, 1993; 48, 74-75.
3. **Heuermann, M., Blaschke, G.:** J. Pharm. Biomed. Anal., 1994; 12, 753-760.
4. **Rudolf, J., Blaschke, G.:** Enantiomer, 1999; 4, 317-323.
5. **Chankvetadze, B., Schulte, G., Bergenthal, D., Blaschke, G.:** J. Chromatogr. A, 1998; 798, 315-323.
6. **Chankvetadze, B., Pintore, G., Burjanadze, N. et al.:** J. Chromatogr. A, 2000; 875, 455-469.
7. **Matsunaga, H., Tanimoto, T., Haginaka, J.:** J. Sep. Sci., 2002; 25, 1175-1182.
8. **Van Eeckhaut, A., Detaevernier, M. R., Crommen, J., Michotte, Y.:** J. Sep. Sci., 2004; 27, 21-27.
9. **Radler, S., Blaschke, G.:** J. Chromatogr. B, 1991; 567, 229-239.
10. **Radler, S., Wermeille, M., Blaschke, G.:** Arzneimittel-Forsch, 1995; 45, 1086-1092.
12. **Prien, D., Blaschke, G.:** J. Chromatogr. B, 1997; 688, 309-318.
13. **Kubačák, P., Mikuš, P., Valášková, I., Havránek, E.:** Čes. slov. Farm., 2005, 54, 231-234.

Došlo 29. 8. 2005.

Pijato ke zveřejnění 27. 10. 2005.

PharmDr. Peter Kubačák  
Odbojárov 10, 832 32 Bratislava, SR  
e-mail: kubacak@fpharm.uniba.sk