

**ВИЗНАЧЕННЯ ЛОВАСТАТИНУ В ПЛАЗМІ КРОВІ МЕТОДОМ
ВИСОКОЕФЕКТИВНОЇ РІДИННОЇ ХРОМАТОГРАФІЇ**

Доступний, простий, чутливий і швидкий метод було розроблено для визначення концентрації ловастатину (препарату групи гіпохолестеринемічних засобів, інгібітора 3-гідрокси-3-метилглутарил-СоА-редуктази) в плазмі крові людини методом високоефективної рідинної хроматографії. Аналітична процедура включає в себе однофазну рідинну екстракцію в ацетонітрил. Хроматографічне розділення проводили на колонці розміром 125x4,0 мм, заповненій твердою фазою Hypersil BDS-C18 з розміром гранул 5 мкм. Для захисту колонки використовували передколонку розміром 12,5x4 мм, яка була заповнена такою ж насадкою. Застосовано ізократичне елюювання мобільною фазою, що складалась (за об'ємом) із 40 % 0,04 М фосфатного буфера (рН=4,0) та 60 % ацетонітрилу. Швидкість елюювання – 1 мл/хв. УФ-детектування відбувалося при довжині хвилі 237 нм. Загальний час виконання аналізу складав 10 хв при часі утримання ловастатину 6,5 хв. Було проведено повний набір аналітичних тестів з метою перевірки адекватності методу. Спостерігалася лінійна залежність між площею хроматографічного піку та вмістом ловастатину в сироватці у діапазоні концентрацій 10–500 нг/мл. Межа детектування і межа кількісного визначення для ловастатину становили 7 та 10 нг/мл відповідно. Внутрішньосерійна точність визначення складала (7,12±4,88) %, міжсерійна точність визначення – (10,48±6,38) %. Середня відносна повнота визначення ловастатину в людській плазмі становила (98,6±1,4) %. Метод випробуваний при проведенні фармакокінетичних досліджень на 4 здорових чоловіках-добровольцях.

КЛЮЧОВІ СЛОВА: ловастатин, високоефективна рідинна хроматографія, фармакокінетика.

ВСТУП. Ловастатин є високоефективним препаратом для зниження концентрації холестерину в крові, належить до класу найпотужніших гіполіпідемічних агентів, які зазвичай називають статинами, є конкурентним інгібітором ферменту 3-гідрокси-3-метилглутарил-КоА (HMG-CoA) редуктази [4]. Ловастатин помітно знижує летальність при коронарній хворобі серця [3]. Концентрація ловастатину в плазмі крові дуже низька, що зумовлено його швидким метаболізмом у печінці [1]. Описано низку методів кількісного визначення ловастатину в плазмі крові, але вони потребують використання доволі дорогого обладнання, такого, як газові або рідинні хроматографи з мас-спектрометричними детекторами [5, 7], або застосування спеціальних патронів для твердофазної екстракції [6]. На даний час фактично відсутній простий та дешевий метод визначення ловастатину в плазмі крові. Власне метою цього дослідження була розробка швидкого і відносно дешевого аналітичного методу, оснований на ВЕРХ з УФ-детектуванням ловастатину в плазмі крові людини, призначеного для проведення фармакокінетичних досліджень.

© Я. П. Вербіловський, О. В. Ільченко, 2012.

МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ. В роботі використано ловастатин (торг. назва Mevinolin, SIGMA-ALDRICH). Випробувано таблетки “Ловастатин”, виготовлені в “Лекфарм” (РФ) та придбані в місцевій аптеці.

Калібрувальні стандарти готували шляхом розчинення ловастатину в етанолі, зокрема для вихідного розчину 5 мг ловастатину було розчинено в 5 мл етанолу. В подальшому вихідний розчин розводили етанолом до концентрацій 200, 500 нг/мл, 1, 2, 5, 10 мкг/мл. Зразки для дослідження готували шляхом додавання відповідної кількості розчинів ловастатину до плазми крові.

Пробопідготовка полягала в додаванні до 0,2 мл плазми крові 0,02 мл 1 н розчину соляної кислоти та 0,6 мл ацетонітрилу. Після енергійного струшування протягом 15 с пробу центрифугували при 1000 об./хв упродовж 15 хв.

Верхній рідкий шар відбирали та фільтрували на мембранному фторопластовому фільтрі МФФКГ-3 (НПФ “Біохром”) з розміром пор 0,45 мкм. 20 мкл фільтрату вводили у хроматографічну колонку.

Кількісне визначення ловастатину проводили на високоефективному рідинному хроматографі HP-1100 “Leonardo” на колонці

розміром 125x4,0 мм, заповненій твердою фазою Hypersil BDS-C18 з розміром гранул 5 мкм. Для захисту колонки використовували передколонку розміром 12,5x4 мм, яка була заповнена такою ж насадкою. Застосовано ізократичне елюювання мобільною фазою, що складалась (за об'ємом) із 40 % 0,04 М фосфатного буфера (рН=4,0) та 60 % ацетонітрилу. Швидкість елюювання – 1 мл/хв, температура колонки – 20 °С. Детектування ловастатину проводили при довжині хвилі 237 нм.

Лінійність оцінювали за допомогою свіжих зразків плазми з додаванням відповідної кількості стандартних розчинів ловастатину, на яких було побудовано калібрувальну криву. Використано 6 ненульових стандартних точок з концентраціями в межах від 10 до 500 нг/мл (10, 25, 50, 100, 200, 500 нг/мл), а також зразок плазми крові без додавання ловастатину (нульова проба). Зразки було оброблено за описаною процедурою і проаналізовано за відношенням площі піку ловастатину, що міститься в пробі, до площі піку ловастатину в зовнішньому стандарті (зазвичай розчин ловастатину в етанолі – 200 нг/мл) та номінальною концентрацією ловастатину в зразках (змінні Y і X в стандартному регресійному аналізі). Досліджено послідовне зменшення частки ловастатину в сигналі, причому як межу детектування методу було взято концентрацію ловастатину, яка забезпечувала співвідношення сигнал-шум 4. Межу кількісного визначення встановлювали як мінімальну концентрацію, яку можна виміряти з відносним стандартним відхиленням, що не перевищує 0,2.

Для визначення внутрішньосерійної та міжсерійної точності приготовлено 3 різних групи зразків з концентраціями ловастатину 50, 200 і 500 нг/мл. Ці групи було проаналізовано як послідовно, при одному запуску хроматографа (внутрішньосерійно), так і при запусках хроматографа, що відбувалися в різні дні (міжсерійно). Точність розраховували з огляду на відношення вимірної концентрації до номінальної концентрації. Варіацію оцінювали шляхом розрахунку коефіцієнта варіації для внутрішньосерійних і міжсерійних визначень для кожної групи зразків.

Для оцінки вилучення ловастатину з плазми 3 серії зразків із концентраціями ловастатину 50, 200 і 500 нг/мл підготовлено в 2-х середовищах: у плазмі крові людини і дистильованій воді. Всі зразки було оброблено, як описано, і ступінь вилучення визначали як відношення площ піків у плазмі й воді.

Дослідження біоеквівалентності. Щоб оцінити практичну застосовність розробленого

методу, ми використали його з метою визначення ловастатину в плазмі крові. Для цього четверо здорових чоловіків-добровольців віком 40–50 років, масою 76–90 кг отримали по 80 мг препарату у вигляді таблеток. Таблетки приймали зранку натще з 200 мл води. Через 1, 1,5, 2, 3, 4, 6 год після приймання відбирали кров у кількості 2–3 мл в пробірки з EDTA. Зразки крові центрифугували при 2000 g протягом 10 хв, відокремлену плазму зберігали при температурі -20 °С не більше двох діб.

Фармакокінетичний аналіз. Фармакокінетичні параметри розраховували за двочастинною моделлю із всмоктуванням методами обчислювальної математики. Критерієм оптимізації була мінімізація суми відносних відхилень розрахованої кривої від експериментальних точок.

РЕЗУЛЬТАТИ Й ОБГОВОРЕННЯ. Основою при розробці методу були зменшення вартості аналізу та зниження втрат речовини під час процесів екстрагування–реекстрагування. Цього досягнуто завдяки заміні міжфазної екстракції у двофазних системах (рідинна екстракція або екстракція в твердофазному патроні) на однофазну екстракцію в ацетонітрил. Завдяки здатності ацетонітрилу ефективно осаджувати білок, його застосування виключає процеси екстрагування, видалення розчинника, реелюювання. Тому втрати ловастатину під час пробопідготовки практично відсутні. Перевагами методу є доступні прилади та реагенти, проста і швидка процедура пробопідготовки, що складається з одного кроку, достатня для більшості фармакокінетичних досліджень, достатня точність. Але внаслідок розведення знижується концентрація ловастатину в рідині, яку вводять у хроматографічну колонку, що зменшує чутливість методу.

Методика дозволяла отримувати результати з високим ступенем лінійності в діапазоні концентрацій 10–500 нг/мл. Типовим було рівняння регресії результатів методу: $Y=0,00497 \cdot X+0,00691$ ($R^2=0,997$, $n=6$).

Для дослідження специфічності методу було досліджено серію зразків плазм людської крові, які не містили ловастатин (усього 6 різних зразків). Виявлено, що на хроматограмах у час, коли очікували виходу ловастатину, не спостерігалось будь-яких піків, викликаних появою метаболітів.

Коефіцієнт варіації при внутрішньосерійному визначенні складав ($7,12 \pm 4,88$) %, при міжсерійному визначенні – ($10,48 \pm 6,38$) %. Межа детектування і межа кількісного визначення методу для ловастатину становила 7 і

10 нг/мл відповідно. Ці величини демонструють прийнятну чутливість методу для аналізу лікарської речовини.

З використанням розробленого методу було проведено фармакокінетичні дослідження, які полягали у визначенні ловастатину в зразках плазми 4 добровольців, які перорально прийняли по 4 таблетки ловастатину (80 мг). Рівняння залежності концентрації препарату C (нг/мл) від часу t (хв) мало вигляд: $C=224,2 \cdot \exp(-0,00785 \cdot t)+0,00909 \cdot \exp(-0,00794 \cdot t)-224,2 \cdot \exp(-0,00909 \cdot t)$. На основі коефіцієнтів цього рівняння можна легко розрахувати фармакокінетичні параметри ловастатину [2].

ВИСНОВКИ. Запропоновано простий, селективний та достатньо чутливий метод визначення ловастатину в плазмі крові людини ВЕРХ-УФ методом з однофазною рідинною екстракцією. Через низьку ціну і короткий час прободготовки цей метод підходить для рутинних аналітичних досліджень. Метод був апробований і показав прийнятну лінійність результатів, точність і повноту визначення. Метод успішно застосовано для визначення фармакокінетики ловастатину в організмі людини. Одержані результати відповідають результатам, одержаним іншими авторами.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Справочник Видаль. Лекарственные препараты в России / ред. Е. А.Толмачева. – 17-е изд. – М. : АстраФармСервис, 2011. – 1728 с.
2. Холодов Л. Е. Клиническая фармакокинетика / Л. Е. Холодов, В. П. Яковлев. – М. : Медицина, 1985. – 464 с.
3. Cholesterol-lowering effect of mevlinolin, an inhibitor of 3-hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme a reductase, in healthy volunteers / J. A. Tobert, G. D. Bell, J. Birtwell [et al.] // J. Clin. Invest. – 1982. – **69**, № 4. – P. 913–919.
4. Crouch M. A. Effective use of statins to prevent coronary heart disease / M. A. Crouch // Am. Fam. Physician. – 2001. – **63**, № 2. – P. 309–320; 323–324.
5. Determination of simvastatin in human plasma by high performance liquid chromatography / L.Tan, L. L. Yang, X. Zhang [et al.] // Se Pu. – 2000. – **18**, № 3. – P. 232–234.
6. Ye L. Y. Determination of lovastatin in human plasma using reverse-phase high-performance liquid chromatography with UV detection / L. Y. Ye, P. S. Firby, M. J. Moore // Ther. Drug. Monit. – 2000. – **22**, № 6. – P. 737–741.
7. Zhu Z. High-performance liquid chromatography coupled with negative ion tandem mass spectrometry for determination of pravastatin in human plasma / Z. Zhu, L. Neirinck // J. Chromatogr. B. Analyt. Technol. Biomed. Life. Sci. – 2003. – **783**, № 1. – P. 133–140.

Я. П. Вербилковский, А. В. Ильченко

ВИННИЦКИЙ НАЦИОНАЛЬНЫЙ МЕДИЦИНСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ ИМЕНИ Н. И. ПИРОГОВА

ОПРЕДЕЛЕНИЕ ЛОВАСТАТИНА В ПЛАЗМЕ КРОВИ МЕТОДОМ ВЫСОКОЭФФЕКТИВНОЙ ЖИДКОСТНОЙ ХРОМАТОГРАФИИ

Резюме

Доступный, простой, чувствительный и быстрый метод был разработан для определения концентрации ловастатина (препарата группы гипохолестеринемических средств, ингибитора 3-гидрокси-3-метилглутарил-CoA-редуктазы) в плазме крови человека методом высокоэффективной жидкостной хроматографии. Аналитическая процедура включает в себя однофазную жидкостную экстракцию в ацетонитрил. Хроматографическое разделение проводили на колонке размером 125x4,0 мм, заполненной твердой фазой Hypersil BDS-C18 с размером гранул 5 мкм. Для защиты колонки использовали предколонку размером 12,5x4 мм, заполненную той же насадкой. Применено изократическое элюирование мобильной фазой, состоящей (по объему) из 40 % 0,04 М фосфатного буфера (pH=4,0) и 60 % ацетонитрила. Скорость элюирования – 1 мл/мин. УФ-детектирование проходило при длине волны 237 нм. Общее время выполнения анализа составляло 10 мин при времени выхода ловастатина 6,5 мин. Был проведен полный набор аналитических тестов с целью проверки адекватности метода. Наблюдалась линейная зависимость между площадью хроматографического пика и содержанием ловастатина в плазме в интервале концентраций 10–

500 нг/мл. Граница детектирования и граница количественного определения для ловастатина составляли 7 и 10 нг/мл соответственно. Внутрисерийная точность определения составляла (7,12±4,88) %, межсерийная точность определения – (10,48±6,38) %. Средняя относительная полнота определения составляла (98,6±1,4) %. Метод испытан при проведении фармакокинетических исследований на 4 здоровых мужчинах-добровольцах.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: ловастатин, высокоэффективная жидкостная хроматография, фармакокинетика.

Ya. P. Verbilovskyi, O. V. Il'chenko
M. I. PYROHOV VINNYTSIA NATIONAL MEDICAL UNIVERSITY

HPLC METHOD FOR DETERMINATION OF LOVASTATIN IN PLASMA

Summary

An available, simple, sensitive, and rapid method was developed for determination of the 3-hydroxy-3-methylglutaryl (HMG)-CoA reductase inhibitor, lovastatin in human plasma. The analytical procedure involves a one-step liquid-liquid extraction method. Chromatographic separation was carried out on a reversed phase C18 column using a mixture of 0,04 M phosphate buffer (pH 4) and acetonitrile (40 : 60, v/v) as mobile phase with UV detection set at 237 nm. The total run time of analysis was 10 min with the retention time of lovastatin being 6,5 min. A complete set of analytical method validation tests were carried out on the method. Accordingly, the method was linear in the wide range of 10–500 ng/ml. The limit of detection (LOD) and limit of quantification (LOQ) for lovastatin were 7 and 10 ng/ml, respectively. The method was shown to be precise with average within-run and between-run variations of (7,12±4,88) and (10,48±6,38) %, respectively. The mean relative recovery of lovastatin from human plasma by the developed method was (98,6±1,4) %. The applicability of the method in real pharmacokinetic situations was evaluated successfully during a bioequivalence study in 4 fasting healthy male volunteers.

KEY WORDS: lovastatin, HPLC, high performance liquid chromatography, pharmacokinetics.

Отримано 21.10.11

Адреса для листування: О. В. Ільченко, а/с 3032, Вінниця, 21027, Україна, e-mail: a.il@i.ua