

CHROM. 13,984

## Note

### Séparation des produits de décomposition du dimétindène sur Sephadex G-10 et LH-20

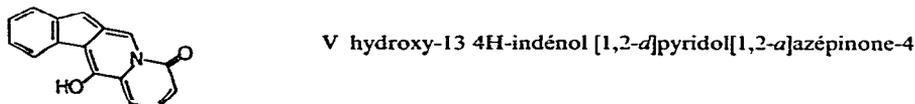
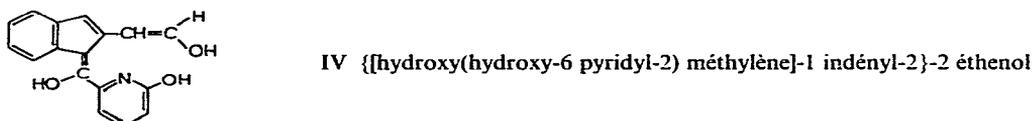
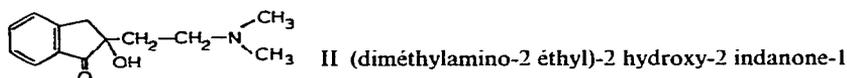
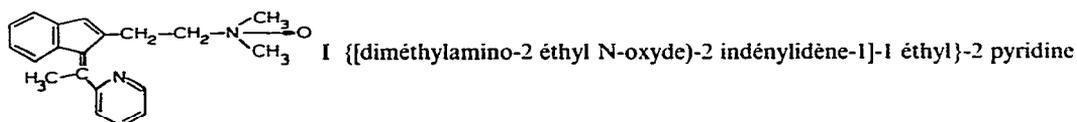
M. BUCHMANN et U. W. KESSELRING\*

École de Pharmacie, Université de Lausanne, 3 Pl. du Château, CH-1005 Lausanne (Suisse)

(Reçu le 28 janvier 1980; manuscrit modifié reçu le 12 mai 1981)

L'étude de stabilité du maléate de dimétindène a permis de mettre en évidence, par chromatographie sur couche mince<sup>1</sup>, 7 produits de décomposition importants.

Après séparation et purification sur Sephadex G-10 et LH-20, quatre substances ont pu être identifiées partiellement ou totalement<sup>2</sup>:



L'importance des autres produits de décomposition, p. ex. NF<sub>1</sub>, NF<sub>2</sub>, NF<sub>4</sub>, V10 et III de structure inconnue, est décrite en détail ailleurs<sup>3</sup>.

Le Sephadex LH-20, utilisé comme les autres gels de la série pour la séparation de macromolécules en fonction de leurs poids moléculaires a révélé, une fois de plus, ses intéressantes propriétés adsorbantes<sup>4,5</sup>, dues surtout à deux types d'interaction: les forces d'interactions hydrophobes et, secondairement, les liaisons hydrogène<sup>6-8</sup>.

TABLEAU I  
 SYSTÈMES CHROMATOGRAPHIQUES PERMETTANT LA SÉPARATION ET LA PURIFICATION DES PRODUITS DE DÉCOMPOSITION DU  
 DIMÉTINDÈNE

<i>Produits de décomposition; conditions expérimentales</i>	<i>Séparation préliminaire de I et IV</i>	<i>Élimination des impuretés soutirant I</i>	<i>IV</i>	<i>II</i>	<i>V</i>
<b>Solution injectée</b>	<b>Solution C</b>	<b>Eluat contenant I concentré à</b>	<b>Eluat contenant I concentré à</b>	<b>Eluat contenant IV concentré à</b>	<b>Solution A</b>
<b>Phase stationnaire</b>	Sephadex LH-20	50 ml (cf. col. 1)	50 ml (cf. col. 2)	50 ml (cf. col. 1)	Sephadex LH-20
<b>Phase mobile</b>	Eau distillée	Sephadex LH-20 HCOOH 3%	Sephadex G-10 Gradient H <sub>2</sub> O-HCOOH 2% (ref. 3)	Sephadex LH-20 HCOOH 1%	Sephadex LH-20 HCOOH 0,002%
<b>Débit (ml/h)</b>	60	60	65	100	210
<b>Longueur de colonne (cm)</b>	85	85	85	85	30
<b>Volume d'éluant contenant le produit de dégradation (ml)</b>	I: 185-220; IV: 340-380	180-240	200-260	380-450	850-1250
<b>Temps de rétention, <math>t_R</math> (min)</b>	I: 203; IV: 360	200	212	249	300 (30 cm)
<b>Lavage de la colonne</b>	HCOOH 5%	—	—	—	Ethanol
<b>Chromatogrammes</b>	Fig. 1	Fig. 2	Fig. 3	—	Fig. 4 Fig. 5

## PARTIE EXPÉRIMENTALE

*Préparation des échantillons à séparer sur Sephadex LH-20*

Le maléate de dimétindène en dilution dans de la cellulose microcristalline (1:4) se décompose lors d'une conservation pendant 10 jours à 80% d'humidité relative et à 70°C, en une série de produits de dégradation parmi lesquels se trouvent les quatre substances citées, dont la structure était à élucider. Pour simplifier leur séparation et purification sur colonne, des extractions liquide-liquide sont préalablement effectuées en milieu neutre et à pH 10 permettant respectivement<sup>3</sup> d'obtenir 2 solutions en milieu organique (50 ml) contenant du dimétindène, III et V (solution A), dimétindène NF<sub>1</sub>, II, III et NF<sub>4</sub> (solution B). Il reste une solution aqueuse (solution C) qu'il faut réduire au volume de 50 ml, contenant I, IV, VI, plus d'autres substances, de fluorescence bleue ou violette, ou non fluorescentes provenant de la décomposition forcée du dimétindène.

La composition quantitative des trois solutions est inconnue; cependant elles contiennent ensemble 3 g de produit.

*Préparation des colonnes et élution des produits*

L'ensemble des conditions de travail qui permet la séparation des substances I, II, IV et V est résumé dans le Tableau I. Un premier passage sur colonne de la solution C permet la séparation des produits I et IV, associés à des substances de dégradation secondaires (Tableau I, col. 1). Deux colonnes différentes sont ensuite nécessaires pour obtenir I à un degré de pureté suffisant pour l'identifier (Tableau I, col. 2 et 3) alors qu'une seule suffit pour isoler IV, (Tableau I, col. 4). Le produit II est purifié à l'aide de deux traitements successifs de l'échantillon par le même système chromatographique (Tableau I, col. 5). V est très facilement obtenu à cause de sa très forte rétention (Tableau I, col. 6).

*Solvants.* Les solvants utilisés sont de l'eau fraîchement distillée, de l'acide formique 98–100%, de l'ammoniaque 25%, de l'éthanol. Les solutions d'élution sont préparées au moment de l'emploi.

*Phases stationnaires.* Elles sont constituées de Sephadex G-10 et de Sephadex LH-20, dont la poudre est déposée, pour gonflement, dans de l'eau distillée pendant 24 h. La suspension obtenue est ensuite versée dans la colonne, le tassement se faisant lentement, par décantation. En cas de non utilisation immédiate, la phase stationnaire est imbibée d'une solution aqueuse d'azoture de sodium 0.02%.

*Colonnes.* Les colonnes utilisées sont en verre, de diamètre intérieur de 2.5 cm. Grâce à des pistons mobiles, leur longueur peut varier, pour l'une de 12 à 37 cm, pour l'autre de 68 à 93 cm. Elles sont montées dans un dispositif contrôlé par un collecteur de fractions, permettant l'élution à débit constant, la détection facile des substances éluées, ainsi que le fractionnement de l'éluat<sup>3</sup>.

*Charges.* Les solutions A, B et C sont injectées sur les colonnes par fractions de 10 ml, contenant environ 0.1 à 0.4 g de produits<sup>3</sup>.

*Contrôle des fractions récupérées.* Après détection des fractions à récupérer, leur degré de pureté est déterminé par chromatographie sur couche mince Kieselgel HF<sub>254</sub> à l'aide des systèmes chromatographiques décrits en détail ailleurs<sup>1</sup>.

## RÉSULTATS ET DISCUSSION

L'évolution des différentes séparations est représentée dans les Fig. 1 à 5. I, II, IV et V sont obtenus à un degré de pureté suffisant pour permettre leur analyse par les méthodes spectroscopiques<sup>2</sup>.

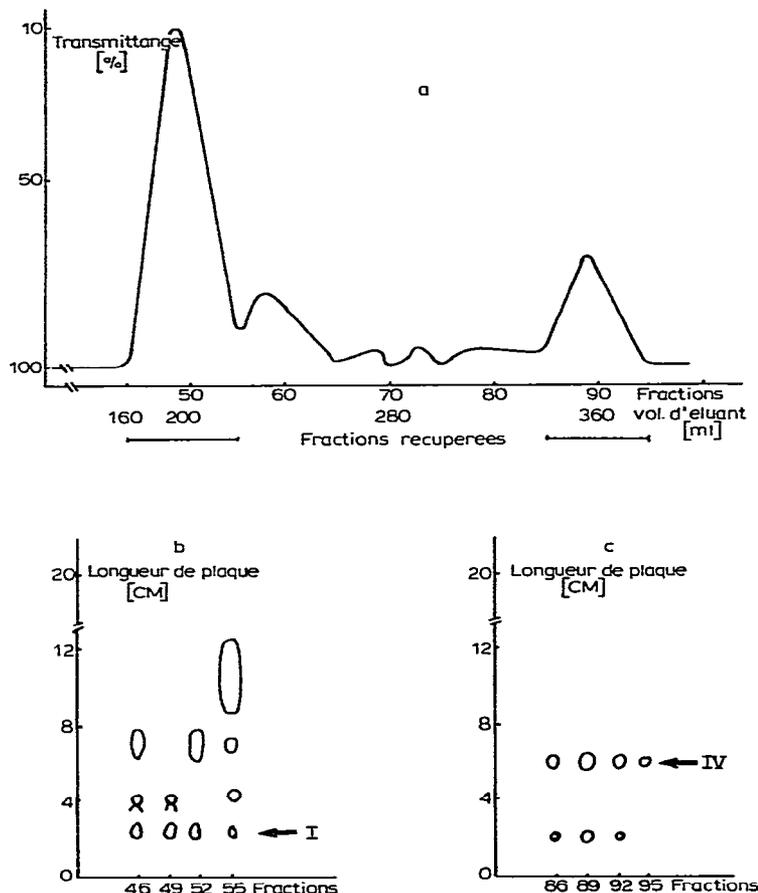


Fig. 1. a, Séparation préliminaire de I et IV sur Sephadex LH-20; b et c, contrôle des fractions récupérées par chromatographie sur couche mince et indication des taches correspondant aux produits de décomposition (les autres taches représentent des substances inconnues). Phase mobile: méthanol-ac. formique 25% (15:1).

Les expériences décrites révèlent les principaux avantages des gels de polydextran: pas de rétention irréversible des solutés, pics symétriques (distribution gaussienne), pas de souillure des éluats avec de la phase stationnaire. Les séparations obtenues, hautement reproductibles, indiquent une très grande stabilité des gels, à condition toutefois qu'ils soient protégés contre l'attaque des moisissures.

Sur la base des structures des produits de décomposition identifiés et des capa-

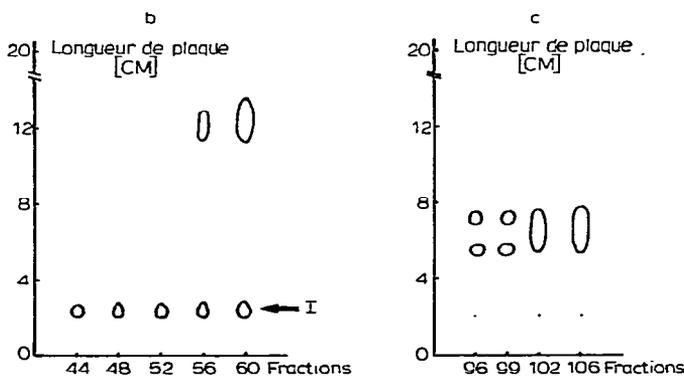
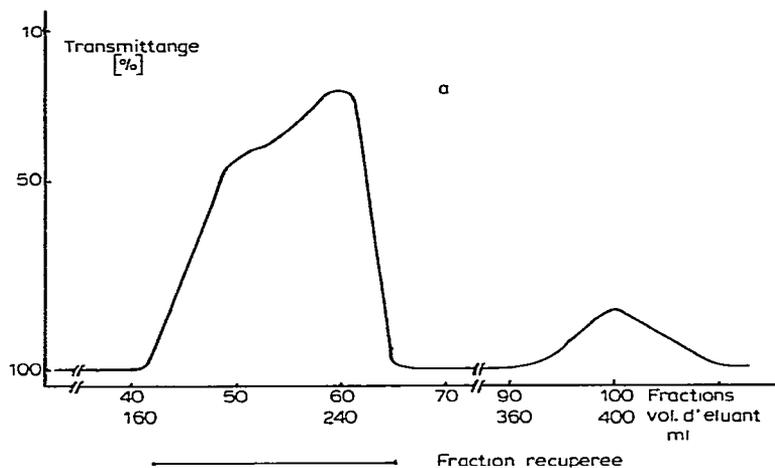


Fig. 2. a, Séparation des impuretés souillant I sur Sephadex LH-20; b et c, contrôle des fractions récupérées par chromatographie sur couche mince et indication des taches correspondant au produit de décomposition (les autres taches représentent des substances inconnues). Phase mobile: méthanol-ac. formique 25% (15:1).

cités d'adsorption des Sephadex, il est possible de formuler des hypothèses quant aux forces d'interactions entre gels et solutés.

En ce qui concerne la purification de I (Tableau I, col. 2 et 3), elle se fait sur des colonnes de Sephadex LH-20 et G-10, qui ont le même volume total ( $V = 417$  ml) et approximativement le même volume mort ( $V_m = 125$  ml)<sup>9</sup>. Les volumes de rétention de I sur Sephadex LH-20 et G-10 sont de 202 et 229 ml respectivement. L'adsorption sur Sephadex G-10 étant négligeable, il s'en suit que I n'est pratiquement pas retenu sur Sephadex LH-20, quel que soit le solvant utilisé.

Si l'éluant HCOOH 3% (Tableau I, col. 2 et Fig. 3) permet la rétention sur LH-20 des deux produits fluorescents souillant I, de poids moléculaires comparables, on peut en déduire que la phase stationnaire se comporte aussi comme adsorbant. Dans ce cas, la séparation est expliquée par l'effet des forces de dispersion, amplifiées lorsque le degré d'association des molécules de solvants augmente<sup>10</sup>, ce qui est

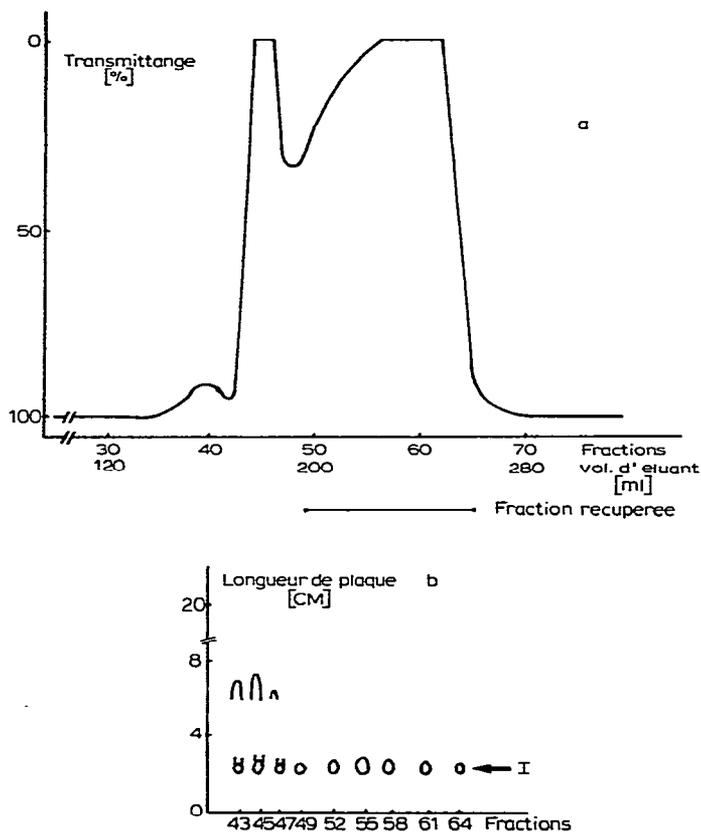


Fig. 3. a, Séparation des dernières impuretés souillant I sur Sephadex G-10; b et c, contrôle des fractions récupérées par chromatographie sur couche mince et indication des taches correspondant au produit de décomposition. Phase mobile: méthanol-ac. formique 25 % (15:1).

obtenu par l'utilisation d'une phase mobile de force ionique plus grande. L'addition d'acide formique, dans nos conditions expérimentales, empêche la précipitation des dérivés basiques et augmente la force ionique (rétention plus forte du soluté le plus hydrophobe). En outre, le formiate d'ammonium est éliminé par simple évaporation<sup>3</sup>.

La séparation de I et IV (Tableau I, col. 1) ne peut se faire que grâce à des interactions supplémentaires, par des forces hydrophobes et par ponts hydrogène, entre IV et la phase stationnaire. L'augmentation du volume de rétention  $V_r$  lorsque l'acidité de l'éluant augmente [Tableau I, col. 1:  $V_r$  (IV) = 360 ml; col. 4:  $V_r$  (IV) = 416 ml] implique que les forces hydrophobes sont plus importantes que les interactions par ponts hydrogène.

V est fortement retenu sur Sephadex LH-20 (Tableau I, col. 6 et Fig. 5) à cause de sa structure aromatique importante. Cette dernière se retrouve dans le produit I. Seule la présence de la fonction aminoxyde rendant I très soluble dans l'eau peut expliquer sa faible rétention sur la colonne Sephadex LH-20, dans des conditions chromatographiques comparables (Tableau I, col. 2).

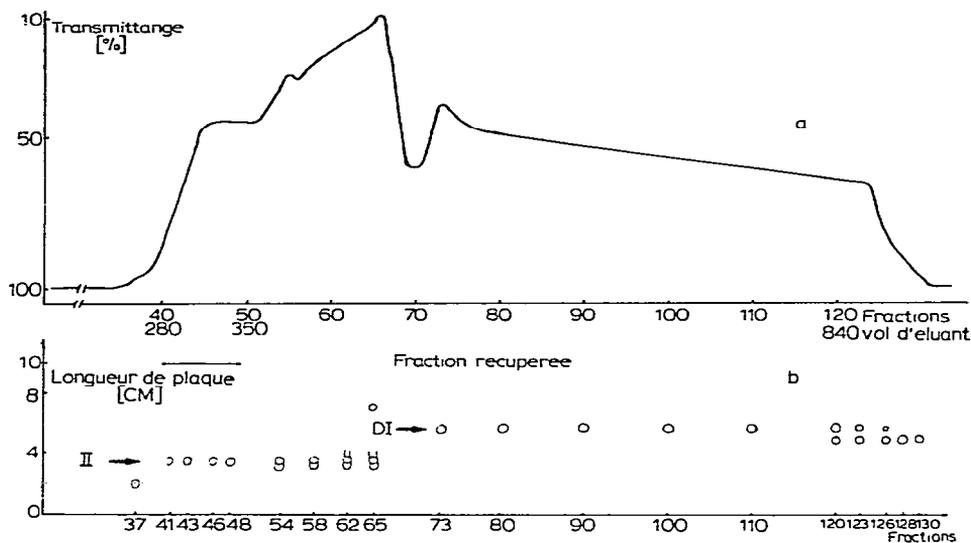


Fig. 4. a. Purification du produit de décomposition II sur Sephadex LH-20; b. contrôle des fractions récupérées par chromatographie sur couche mince et indication des taches correspondant au produit de décomposition II et au dimétindène (DI). Phase mobile: cyclohexane-benzène-diéthylamine (76:15:6).

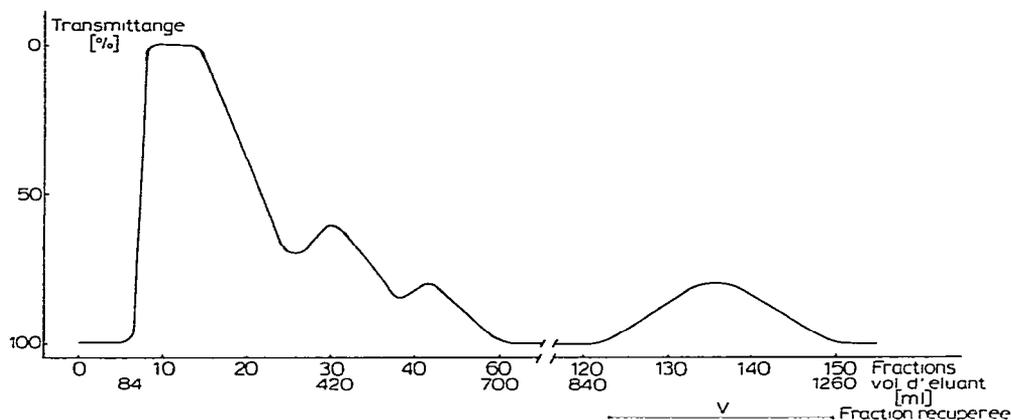


Fig. 5. Purification du produit de décomposition V.

La séparation de II et du dimétindène (Tableau I, col. 5 et Fig. 5) doit être expliquée par la différence du caractère hydrophobe de leurs structures.

## CONCLUSION

La séparation et la purification des produits de dégradation du dimétindène (I, II, IV et V) sur Sephadex LH-20 et G-10 est possible et pourrait être expliquée par la formation de ponts hydrogène et d'interactions hydrophobes. Celles-ci sont favorisées par les éluants polaires et représentent, dans les systèmes considérés, les interactions les plus importantes ayant lieu entre solutés et phases stationnaires.

## REMERCIEMENTS

Les auteurs expriment leurs remerciements à Monsieur René Baumann, Pharmacia (Suisse) pour ses commentaires, à la Maison Zyma SA (Nyon) pour la mise à disposition du maléate de dimétindène, ainsi qu'au Fonds National Suisse de la Recherche Scientifique (requête No 3.730.72).

## BIBLIOGRAPHIE

- 1 M. Buchmann et U. W. Kesselring, *Pharm. Acta Helv.*, 53 (1978) 301.
- 2 M. Buchmann et U. W. Kesselring, *Pharm. Acta Helv.*, 53 (1978) 261.
- 3 M. Buchmann, *Thèse*, Université de Lausanne, Lausanne, 1978.
- 4 G. I. Glover, P. S. Mariano et T. J. Wilkinson, *Sépar. Sci.*, 10 (1975) 795.
- 5 P. Van Duijn et S. H. Riddersma, *Histochem. J.*, 5 (1973) 169.
- 6 H. Determann et K. Lampert, *J. Chromatogr.*, 69 (1972) 123.
- 7 C. A. Streuli, *J. Chromatogr.*, 56 (1971) 219.
- 8 C. A. Streuli, *J. Chromatogr.*, 56 (1971) 225.
- 9 H. Susskind et W. Becker, *Nature (London)*, 212 (1966) 1564.
- 10 Cs. Horváth, W. Melander et I. Molnár, *J. Chromatogr.*, 125 (1976) 129.