

НОВЫЕ МЕТОДЫ

© Попова Н.М., 2011
УДК 612.338

**МЕТОДИКА КОЛИЧЕСТВЕННОГО ОПРЕДЕЛЕНИЯ
β-ГИДРОКСИСИМВАСТАТИНА В ПЛАЗМЕ КРОВИ**

Н.М. Попова

ГОУ ВПО «Рязанский государственный медицинский университет имени академика И.П. Павлова» Министерства здравоохранения и социального развития РФ, г. Рязань

Статья посвящена разработке оригинальной методики количественного определения β-гидроксисимвастатина в плазме крови кроликов методом ВЭЖХ. В работе использована ВЭЖХ система серии «Стайер» со спектрофотометрическим детектором. Разделение проводилось при помощи обращено-фазной хроматографической колонки «Beckman Coulter». Экстрагирование β-гидроксисимвастатина из плазмы крови осуществляли методом жидкостной экстракции.

Ключевые слова: ВЭЖХ, β-гидроксисимвастатин.

Симвастатин является одним из наиболее эффективных лекарственных средств для коррекции дислипидемии. [2] Появление множества дженериков дает возможность сделать терапию симвастатином более доступной для пациентов. Действие препарата связано с обратимой блокадой 3-гидрокси-3-метилглутарил коэнзим А (HMG-CoA) редуктазы – ключевого фермента синтеза холестерина. Симвастатин снижает уровень общего холестерина, липопротеинов низкой плотности, аполипопротеина В и триглицеридов, а также умеренно повышает уровень липопротеинов высокой плотности. [1] Препарат подвергается интенсивному метаболизму при первичном прохождении через печень с образованием 5 метаболитов, из которых наиболее выраженной гиполлипидемической активностью обладает β-гидроксисимвастатин. При этом концентрация самого симвастатина в общем кровотоке весьма низкая. [6] Биотрансформация симвастатина может существенно изменяться под влиянием лекарственных средств и при различных патологиях, изменяющих активность печеночных цитохромов Р-450. Для изучения фармакокинетики, а также исследова-

ния биоэквивалентности дженериков симвастатина определяют концентрацию препарата и его основного метаболита – β-гидроксисимвастатина – в биологических жидкостях.

В настоящее время существует множество точных методов количественного определения лекарственных веществ. Электрохимические методы являются простыми в эксплуатации и относительно дешевыми, но при этом они обладают рядом недостатков, таких как невысокая стабильность электролита и непродолжительный службы электролитического элемента [4]. Самый избирательный и высокочувствительный метод количественного анализа – хроматомасс-спектрометрия, однако он требует дорогостоящего оборудования, поэтому мало доступен отечественным лабораториям. [3] При использовании метода газовой хроматографии имеются ограничения по термоустойчивости соединений, а пробоподготовка является весьма трудоемкой. [5] Применение высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) дает возможность упростить обработку проб, существенно сократить общее время анализа, а использование современных обращенно-фазных

колонок позволяет добиться хорошего разделения компонентов. Наиболее распространенным способом детектирования веществ в ВЭЖХ является УФ-спектрофотометрия. [3]

Материалы и методы

В работе использована ВЭЖХ система серии «Стайер» со спектрофотометрическим детектором UVV 104. Хроматограф оборудован петлевым дозатором «Reodyne 7125» с петлей ввода на 50 мкм. Ввод проб в петлю осуществлялся с помощью шприцов «Hamilton». Исследование проводилось с применением обращенно-фазной колонки «Beckman Coulter» 4,6*250 мм, зернением 5 мкм.

Как вспомогательное оборудование использовалась центрифуга «Elmi CM 6M», встряхиватель пробирок «Shaker S 3.01» (Elmi), встряхиватель лабораторный медицинский «Vortex» (Elmi), роторно-вакуумный испаритель «VV – Micro» (Heidolph).

В качестве стандарта β -гидроксисимвастатина использовался «Simvastatin Hydroxy Acid, Ammonium Salt» производства «United States Biological», имеющий сертификат качества. Рабочий раствор (100 мкг/мл) готовился на метаноле и хранился при 4°C.

Для приготовления подвижной фазы и обработки проб применялись реактивы марки ВЭЖХ: ацетонитрил («Ranсreас»), дихлорметан («Ranсreас»), метанол («Sharlau»); марки ОСЧ: пропанол – 2 («Химмед»); марки ЧДА: кислота ортофосфорная («Химмед»), калий фосфорнокислый двузамещенный («Химмед»); 0,01 М фосфатный буфер pH=7,4 («Sigma»). Для растворения фосфатного буфера использовалась бидистиллированная вода.

В качестве биологического материала для подбора условий хроматографирования из ушной вены кроликов породы шиншилла отбирались образцы крови в объеме 5 мл. Для отделения плазмы пробы центрифугировали при 3000 об/мин в течение 10 минут и хранили до анализа при температуре -29°C.

Для сбора и обработки хроматографических данных применялся программно-аппаратный комплекс «Мультихром для Windows 9x & NT».

Результаты и их обсуждение

В результате серии экспериментов с использованием подвижной фазы различного состава и изменениями условий обработки проб для определения β -гидроксисимвастатина оптимальными стали приведенные ниже условия хроматографирования.

Анализ проводился при длине волны 238 нм и термостатировании колонки при 45°C. Использовалась подвижная фаза с содержанием ацетонитрила и фосфатного буфера в соотношении 70:30, доведенная кислотой ортофосфорной концентрированной до pH=4,5. Перед использованием подвижная фаза фильтровалась через нейлоновый фильтр с диаметром пор 0,45 мкм и дегазировалась под вакуумом в течение 20 минут. Скорость потока подвижной фазы составляла 1 мл/мин.

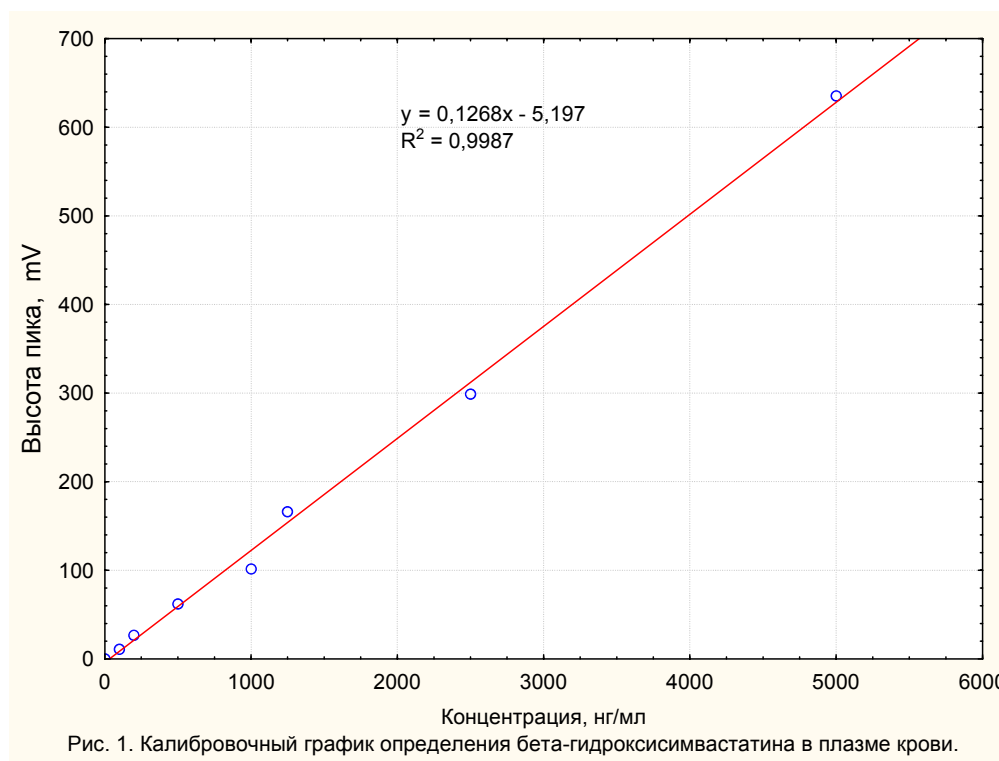
Экстрагирование β -гидроксисимвастатина проводилось методом жидкостной экстракции. Для этого к 1 мл плазмы добавляли 500 мкл KH_2PO_4 и перемешивали на приборе «Vortex» 10 секунд, затем добавляли 4,5 мл дихлорметана и 0,5 мл пропанола-2 и помещали на 10 минут на встряхиватель пробирок. После центрифугирования в течение 20 минут при 3000 об/мин органический слой отбирали в колбы для упаривания, которые помещали в роторно-вакуумный испаритель. Сухой остаток растворяли в 150 мкл подвижной фазы, из них 100 мкл наносили на колонку хроматографа.

Количественное определение β -гидроксисимвастатина проводилось методом абсолютной калибровки по высоте пиков. Для этого использовались калибровочные растворы с концентрациями препарата 100; 200; 500; 1000; 1250; 2500; 5000 нг/мл. Для приготовления калибровочных растворов к плазме крови интактных кроликов добавляли стандартный раствор β -гидроксисимвастатина и пере-

мешивали на приборе «Vortex» в течение 10 секунд.

Разработанная методика обладала следующими характеристиками: время удерживания β -гидроксисимвастатина

$12 \pm 0,3$ мин, предел его обнаружения 100 нг/мл. Коэффициент экстракции составил 82%. Калибровочная зависимость носила линейный характер в диапазоне концентраций от 100 до 5000 нг/мл.



Калибровочный график (рис. 1) описывался линейным уравнением: $y = 0,1268x - 5,197$, где x – концентрация препарата, y – высота хроматографического пика. Величина коэффициента регрессии оказалась близка к 1 (0,9987). Точность и воспроизводимость метода были рассчитаны по результатам 5 параллельных измерений 7 концентраций препарата, и составили 3,9% и 89,4-113,64% соответственно.

Образцы полученных хроматограмм представлены на рисунках 2-4.

Выбор хроматографической колонки и длины волны производился на основе анализа литературных данных. В боль-

шинстве методик, разработанных зарубежными авторами, использовались обращено-фазные колонки с привитой фазой C18 и длина волны 238 нм. [7 – 13] При ее изменении в ту или иную сторону чувствительность метода снижалась.

Для приготовления подвижной фазы были испробованы различные варианты с применением растворителей наиболее часто используемых в ВЭЖХ [5]:

- метанол и вода в соотношении 80:20; 90:10;
- ацетонитрил и вода в соотношении 80:20; 70:30; 60:40;
- метанол, ацетонитрил, вода в соотношении 60:20:20; 40:40:20.

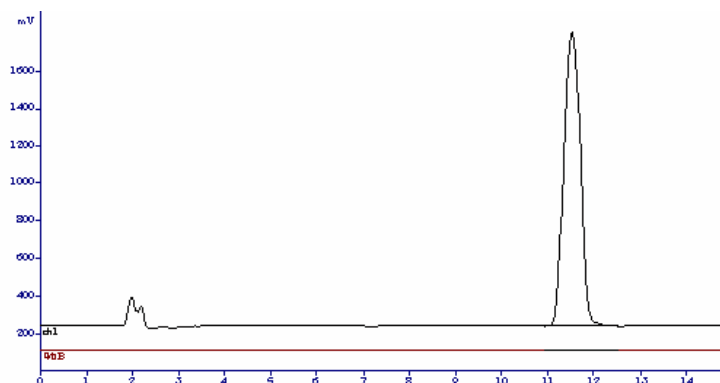


Рис. 2. Типичная хроматограмма стандартного раствора β -гидроксисимвастатина с концентрацией 10 мкг/мл

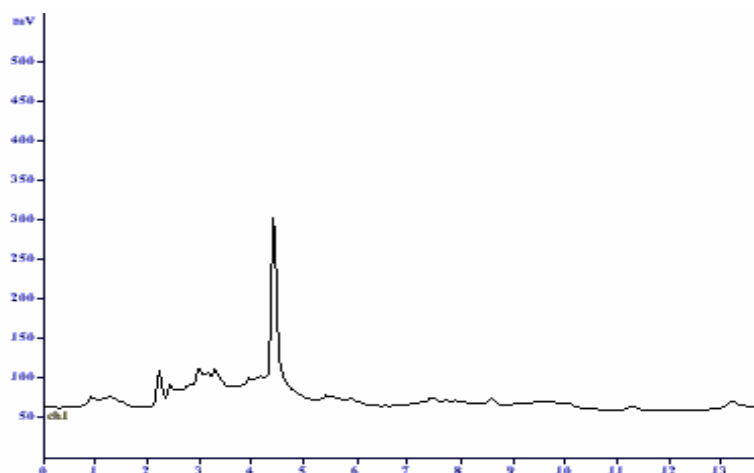


Рис. 3. Типичная хроматограмма пробы интактной плазмы крови кролика

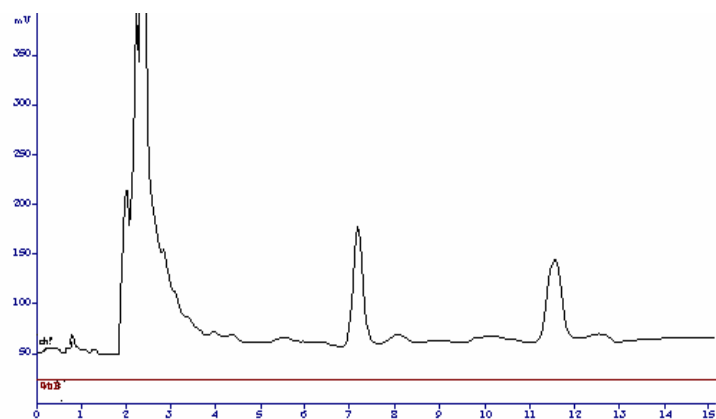


Рис. 4. Типичная хроматограмма пробы плазмы крови кролика при однократном введении симвастатина

Время удерживания β -гидроксисимвастатина при использовании подвижных фаз, содержащих метанол, составляло более 25 мин. Видимо, это связано с их большой вязкостью, что затрудняет применение колонок, заполненных частицами сорбента размером 5 мкм[5], поэтому выбор элюента был остановлен на ацетонитриле. При использовании ацетонитрила с водой в соотношении 80:20 время удерживания β -гидроксисимвастатина совпадало со временем элюирования с колонки компонентов плазмы, а использование фазы с соотношением 60:40 привело к уменьшению чувствительности метода и увеличению времени удерживания более 20 мин даже при нарастании скорости потока. Для увеличения чувствительности рН подвижной фазы изменяли в диапазоне от 3.0 до 9.0, максимальная чувствительность отмечалась при рН=4.5. Выбор рН и температуры термостатирования колонки определялись также данными ее технического паспорта. Для стабилизации значения рН вода в составе подвижной фазы была заменена на 0,01 М фосфатный буфер.

Выбор жидкостной экстракции был обусловлен оснащением лаборатории, а также высокой стоимостью оборудования и материалов для твердо-фазной экстракции. В качестве экстрагентов были испробованы следующие растворители и их комбинации: дихлорметан; дихлорметан и пропанол-2 в соотношении 9:1; гексан; гексан и дихлорметан в соотношении 3,5:1; диэтиловый эфир; этилацетат; диэтиловый эфир, этилацетат и дихлорметан в соотношении 1:1:1; хлороформ и пропанол-2 в соотношении 9:1; спирт этиловый; спирт метиловый. Экстракции β -гидроксисимвастатина удалось добиться только с применением диэтилового эфира и комбинации дихлорметана и пропанола-2 в соотношении 9:1. Однако воспроизводимость и точность методики была выше при использовании последней комбинации. Увеличение продолжительности встряхивания и центрифугирования проб не привело к увеличению чувствительности и улучшению разделения.

Выводы

1. Разработана методика количественного определения β -гидроксисимвастатина в плазме крови методом ВЭЖХ, отличающаяся доступностью и экономичностью.

2. Методика обладает достаточной точностью, воспроизводимостью, Надежностью, простотой выполнения и быстротой анализа.

Литература

1. Аронов Д.М. Лечение и профилактика атеросклероза / Д.М. Аронов. – М.: Триада-Х, 2000. – 411 с.
2. Аронов Д.М. Симвастатин / Д.М. Аронов. – М.: Триада-Х, 2002. – 80 с.
3. Орлов В.И. Жидкостная хроматография. Теоретические основы / В.И. Орлов, А.А. Аратсков. – Дзержинск, 1997. – 41 с.
4. Соколов А.В. Клиническая фармакокинетика / А.В. Соколов. – М.: Типография «Верже», 2004. – 55 с.
5. Стыскин Е.Л. Практическая высокоэффективная жидкостная хроматография / Е.Л. Стыскин, Л.Б. Ицкисон, Е.В. Брауде. – М., 1986. – 205 с.
6. Bioequivalence assesment of two simvastatin tablets in healthy Taiwanese volunteers / Chih-Neng [et al.] // Journal of food and drug analysis. – 2007. – Vol. 15. – P. 15-19.
7. Determination of simvastatin in human plasma by column-switching HPLC with UV detection / Kim Bae-Chan [et al.] // Journal of liquid chromatography & related technologies. – 2004. – Vol. 27. – P. 3089-3102.
8. Determination of Simvastatin in human plasma by liquid chromatography–mass spectrometry / Haitao Yang [et al.] // Journal of Chromatography B. – 2003. – Vol. 785. – P. 369-375.
9. HPLC determination of ezetimibe and simvastatin in pharmaceutical formulations / Muhammad Ashfaq [et al.] // Journal of the Chilean Chemical Society. – 2007. – Vol. 52. – P. 1220-1223.
10. HPLC determination of simvastatin and nicotinic acid in tablets / M. Gandhi

- mathi [et al.] // Indian drugs. – 2003. – Vol. 40. – P. 707-711.
11. Nagaraju P. A validated reverse phase HPLC method for the simultaneous estimation of simvastatin and ezetimibe in pharmaceutical dosage forms / P. Nagaraju, Z. Vishnu vardhan // Journal of Global Pharma Technology – 2010. – Vol. 24. – P. 113-117.
 12. Rainville P. Transfer of the USP assay for simvastatin to UPLC / P. Rainville, R. Plumb // Ultraperformance LC. – 2007. – Vol. 80. – P. 9-11.
 13. Rapid voltammetric identification and determination of simvastatin at trace levels in pharmaceuticals and biological fluid / B. Nigovic [et al] // Croatia Chemmical Acta. – 2008. – Vol. 81. – P. 453-459.

METHOD FOR THE QUANTATIVE DETERMINATION OF β -HYDROXYSIMVASTATIN IN BLOOD PLASMA

N.M. Popova

Article is devoted working out of an original HPLC method of quantitative determination of β -hydroxysimvastatin in the blood plasma. In work the HPLC system "Stayer" with the spektro-photometric detector was used. Analysis was achieved on the reversed phase column «Beckman Coulter». Separation of β -hydroxysimvastatin from the blood plasma carried out a method liquid Extraction

Key words: HPLC, β -gidroksisimvastatin.

Попова Наталья Михайловна – ассистент кафедры фармакологии с курсом фармакотерапии ФПДО.

390020, г. Рязань, ул. Хиринская, д.39.

Тел.: 8-4912 -93-04-66.