

**CHIRAL AND NON CHIRAL DETERMINATION OF DOPA BY CAPILLARY
ELECTROPHORESIS**

M.Blanco and I.Valverde

Departamento de Química, Unidad de Química Analítica, Universidad Autónoma de Barcelona, E-08193

Bellaterra, Barcelona, España.

ABSTRACT

Se evalúa la capacidad de la electroforesis capilar para la determinación de la pureza enantiomérica de la levodopa en un fármaco que contiene también benserazida. Para ello se propone una separación de los componentes del fármaco en medio aquiral que permite determinar la cantidad de Dopa total y de benserazida. Una optimización de los parámetros que afectan a la resolución de los enantiómeros de la Dopa mediante un eter corona quiral permite obtener la resolución suficiente para determinar el contenido de dextrodopa (distómero) que contiene la levodopa (eutómero) usada en un fármaco. A pesar del orden de migración desfavorable de los enantiómeros, el método propuesto permite determinar un 0.5% del distómero en el fármaco.

Introduction

La Chiral Capillary Electrophoresis ha recibido una importante atención y ha sido aplicada con éxito a la separación de enantiómeros de una gran variedad de compuestos¹. Estas separaciones quirales se llevan a cabo básicamente en el modo de electroforesis capilar de zonas o en el modo micelar añadiendo al BGE un selector quiral que discrimina entre los enantiómeros. La aplicación de distintos selectores quirales^{2,3} como las ciclodextrinas, éteres corona quirales, dextrinas, sales biliares, complejos metálicos o calixarenos quirales ha sido descrita.

El enantiomerismo es un fenómeno de gran importancia en el campo farmacéutico pues los enantiómeros de un fármaco pueden exhibir propiedades farmacológicas y toxicológicas distintas⁴. El eutómero es el enantiómero que posee la actividad farmacológica deseada mientras que el distómero puede ser inactivo o tóxico. Nowadays, the general policy is to promote la comercialización de nuevos fármacos marketed as single enantiomer⁵ wherever this is possible, con el objetivo de reducir la dosis de fármaco cuando el distómero es inactivo, lo que se conoce como lastre isomérico (isomeric ballast), o evitar efectos secundarios cuando el distómero es tóxico. En consecuencia, la industria farmacéutica requiere métodos analíticos para controlar la pureza enantiomérica de principios activos basados en técnicas rápidas, sensibles y selectivas.

Sin embargo, la aplicación de la CE a la determinación de la pureza enantiomérica ha sido escasa debido a que es necesario una elevada resolución entre los enantiómeros así como una alta sensibilidad⁶. La aplicación a muestras reales (materia prima, fármacos, metabolitos en fluidos biológicos) es aún menor porque entonces existen problemas de interferencia de la matriz¹. En el caso de preparados farmacéuticos, puede haber interferencias por parte de los excipientes o de otros principios activos en el fármaco.

La L-Dopa o levodopa [(3,4-dihidroxifenil)-L-alanina] es una catecolamina usada para combatir la enfermedad de *Parkinson* (see Figure 1) que se administra en forma enantioméricamente pura ya que la mezcla racémica causa efectos secundarios como disquinesia y granulocytopenia⁷. In order

to prevent its decarboxylation in the extracerebral tissues and to prolong its antiparkinsonian effect, it is formulated with an inhibitor of Dopa-decarboxylase. The benserazide (DL-Serine 2-[(2,3,4-trihydroxyphenyl)methyl]hydrazine) is one of these inhibitors. Although it has been described that the separation of the enantiomers of Dopa in CE using chiral crown ethers⁸ and cyclodextrins⁹ no quantitative application exists that proposes the determination of its enantiomeric purity in a drug. The only application of this type reported in the bibliography uses the chiral HPLC ligand-exchange¹⁰.

In this work we study the development of an analysis method of a pharmaceutical preparation by CE that allows determining the content of Dopa in a drug (which also contains benserazide) as well as the chiral impurity of dextrodopa. For this, the separation conditions are established and then optimized. Finally, the possibility of determining the enantiomeric purity of levodopa with the proposed method is evaluated.

2. EXPERIMENTAL

2.1 Apparatus

Measurements were made on a Hewlett-Packard ^{3D}CE HPCE instrument (Waldbronn, Germany) equipped with a diode array detector. Hydrodynamic injection at the anode applying 50 mbars during 5 seconds was used in all the experiments. The separations were performed by using fused silica capillary (Sugelabor, Spain) with 50 μ m I.D and an effective length of 56 cm or for improving the sensitivity a light path extendedX3 capillary from Hewlett-Packard with the same length and I.D. The experimental set-up included also a Selecta ultrasonic bath, a Crison micropH 2001 pH meter and Alresa centrifuge.

2.2 Reagents

Benserazide, Dopa (levo-, dextro- and the racemate), β -cyclodextrin, γ -cyclodextrin and heptakis(2,3,6)-tri-*o*-methyl- β -cyclodextrin were purchased from Sigma. Carboxymethyl- β -cyclodextrin, 2-hydroxypropyl- β -cyclodextrin, (+)-(18-Crown-6)-2,3,11,12-tetra-carboxylic acid and TRIS (Tris(hydroxy-methyl)-aminomethane) were purchased from Fluka. Citric acid monohydrate was from Merck. The BGE was prepared as follows: 0.121 grams of TRIS were weighted, adjusted with citric acid 0.1 M hasta el pH deseado, the solution made up to 100 ml with Milli-Q water and filtered. De esta manera, la composición del BGE es 10 mM TRIS y aproximadamente 75 mM ácido cítrico. Dopa and Benserazide solutions were prepared in HCl 0.1M and protected from light in order to prevent its oxidation

2.3 Procedure

Las separaciones se llevaron a cabo en el tampón TRIS-citrate antes descrito al que se añadieron cantidades apropiadas del selector quiral y del modificador orgánico según fuera necesario. Before each injection, the capillary was flushed with 3 min of the BGE and equilibrated at 30 kV for 3 minutes. After the injection, a voltage of 30 kV was applied (direct polarity) and the electropherogram was recorded. Finally, the capillary was flushed with 0.1M NaOH and water for 3 minutes each one. The analytes were detected at 198 and 230 nm and the capillary temperature was set at 15°C (otherwise noted).

2.4 Samples

For the analysis of Madopar® 250 (Roche), ten tablets were ground and 0.2 grams were suspended with 30 ml of HCl 0.1 M. The suspension was sonicated for 10 min and centrifuged at 3000 r.p.m for 5 minutes. The solution was then filtered and diluted to 100 ml with HCl 0.1 M.

3.Results

El insuficiente intervalo lineal de respuesta de los instrumentos impide la determinación conjunta de los dos enantiómeros en el análisis de pureza enantiomérica en productos de elevado exceso enantiomérico¹¹. El problema se resuelve con dos inyecciones distintas¹²: una con una muestra muy concentrada para determinar el enantiómero minoritario y otra más diluida para determinar el mayoritario. En este trabajo se propone una metodología distinta: por un lado, se determina el contenido total del analito en un medio aquiral y por otro lado la determinación del distómero se lleva a cabo en un medio quiral.

Esta metodología presenta la ventaja que la separación de la muestra en condiciones aquirales permite proponer un método de análisis de benserazida y Dopa en el fármaco y un ahorro de selector quiral. Posteriormente, la adición del selector quiral al medio, permite obtener el contenido del distómero. Por tanto la determinación de Dopa total y dextrodopa puede realizarse en unas condiciones parecidas lo que facilita la aplicación del método.

3.1 Determinación aquiral de Dopa

Se propone un BGE de pH ácido para asegurar que benserazida y Dopa se encuentran en forma de cationes. Se ensaya la separación en un BGE TRIS/citrate a pH 2.5. En estas condiciones ambos analitos se protonan y migran antes que el flujo electrosmótico. La resolución entre los analitos es excelente y superior a la obtenida en el único trabajo reportado¹³ para su separación mediante CE (figura 2). Se ensayan valores de pHs superiores pero los resultados no mejoran y los tiempos de análisis se alargan a causa de la desprotonación del grupo ácido de la Dopa.

Las rectas de calibración se han preparado registrando los electroferogramas de mezclas sintéticas de benserazida y levodopa a 230 nm, donde ambos analitos presentan absorción, usando el área corregida por el tiempo de migración frente a la concentración. Las figuras de mérito de la calibración se presentan en la tabla 1. Los resultados muestran una buena correlación y la ausencia de errores sistemáticos en la calibración ya que las ordenadas en el origen no son

estadísticamente significativas. Se analizan por duplicado alicuotas de 2 muestras molturadas (diferentes lotes) y los resultados muestran buena concordancia entre sí y con los valores etiquetados (table 2).

3.2 Separación quiral de Dopa

Se investiga la separación quiral de los enantiómeros de la Dopa por adición al BGE de distintos selectores quirales. La Dopa posee un grupo aromático que favorece su inclusión dentro de la cavidad hidrofóbica de las ciclodextrinas y la presencia de carga positiva en su estructura hace probable su interacción con una ciclodextrina aniónica. No obstante, ninguna de las ciclodextrinas neutras ensayadas ((β -ciclodextrina, γ -ciclodextrina, heptakis(2,3,6)-tri-*o*-methyl)- β -ciclodextrin, 2-hidroxipropil- β -ciclodextrina) consigue separar los enantiómeros de la Dopa. Los resultados son también negativos con una ciclodextrina aniónica como la carboxymethyl- β -ciclodextrina.

Se ensaya el (+)-(18-crown-6)-2,3,11,12-tetracarboxylic acid (18C6H₄) como selector quiral ya que este selector posee una gran capacidad de enantiodiscriminación de aminas primarias aunque presenta el inconveniente que la composición del BGE influye en la enantioseparación. Debe evitarse la presencia de cationes sodio y potasio en el medio por que compiten con el analito por la cavidad del éter e inhiben su enantiodiscriminación. El tampón usado en la separación aquiral es compatible con el uso de este selector quiral aunque TRIS sea una amina primaria ya que su constante de inclusión es muy reducida¹⁴. El 18C6H₄ a una concentración 10 mM consigue resolver los enantiómeros de la Dopa. The migration order of the studied enantiomers was verified by analyzing the racemic mixtures enriched with the L-isomers. The D-isomer (distomer) migrates slower than the L-isomer (eutomer) indicating that D-Dopa forms the strongest complex with the chiral crown ether.

La determinación de purezas enantioméricas exige una elevada resolución quiral para evitar el solapamiento que produce la elevada concentración del enantiómero mayoritario. Es necesario realizar una optimización de los parámetros que afectan a la resolución para obtener una

separación suficiente que permita la determinación del enantiómero minoritario. El aumento de la concentración de 18C6H₄ conduce a un aumento de la resolución quiral hasta un máximo (12 mM) a partir de la cual la resolución quiral se estabiliza e incluso se reduce por lo que se elige esta concentración de selector quiral para futuras separaciones.

El pH del BGE puede afectar a la resolución enantiomérica porque el 18C6H₄ es un ácido policarboxílico con valores de pK_a comprendidos entre 2.1 y 4.9. Se realizan experimentos a pHs ácidos con el fin de mantener totalmente protonado el grupo amino de la Dopa (pK_{a2}= 8.72) y se selecciona el intervalo de pH 2.5-4.5 para estudiar el efecto del grado de ionización del 18C6H₄. En este intervalo se obtienen valores de resolución próximos a 2 que disminuyen ligeramente al aumentar el pH. El resto de experiencias se llevan a cabo a pH 2.5 porque proporciona una separación enantiomérica ligeramente superior.

La presencia en el BGE de un solvente orgánico, como el metanol, hace variar la polaridad del medio y esto afecta en gran medida a los equilibrios Host-Guest. Este efecto se examina añadiendo al BGE porcentajes de este solvente orgánico entre el 0-25%. La presencia de metanol conduce a un aumento de la resolución quiral y de los tiempos de migración (figure 3). El aumento de la resolución con el porcentaje del MeOH se explica por una mayor inclusión del analito en la cavidad del éter. Esta inclusión se ve favorecida por la disminución de la polaridad del medio que intensifica las interacciones electrostáticas Host-Guest y por tanto favorece la complejación. En consecuencia, los tiempos de migración aumentan de 10 min (0% MeOH) hasta 20 min en un BGE conteniendo un 25% de MeOH. Se elige el 15 % de MeOH como el mejor porcentaje de modificador orgánico en un compromiso entre la resolución y el tiempo de análisis.

Otro factor que influye en la enantioresolución es la temperatura del capilar por lo que se estudia su efecto en el intervalo de 15 a 35°C. En general, la constante de inclusión disminuye al aumentar la temperatura para los complejos Host-Guest¹⁵ y esto se refleja en la resolución. Sin embargo, la reducción de la temperatura también conlleva un aumento de los tiempos de análisis porque

disminuye la movilidad electroforética de los analitos (figure 4). Con el fin de optimizar la resolución, se escoge 15 °C para futuras separaciones.

En las condiciones finalmente seleccionadas (pH 2.5, 12 mM 18C6H₄, 15% MeOH, 15°C) se obtienen resoluciones de los enantiómeros de la Dopa próximas a 4. Los enantiómeros de la benserazida se separan con una resolución de 9 y no interfieren con los de la Dopa. No obstante, el producto puro muestra una relación de áreas corregidas entre los enantiómeros de 60:40 que indica que la benserazida usada no es la forma racémica. Esta afirmación no se pudo corroborar por CE al no estar disponibles comercialmente los enantiómeros. El espectro de dispersión óptica rotatoria (ORD) muestra una señal negativa que confirma la existencia de un exceso enantiomérico en la benserazida usada en favor del enantiómero levorotatorio.

3.3 Pureza enantiomérica de la Dopa

La buena resolución conseguida para el racémico diluido de la Dopa permite ensayar la determinación de la pureza enantiomérica de la levodopa usada en el fármaco. La determinación de excesos enantioméricos elevados exige no solo una alta sensibilidad sino también una elevada resolución y ambos parámetros deben considerarse de forma conjunta.

Al separar mezclas sintéticas de dextrodopa a una concentración próxima a su límite de detección (hallado por inspección visual) y un exceso de levodopa, se observa una pérdida de resolución debido al ensanchamiento del pico del enantiómero mayoritario y la presencia de una cola y picos adicionales que impiden la determinación del enantiómero minoritario. Estos problemas ya han sido reportados en la literatura¹⁶ y son debidos a una sobrecarga del capilar y a problemas de adsorción.

Por tanto la pureza enantiomérica máxima que puede determinarse está limitada por el límite de detección de un enantiómero en presencia del otro más que por el límite de detección de la técnica¹. Este límite de detección relativo (RLD) se define según la ecuación:

$$\text{RLD} = \frac{\text{LD}_{\text{Min}}}{C_{\text{Maj}}^{\text{Max}}} \times 100 \quad (1)$$

Donde LD_{Min} es el límite de detección de la técnica para el enantiómero minoritario y $C_{\text{Maj}}^{\text{Max}}$ la concentración máxima del enantiómero mayoritario que se puede inyectar sin que aparezcan problemas de resolución, solubilidad o alteraciones de la forma del pico provocados por adsorción, sobrecarga etc. Para mezclas de excesos enantioméricos elevados, el RLD así definido, es una medida de la impureza enantiomérica mínima que puede ser determinada.

Con el fin de reducir el límite de detección del método, los analitos se detectan en un capilar de camino óptico extendido y a 198 nm donde presentan una alta absorbancia. En nuestro caso, el límite de detección de la dextrodopa ($\text{LD}_{\text{D-Dopa}}$) se estima a partir de los parámetros de la recta de calibrado para la dextrodopa a bajas concentraciones. Se obtiene un valor aproximado de 110^{-5}M que coincide bien con el hallado por inspección visual. La concentración máxima del eutómero que puede ser inyectada ($C_{\text{Maj}}^{\text{Max}}$) se determina inyectando varias disoluciones de levodopa en un intervalo de concentraciones entre 10-50 mM. Los experimentos muestran que a concentraciones superiores a 10 mM, el pico de levodopa aparece con cola y con picos adicionales que impiden la determinación de la dextrodopa y se toma este valor como $C_{\text{Maj}}^{\text{Max}}$. La aplicación de la ecuación 1 conduce a un límite de detección relativo del 0.1%.

La pureza enantiomérica del fármaco se ha determinado inyectando una disolución del fármaco con una concentración de levodopa aproximadamente de 10 mM. La impureza de dextrodopa está perfectamente resuelta del pico mayoritario y se determina un contenido del 0.5% de dextrodopa en el fármaco (figura 5). Este valor es concordante con los reportados por Husain et al.¹⁰ en el

análisis de la pureza enantiomérica de la levodopa en fármacos mediante Chiral HPLC. Este análisis también muestra una relación de áreas corregidas entre los enantiómeros de la benserazida de 70:30 que indica que este producto posee una relación enantiomérica diferente a la benserazida de Sigma.

El RLD, y por tanto la pureza enantiomérica máxima determinable, viene afectado por el orden de migración de los enantiómeros. Esta afirmación se comprueba, en la situación inversa, cuando se determina la impureza de levodopa que acompaña a la dextrodopa utilizada en este trabajo. En este caso el orden de migración de los enantiómeros es más favorable y la C_{Maj}^{Max} de dextrodopa puede ser aumentada hasta 80 mM (valores superiores no son posible por falta de solubilidad) y no aparecen problemas de resolución o interferencias. Si tenemos en cuenta el límite de detección hallado para la levodopa (tabla 1) se calcula un RLD del 0.02 %

Con el fin de determinar la impureza de levodopa que contiene la dextrodopa utilizada se inyecta una disolución de este analito a una concentración 80 mM. Los resultados demuestran que la dextrodopa usada contiene un 0.05% del isómero levo. Se calcula entonces una pureza enantiomérica del 99.95% que concuerda con el valor mínimo de pureza enantiomérica indicada por el fabricante para la dextrodopa.

Conclusions

Se propone un método simple y rápido para la determinación de Dopa y benserazida en un fármaco comercial. La elevada resolución de los enantiómeros de la Dopa conseguida mediante el (+)-(18-Crown-6)-2,3,11,12-tetra-carboxylic permite aplicar el método a la determinación de purzas enantioméricas. Se propone el uso de un límite de detección relativo (RLD) para expresar la impureza quiral mínima determinable con el método propuesto. Se demuestra que el RLD en la determinación la dextrodopa contenida en levodopa es del 0.1% y que este parámetro depende del orden de migración de los enantiómeros. De esta manera, el RLD en la determinación de la impureza de levodopa contenida en dextrodopa disminuye hasta el 0.02%. El método establecido

se aplica a la determinación de la pureza enantiomérica de la levodopa en un fármaco y en el producto puro de dextrodopa. Los resultados muestran que la pureza enantiomérica de la levodopa en el fármaco es del 99.5% y del 99.95% para la dextrodopa .

Acknowledgments

The authors are grateful to Spain's DGICYT (project BQU2000-0234) for funding this research.

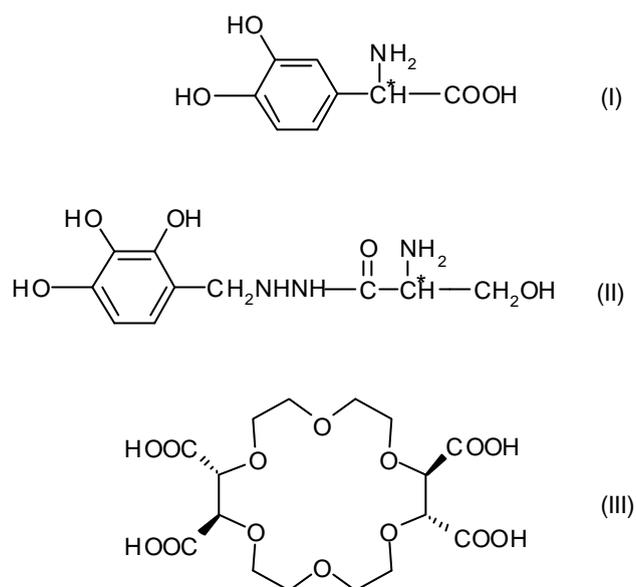


Figure 1. Chemical Structure of Dopa (I) , Benserazide (II) and 18C6H₄(III). The symbol * shows assymmetric carbons.

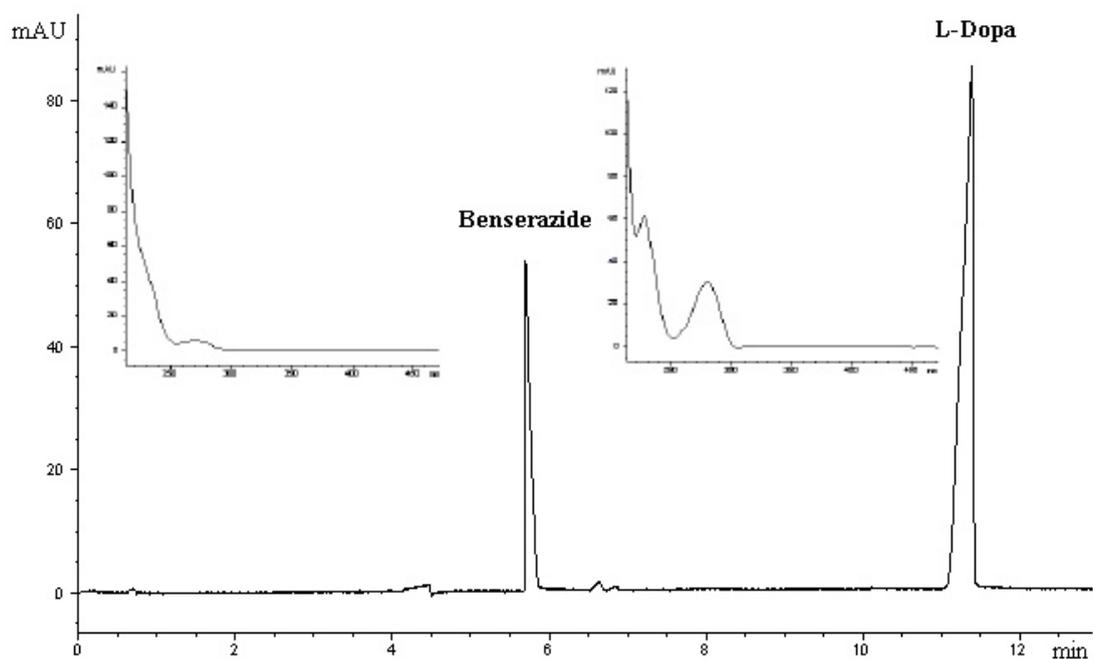


Figure 2. Electropherogram for the pharmaceutical preparation Madopar® 250. 10 mM TRIS/ Citric Acid pH 2.5, 25°C, 30kV. UV-Vis spectra for benserazide (left spectrum) and levodopa (right spectrum).

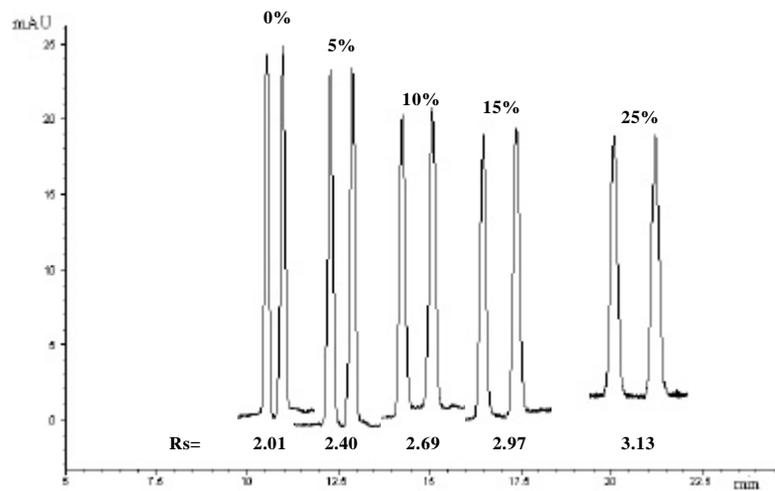


Figure 3. Variation on resolution and on migration times with methanol concentration. 10 mM TRIS/citric acid pH 2.5, 12 mM 18C6H₄, 30 kV.

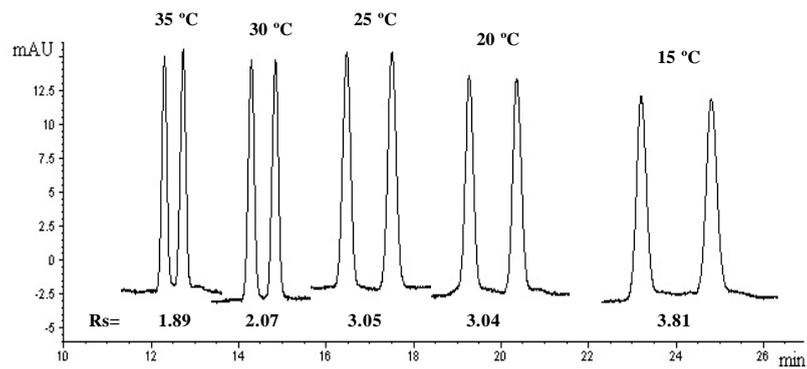


Figure 4. Variation on resolution and migration times of Dopa enantiomers with the temperature. 10mM TRIS/Citric Acid pH 2.5, 12 mM 18C6H₄, 15% MeOH.