



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

① Número de publicación: **2 257 962**

② Número de solicitud: 200500154

⑤ Int. Cl.:
C07B 57/00 (2006.01)
G01N 27/26 (2006.01)
A61K 31/125 (2006.01)

⑫

PATENTE DE INVENCION

B1

⑫ Fecha de presentación: **28.01.2005**

⑬ Fecha de publicación de la solicitud: **01.08.2006**

Fecha de la concesión: **24.05.2007**

⑮ Fecha de anuncio de la concesión: **01.07.2007**

⑯ Fecha de publicación del folleto de la patente:
01.07.2007

⑰ Titular/es: **Universidad de Alcalá
Plaza de San Diego, s/n
28801 Alcalá de Henares, Madrid, ES**

⑱ Inventor/es: **García-Ruiz, Carmen;
Gómara Moreno, Belén y
Marina Alegre, María Luisa**

⑳ Agente: **No consta**

⑳ Título: **Procedimiento para la separación y la cuantificación de los enantiómeros del protector solar 3-(4-metilbencilideno)-alcanfor por electroforesis capilar.**

㉑ Resumen:

Procedimiento para la separación y la cuantificación de los enantiómeros del protector solar 3-(4-metilbencilideno)-alcanfor por electroforesis capilar.

El objetivo de la invención es el desarrollo de un procedimiento analítico de separación electroforética utilizando como selectores quirales ciclodextrinas, con el fin de llevar a cabo la separación de los dos enantiómeros del 3-(4-metilbencilideno)-alcanfor (1S-MBC y 1R-MBC) y poder realizar una determinación fidedigna de cada uno de ellos independientemente.

La invención consiste en la utilización de una mezcla de ciclodextrinas: la carboximetil- β -ciclodextrina (CM- β -CD) y la aciclodextrina (α -CD) en tampón borato a pH 9,0, que a la temperatura de separación seleccionada de 15°C y utilizando detección por absorción UV a 300 nm ha permitido la determinación cualitativa y cuantitativa de cada uno de los enantiómeros de forma rápida y sencilla. La preparación de las muestras se ha realizado disolviendo las mismas en dimetilformamida y diluyéndolas posteriormente en metanol:agua (1:1, v/v).

ES 2 257 962 B1

Aviso: Se puede realizar consulta prevista por el art. 37.3.8 LP.

DESCRIPCIÓN

Procedimiento para la separación y la cuantificación de los enantiómeros del protector solar 3-(4-metilbencilideno)-alcanfor por electroforesis capilar.

El procedimiento analítico propuesto se refiere al campo del análisis quiral y permite la separación y también la cuantificación de los enantiómeros del 3-(4-metilbencilideno)-alcanfor (MBC) en productos cosméticos que contienen este compuesto como agente protector solar empleando para ello la técnica de la electroforesis capilar (CE) con ciclodextrinas como selectores quirales. Supone un gran avance por la posibilidad de analizar cada uno de los enantiómeros de este compuesto por separado ya que podrían presentar distinta bioactividad y para su estudio es necesario el desarrollo de procedimientos enantioselectivos como el que se ha puesto a punto en esta invención. Además, es el primer procedimiento de análisis enantioselectivo descrito en la bibliografía hasta el momento.

Estado de la técnica

Aunque existen en la bibliografía varias técnicas analíticas, como la CE, la cromatografía líquida de alta resolución (HPLC), o la espectrofotometría UV-Vis, para la identificación y cuantificación de diferentes agentes protectores de la radiación UV presentes en productos cosméticos y cremas, con ellas sólo se determina el contenido total de los filtros UV en mezclas. Además, sólo existen dos artículos científicos donde el MBC se ha separado [1] o determinado cuantitativamente [2] junto a otros ocho filtros solares en productos cosméticos como las lociones solares empleando la técnica de CE.

El MBC es un compuesto quiral presente como mezcla racémica de sus dos enantiómeros en productos cosméticos con protección solar donde actúa como filtro de la radiación UV. El contenido de este compuesto quiral, así como de otros componentes en productos cosméticos, está regulado por la Unión Europea. De hecho, en la legislación española, la concentración de MBC en productos cosméticos debe ser inferior al 4% [3]. Como consecuencia, es necesario desarrollar procedimientos analíticos para controlar los niveles de este compuesto en productos cosméticos.

Por otro lado, este protector solar puede causar problemas de salud porque puede interferir con las funciones normales de las hormonas femeninas que componen los estrógenos [4] o producir ciertas reacciones alérgicas [5]. No obstante, no se ha estudiado si estos problemas son debidos a ambos enantiómeros o a uno de ellos, como ocurre en el caso de otros disruptores endocrinos como los bifenilos policlorados (PCBs), para los cuales se ha observado que los dos enantiómeros de un mismo congénere presentan diferente grado de toxicidad [6]. Por ello, el desarrollo de un procedimiento analítico enantioselectivo para el MBC supone una invención de gran relevancia ya que permitiría estudiar la bioactividad de dicho protector solar en la naturaleza y en el hombre. Debido a que la CE utilizando ciclodextrinas como selectores quirales es, en la actualidad, una técnica con un gran potencial para la separación de los enantiómeros de un compuesto quiral, ha sido la técnica analítica empleada en esta invención.

Descripción de la invención

El procedimiento para la separación enantioselectiva del protector solar MBC por CE utilizando selectores quirales se ha llevado a cabo en un equipo de electroforesis capilar HP^{3D}CE equipado con un detector ultravioleta-visible de diodos en serie (DAD). El capilar empleado para las separaciones es un capilar de sílice fundida no recubierto de 50 μm de diámetro interno y 375 μm de diámetro externo con una longitud total de 58,5 cm y 50 cm de longitud efectiva (desde la inyección hasta el detector). La temperatura de trabajo del capilar es 15°C y la detección UV se realiza a 300 nm (máximo de absorción del MBC) con una anchura de banda de 50 nm y un tiempo de respuesta de 0,1 s.

La separación enantiomérica se lleva a cabo inyectando por presión (50 mbar durante 3s) las disoluciones de patrones o muestras en el capilar, previamente acondicionado con metanol:agua (1:1, v:v) (4 bar) durante 2 min seguido de 0,1 M NaOH (4 bar), agua Milli-Q (4 bar) y el tampón de separación (4 bar), cada uno de ellos durante 2 min. El voltaje aplicado para la separación electroforética es 20 kV. El medio de separación empleado es una disolución acuosa de ácido bórico 100 mM, carboximetil- β -ciclodextrina (CM- β -CD) 15 mM y α -ciclodextrina (α -CD) 120 mM ajustada con NaOH 1 M a pH=9,0. Dicho medio de separación se filtra a través de un filtro de membrana de nylon de 0,45 μm antes de utilizarlo en el equipo de CE.

La preparación de las disoluciones patrón se realiza a partir de una disolución inicial de 10000 mg/L de MBC en dimetilformamida (DMF) que se diluye hasta la concentración requerida con una mezcla metanol:agua (1:1, v:v). El procedimiento de tratamiento de las muestras consiste en la disolución total de las cremas en DMF y la posterior dilución (1:10, v:v) de la disolución resultante utilizando una mezcla metanol:agua (1:1, v:v).

El procedimiento de separación y determinación enantioselectiva inventado es aplicable a la cuantificación de los enantiómeros del MBC en muestras de cremas cosméticas. La cuantificación se lleva a cabo utilizando el método de calibración del patrón externo con disoluciones diluidas en mezclas metanol:agua (1:1, v:v) obtenidas a partir de una disolución en DMF del compuesto puro comercial (10000 mg/L). Este método de calibración es aplicable debido a la ausencia de interferencias de matriz (comprobada mediante la comparación de las pendientes obtenidas para los métodos de calibrado del patrón externo y de las adiciones patrón) que afecten a la señal analítica cuando se analizan muestras de cremas.

ES 2 257 962 B1

Las ventajas principales del procedimiento inventado son las siguientes:

- 5 - El procedimiento objeto de la invención se puede realizar con una instrumentación básica y es por tanto accesible a la mayor parte de los laboratorios de análisis.
- El procedimiento consiste en una sencilla separación electroforética utilizando pequeñas cantidades de ciclodextrinas como selectores quirales, que son los componentes más caros del medio de separación, capaz de discriminar los dos enantiómeros del MBC para su cuantificación independiente.
- 10 - El procedimiento desarrollado no tiene interferencias de matriz y es selectivo permitiendo separar los dos enantiómeros objeto de estudio de otros posibles componentes de la crema en tiempos de análisis de unos 17 min.
- 15 - El procedimiento de tratamiento de muestra es muy simple y consiste en la disolución en los disolventes adecuados de las muestras de crema comerciales, lo que simplifica la metodología global y disminuye los costes totales del procedimiento.

Descripción de las figuras

20 Figura 1. Electroforegrama correspondiente a la separación de los enantiómeros del MBC obtenido al inyectar una disolución patrón de 100 mg/L (preparada a partir de una disolución de 10000 mg/L en DMF y diluida en metanol:agua (1:1, v:v)) empleando como medio de separación borato 100 mM con CM- β -CD 15 mM y α -CD 120 mM a pH 9,0. Condiciones electroforéticas: capilar de sílice fundida, 58,5 cm (50 cm a la ventana de detección) \times 50 μ m de diámetro interno; temperatura de separación, 15°C, voltaje aplicado, 20 kV; inyección, 50 mbar \times 3s. Detección UV a 300 nm
25 con un ancho de banda de 50 nm.

Figura 2. Electroforegrama correspondiente a la crema comercial A (aproximadamente 0,5 g de crema disueltos en 15 mL DMF y diluidos 10 veces en metanol:agua (1:1, v:v)) empleando como medio de separación borato 100 mM con CM- β -CD 15 mM y α -CD 120 mM a pH 9,0. Las condiciones electroforéticas fueron las mismas que se citaron en la Figura 1.
30

Modo de realización

Características analíticas del procedimiento

35 Las características analíticas del procedimiento objeto de la invención se expresan en función de la linealidad, límite de detección, límite de cuantificación, repetibilidad instrumental, repetibilidad metodológica, precisión intermedia y exactitud para cada uno de los dos enantiómeros del MBC. La linealidad se comprueba en el intervalo de concentraciones de trabajo indicado en la Tabla 1. Los límites de detección y cuantificación se determinan a partir de los datos de la recta de calibrado utilizando una señal de $3s_a$ para calcular la concentración correspondiente al límite de
40 detección y de $10s_a$ para calcular la concentración correspondiente al límite de cuantificación, siendo s_a la desviación estándar de la ordenada en el origen. Así mismo, la repetibilidad instrumental y metodológica se expresan como la desviación estándar relativa (RSD), tanto de las áreas corregidas ($A_c=A_i/t_i$ donde A_i corresponde al área y t_i al tiempo de migración del pico del enantiómero considerado) como de los tiempos corregidos ($t_c=t_i/t_{EOF}$ donde t_{EOF} corresponde
45 al tiempo de migración del flujo electroosmótico), resultantes de inyectar seis veces por duplicado una disolución patrón de concentración conocida en un mismo día, y seis disoluciones patrón de concentración conocida preparadas independientemente el mismo día, respectivamente. La precisión intermedia se calcula inyectando por triplicado disoluciones estándar preparadas en cinco días diferentes y con dos capilares distintos. La exactitud del procedimiento analítico se ha evaluado determinando el porcentaje de recuperación del MBC por comparación de la cantidad deter-
50 minada por el procedimiento de CE desarrollado con respecto a la cantidad esperada de MBC en una disolución de la crema A enriquecida con tres cantidades conocidas (25, 62,5 y 100 mg/L) de cada enantiómero de MBC patrón y cuyo contenido en MBC se ha determinado por el procedimiento de CE. Todos estos resultados se muestran en la Tabla 1.
55

ES 2 257 962 B1

TABLA 1

Características analíticas del procedimiento

5	Intervalo lineal de trabajo		Racémico: 10-1000 mg/L	
			Enantiómeros: 5-500 mg/L	
	Límites de detección	1 ^{er} enantiómero eluido	10 mg/L	
		2 ^o enantiómero eluido	12 mg/L	
10	Límites de cuantificación	1 ^{er} enantiómero eluido	27 mg/L	
		2 ^o enantiómero eluido	31 mg/L	
	Precisión		1 ^{er} enantiómero eluido	2 ^o enantiómero eluido
15	Repetibilidad instrumental (n = 6)			
	50 mg/mL MBC	A _c , RSD (%)	4,3	3,4
		t _c , RSD (%)	0,5	0,6
20	100 mg/mL MBC	A _c , RSD (%)	3,0	3,2
		t _c , RSD (%)	0,3	0,3
	Repetibilidad del método (n = 6)			
25	50 mg/mL MBC	A _c , RSD (%)	6,5	8,7
		t _c , RSD (%)	0,5	0,6
30	100 mg/mL MBC	A _c , RSD (%)	4,3	6,0
		t _c , RSD (%)	0,7	0,8
	Precisión intermedia (n = 15)			
35	50 mg/mL MBC	A _c , RSD (%)	6,4	8,6
		t _c , RSD (%)	1,4	1,5
	100 mg/mL MBC	A _c , RSD (%)	8,5	8,9
		t _c , RSD (%)	2,2	2,4
40	500 mg/mL MBC	A _c , RSD (%)	10,0	11,0
		t _c , RSD (%)	2,1	2,3
	Exactitud		1 ^{er} enantiómero eluido	2 ^o enantiómero eluido
45	Recuperación (%)		99 ± 8	98 ± 8

Obtención de las rectas de calibrado

50 El método de calibración que se emplea es el del patrón externo ya que no existen interferencias de matriz que obliguen a utilizar el método de adiciones patrón. Para obtener la recta de calibrado se representan las áreas corregidas (A_c) de cada uno de los picos de los enantiómeros del MBC en función de la concentración inyectada de cada uno de ellos (c, 50% de la concentración total de MBC en cada disolución). Las ecuaciones de las rectas resultantes calculadas utilizando el análisis por regresión lineal son:

55 1^{er} enantiómero eluido:

$$A_c = 0,0382 c - 0,1026 \quad (s_b = 0,0004; s_a = 0,0947; r = 0,9998; n=6)$$

60 2^o enantiómero eluido:

$$A_c = 0,0404 c - 0,1383 \quad (s_b = 0,0005; s_a = 0,1119; r = 0,9997; n=6)$$

65 donde s_a y S_b son las desviaciones estándar correspondientes a la ordenada en el origen y a la pendiente, respectivamente, r el coeficiente de correlación de la recta y n el número de niveles de calibrado. Cada uno de los distintos niveles de calibrado se inyectan por triplicado.

ES 2 257 962 B1

Preparación de las muestras de crema

Para la preparación de las muestras se disuelven aproximadamente 0,5 g de la muestra de crema comercial en 15 ml de DMF. La disolución resultante se diluye diez veces con metanol:agua (1:1, v:v) para obtener la disolución que se inyecta en el equipo de CE para su determinación.

Determinación cuantitativa de los enantiómeros del MBC en muestras de crema

Una vez validado el procedimiento de análisis enantioselectivo, se inyectan las muestras el mismo día que se realiza una recta de calibrado para cada uno de los enantiómeros.

En la Figura 1 se muestra el electroforegrama correspondiente a una disolución patrón de MBC mientras que la Figura 2 representa el electroforegrama resultante de la inyección de una muestra de la crema A estudiada. Se observa que en la Figura 2 además de los picos correspondientes a los dos enantiómeros del MBC hay otras señales que pertenecen a los restantes componentes de dicha muestra, pero que no interfieren a la hora de identificar y cuantificar el analito de interés. Una selectividad de separación similar se observa para la otra crema estudiada (B).

Para la identificación de los enantiómeros de MBC se comparan los tiempos de migración corregidos de las muestras con los de las disoluciones patrón empleadas.

Una vez identificados los picos pertenecientes al MBC, el área corregida de cada uno de los picos de los dos enantiómeros del MBC correspondiente a cada muestra objeto de estudio nos permite realizar el análisis cuantitativo de cada uno de ellos por separado interpolando dicho valor de área corregida directamente sobre la recta de calibrado de cada enantiómero.

Los resultados de los análisis se expresan en mg de cada uno de los enantiómeros y de compuesto total (como suma de ambos enantiómeros) en 0,5 g de muestra. Como ejemplo, en la Tabla 2 se recogen los resultados obtenidos para dos muestras analizadas siguiendo el procedimiento objeto de invención.

TABLA 2

Cantidad media (mg) de los dos enantiómeros de MBC y del total de MBC en dos muestras de crema comerciales analizadas ^{a)}

Crema	Cantidad del 1 ^{er} enantiómero (mg) \pm t s/n ^{1/2}	Cantidad del 2 ^o enantiómero (mg) \pm t s/n ^{1/2}	Cantidad total (mg) \pm t s/n ^{1/2}	Cantidad indicada en la etiqueta (mg)
A	7 \pm 2	6 \pm 2	13 \pm 4	15
B	4,1 \pm 0,6	4,3 \pm 0,5	8 \pm 1	-

^{a)} t = 3,18 (para un intervalo de confianza del 95%), s = desviación estándar y n = 3

Aplicación industrial

Para el control de calidad de los productos interesa tanto al fabricante como a la administración que la presencia y contenido de este protector solar quiral esté certificada.

Bibliografía

[1] Klampfl, C.W., Leitner, T., Hilder, E.F., *Electrophoresis* 2002, 23, 2424-2429.

[2] Klampfl, C.W., Leitner, T., *J. Sep. Sci.* 2003, 26, 1259-1262.

[3] Orden de 26 de abril de 1999 por la que se adaptan por segunda vez al progreso técnico los anexos de Real Decreto 1599/1997, de 17 de octubre, sobre productos cosméticos. BOE de 6 de mayo de 1999.

[4] Sunscreen chemicals cause health problems <<http://www.coastalguide.org/news/2001-09.html>> checked on December 2004.

[5] Marguery M.C., Rakotondrazafy, J., Sayed, F. E., BayleLebey P., Journe, F, Bazex, J., *Photodermatol Photo* 1995, 11, 209-212.

[6] Rodman L.E., Shedlofsky S.I., Mannschreck A., Püttmann M., Swim A.T., Roberson L.W., *Biochem. Pharmacol.* 1991, 41. 915-922.

ES 2 257 962 B1

REIVINDICACIONES

5 1. Procedimiento de análisis del 3-(4-metilbencilideno)-alcanfor (MBC) **caracterizado** porque permite la separación y cuantificación de los enantiómeros de este filtro de radiación UV en productos cosméticos por electroforesis capilar (CE) empleando ciclodextrinas como selectores quirales.

10 2. Procedimiento según la reivindicación 1 que consiste en un medio de separación acuoso para CE en el que se emplean como selectores quirales una mezcla de la carboximetil- β -ciclodextrina (CM- β -CD) 15 mM y la α -ciclodextrina (α -CD) 120 mM con ácido bórico 100 mM que finalmente se ajusta a pH=9,0 con NaOH 1 M.

15 3. Procedimiento según la reivindicación 1 y 2 **caracterizado** porque la separación electroforética se realiza en un capilar de sílice fundida no recubierto de 50 μ m de diámetro interno y 375 μ m de diámetro externo con una longitud total de 58,5 cm y 50 cm de longitud efectiva que debe acondicionarse previamente a la inyección de los patrones y muestras con metanol:agua (1:1, v:v) (4 bar) durante 2 min, 0,1 M NaOH (4 bar) durante 2 min, agua Milli-Q (4 bar) durante 2 min y el tampón de separación (4 bar) durante 2 min.

20 4. Procedimiento según la reivindicación 1, 2 y 3 que consiste en la inyección por presión de 50 mbar durante 3s en el sistema de CE de las disoluciones de los patrones y muestras.

25 5. Procedimiento según la reivindicación 1, 2, 3 y 4 **caracterizado** porque se lleva a cabo a una temperatura constante de 15°C y a un voltaje de separación de 20 kV.

30 6. Procedimiento según la reivindicación 1, 2, 3, 4 y 5 **caracterizado** porque la detección se realiza a 300 nm con una anchura de banda de 50 nm y un tiempo de respuesta de 0,1 s.

35 7. Procedimiento según la reivindicación 1 **caracterizado** porque la disolución de las muestras se realiza tomando aproximadamente 0.5 g de muestra que se disuelven totalmente en 15 mL de DMF y después se diluyen 10 veces en una mezcla de metanol:agua (1:1, v:v).

40 8. Procedimiento según la reivindicación 1 y 7 **caracterizado** porque en las muestras de cremas cosméticas se realiza una separación selectiva de los dos enantiómeros del MBC con respecto al resto de componentes presentes en las cremas.

45 9. Procedimiento según la reivindicación 1 y 7 **caracterizado** porque se puede determinar cuantitativa e independientemente los dos enantiómeros del MBC, así como la suma que indica el total de MBC, en muestras de crema de productos cosméticos.

50

55

60

65

Figura 1.

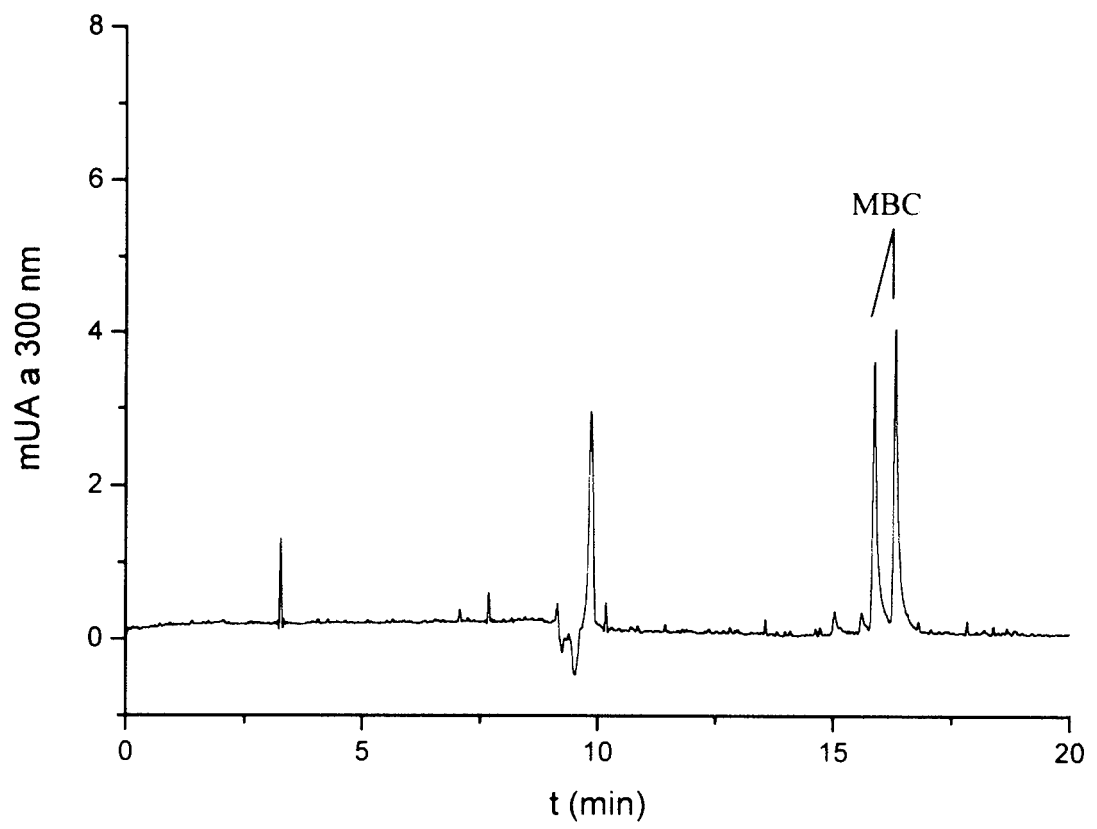
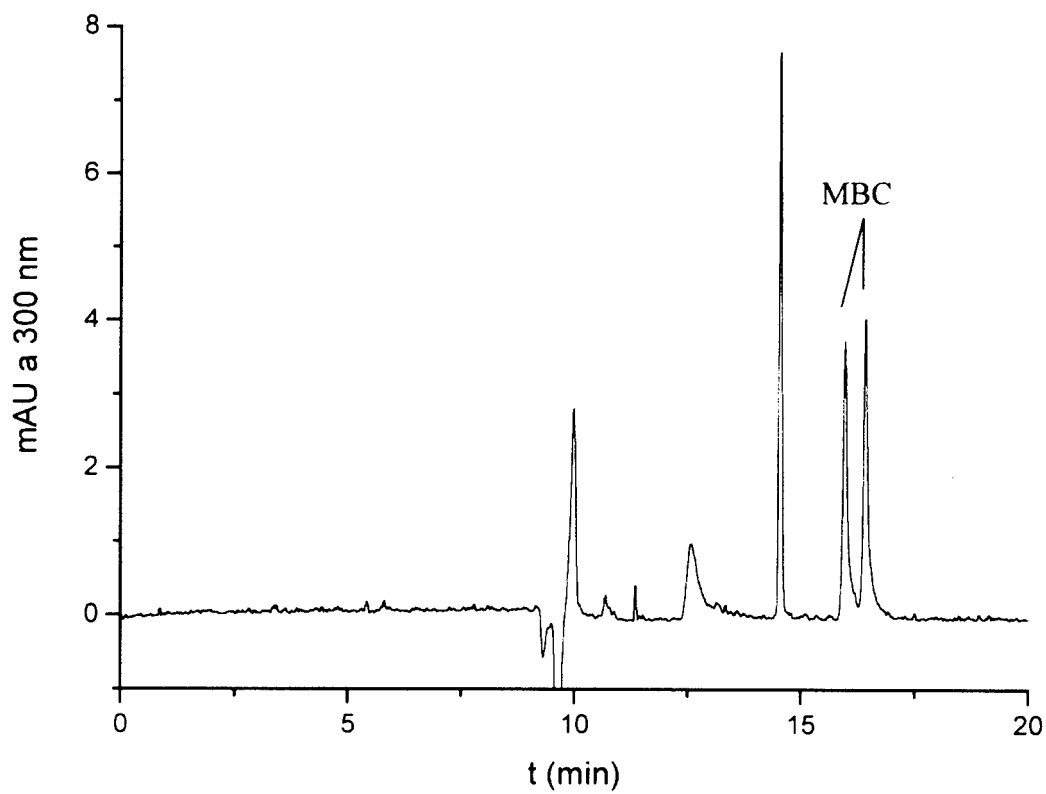


Figura 2.





OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

① ES 2 257 962

② Nº de solicitud: 200500154

③ Fecha de presentación de la solicitud: **28.01.2005**

④ Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TÉCNICA

⑤ **Int. Cl.:** Ver hoja adicional

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
A	EP 893453 A1 (BECKMAN COULTER) 27.01.1999, reivindicaciones 7-23.	1-9
A	US 6344121 B1 (STALCUP et al.) 05.02.2002, reivindicaciones 1,7,23,31.	1-9

Categoría de los documentos citados

X: de particular relevancia

Y: de particular relevancia combinado con otro/s de la misma categoría

A: refleja el estado de la técnica

O: referido a divulgación no escrita

P: publicado entre la fecha de prioridad y la de presentación de la solicitud

E: documento anterior, pero publicado después de la fecha de presentación de la solicitud

El presente informe ha sido realizado

para todas las reivindicaciones

para las reivindicaciones nº:

Fecha de realización del informe

03.07.2006

Examinador

P. Fernández Fernández

Página

1/2

CLASIFICACIÓN DEL OBJETO DE LA SOLICITUD

C07B 57/00 (2006.01)

G01N 27/26 (2006.01)

A61K 31/125 (2006.01)