

**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-CoA-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-CoA (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 пробопідготовки 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. Ильченко, а/с 3032, Вінниця, 21027, Україна, e-mail: a.il@i.ua