

Opracowanie i walidacja metody oznaczania atorwastatyny w osoczu

The development and validation of plasma atorvastatin level measurement method

Andrzej Czyrski, Mateusz Naskręt

Katedra i Zakład Farmacji Fizycznej i Farmakokinetyki, Uniwersytet im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu

Streszczenie

Wstęp. Hipercholesterolemia jest zaburzeniem metabolicznym prowadzącym do poważnych powikłań sercowo-naczyniowych. Do leków hipolipemicznych zaliczamy inhibitory reduktazy 3-hydroksy-3-metyloglutarylo-CoA. Jednym z nich jest atorwastatyna. Do jej oznaczania we krwi wykorzystuje się metodę HPLC. **Cel pracy.** Celem powyższej pracy była walidacja metody oznaczania atorwastatyny w osoczu. **Materiał i metody.** Izolację atorwastatyny z surowicy uzyskano za pomocą ekstrakcji ciecz-ciecz do octanu etylu. Zastosowanym wzorcem wewnętrznym był 2,2'-dinitrobifenyl. Rozdział przeprowadzono w odwróconym układzie faz. **Wyniki.** Atorwastatyna, wzorzec wewnętrzny i inne substancje endogenne rozdzielone zostały na kolumnie z zastosowaniem fazy ruchomej acetonitryl-bufor fosforanowy (57:43 v/v). Detekcja była prowadzona przy długości fali 240 nm. Walidacja metody uwzględniała liniowość, dokładność oraz powtarzalność (oznaczenia *inter-* i *intraday*). **Omówienie.** Opracowana metoda spełnia wymogi walidacyjne dla metod analitycznych przeznaczonych do oznaczania poziomu leków w matrycach biologicznych. **Wnioski.** Opracowana metoda może być wykorzystana do podstawowych parametrów farmakokinetycznych atorwastatyny takie jak stała eliminacji, objętość dystrybucji oraz biologiczny okres półtrwania. (*Farm Współ 2017; 10: 131-135*)

Słowa kluczowe: atorwastatyna, HPLC, osocze, walidacja

Summary

Introduction. Hypercholesterolemia may lead to cardiovascular diseases. The inhibitors of 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA reductase (including atorvastatin) are one of hypolipidemic agents. To determine atorvastatin concentration in plasma, HPLC methods are used. **Aim.** The aim of the study was to develop and validate a new method for the determination of atorvastatin in plasma. **Material and methods.** The drug was extracted by liquid-liquid extraction with ethyl acetate. The internal standard was 2,2'-dinitrobiphenyl. The separation was performed in reversed-phase system. **Results.** Atorvastatin, internal standard and other endogenous substances were separated on the column with the use of acetonitrile: phosphate buffer (57:43, v/v) mobile phase. Then, the separation was performed with HPLC-UV method at the wavelength 240 nm. The validation included assessment of linearity, specificity and repeatability (inter- and intraday). **Discussion.** The developed method meets the validation recommendations for bioanalytical methods. **Conclusion.** This method might be useful in determining atorvastatin concentration and calculation of pharmacokinetic parameters such as elimination rate constant, half-life and volume of distribution. (*Farm Współ 2017; 10: 131-135*)

Keywords: atorvastatin, HPLC, plasma, validation

Wstęp

Cholesterol jest składnikiem błon komórkowych organizmu. Jego zbyt wysoki poziom we krwi stanowi zaburzenie metaboliczne znane jako hipercholesterolemia. Jest ona znaczącym czynnikiem ryzyka powodującym miażdżycę oraz choroby sercowo-naczyniowe [1,2]. Podwyższony poziom cholesterolu prowadzi do rozwoju blaszki miażdżycowej, w skład której wchodzi jeszcze inne frakcje lipidowe oraz komórki krwi. W efekcie może to spowodować zamknięcie światła naczynia, co może doprowadzić do udaru lub zawału. Schorzenia te są znaczącą przyczyną śmiertelności w dzisiejszym społeczeństwie. Z tego też powodu opracowana została tabela SCORE, która na podstawie wartości stężenia cholesterolu, ciśnienia krwi, wieku, płci oraz palenia tytoniu określa 10-letnie ryzyko zgonu w wyniku incydentu sercowo-naczyniowego. Schemat ten jest jednym z najczęściej używanych przez lekarzy, w celu uświadomienia pacjentom, jak duży wpływ mają poszczególne czynniki na wzrost zagrożenia chorobami sercowo-naczyniowymi [1,3].

Atorwastatyna jest syntetycznym, wybiórczym inhibitorem reduktazy 3-hydroksy-3-metyloglutarylo-CoA (HMG-CoA). Jest ona odpowiedzialna za zatrzymanie przemiany HMG-CoA do mewanolianu, prekursora steroli. Powoduje to zahamowanie syntezy cholesterolu w wątrobie. Ponadto blokuje to syntezę innych produktów przemiany mewanolianu, takich jak pirofosforan geranylu, dolichol i ubiquinon [4]. Przyczynia się to do wzrostu ekspresji receptorów dla LDL oraz zwiększonego wychwytu LDL. Z takiego działania wynika znaczne obniżenie stężenia cholesterolu całkowitego oraz frakcji LDL. Zmniejsza się też stężenie VLDL, apolipoproteiny B i trójglicerydów [4-8].

Zdolność atorwastatyny do hamowania działania reduktazy HMG-CoA wynika z jej specyficznej budowy. Lek ten, podobnie jak inne statyny, zawiera w swej strukturze kwas 3,5-dihydroksyheptanowy, który wykazuje podobieństwo do HMG-CoA. Umożliwia to wiązanie się cząsteczek z centrum aktywnym enzymu, przez co dochodzi do jego zablokowania dla właściwego substratu, a w efekcie zatrzymania syntezy cholesterolu [5, 9].

Cel pracy

Celem niniejszej pracy jest walidacja oznaczania atorwastatyny w osoczu metodą wysokosprawnej chromatografii cieczowej (HPLC). W toku przeprowadzonych badań dokonano walidacji oraz optyma-

lizacji składu fazy ruchomej, co zapewniło całkowity rozdział analitu i wzorca wewnętrznego od substancji endogennych.

Material i metody

Odczynniki

W toku przeprowadzonych badań zostały użyte następujące odczynniki: metanol (Merck), acetonitryl (Merck), atorwastatynian wapnia (Biofarm), NaH_2PO_4 (Sigma-Aldrich), 2,2'-dinitrobifenyl (Sigma-Aldrich), octan etylu (Sigma-Aldrich), wodorotlenek sodu (POCH), osocze ludzkie (Wojewódzka Stacja Krwiodawstwa i Krwiolecznictwa w Poznaniu), kolumna chromatograficzna SUPELCOSIL LC-18-DB (wielkość ziaren 5 μm , długość 250 mm).

Przygotowanie roztworów

Przygotowano roztwór podstawowy atorwastatyny o stężeniu 2 mg/ml poprzez rozpuszczenie odpowiedniej ilości leku w metanolu. Z powyższego roztworu przygotowano roztwory podstawowe z zakresu stężeń 0,5-100,0 $\mu\text{g/ml}$.

Roztwór 2,2'-dinitrobifenylu (wzorca wewnętrznego) o stężeniu 2 mg/ml przygotowano poprzez rozpuszczenie odpowiedniej ilości substancji w acetonitrylu a następnie pobrano 100 μl i uzupełniono octanem etylu do 100 ml.

0,1 M roztwór NaH_2PO_4 otrzymano poprzez rozpuszczenie odpowiedniej ilości substancji w wodzie. Roztwór doprowadzono do pH 7,0 za pomocą roztworu NaOH.

Przygotowanie prób do oznaczeń

Oznaczanie atorwastatyny wykonano za pomocą wysokosprawnej chromatografii cieczowej (HPLC). Do 500 μl osocza dodano 50 μl mianowanego roztworu atorwastatyny. Otrzymano roztwory o następujących stężeniach 0,05 $\mu\text{g/ml}$; 0,1 $\mu\text{g/ml}$; 0,2 $\mu\text{g/ml}$; 0,5 $\mu\text{g/ml}$; 1 $\mu\text{g/ml}$; 5 $\mu\text{g/ml}$; 10 $\mu\text{g/ml}$. Następnie dodano 500 μl buforu fosforanowego. Ekstrakcję przeprowadzono przy użyciu 3000 μl octanu etylu z dodatkiem 2,2'-dinitrobifenylu. Otrzymane roztwory wytrząsano przez 10 min, po czym poddano je 10-minutowemu wirowaniu przy prędkości 2000 g. Następnie pobrano fazę organiczną. Rozpuszczalnik odparowano przy użyciu azotu w temp. 40°C, a suchą pozostałość rozpuszczono w 100 μl metanolu.

Wzorcem wewnętrznym stosowanym w badaniu był 2,2'-dinitrobifenyl. Czas trwania analizy wynosił 10

min przy przepływie 1 ml/min i w temperaturze 25°C. Objętość nastrzyku wynosiła 40 µl. Fazę ruchomą stanowiła mieszanina acetonitrylu i buforu fosforanowego w stosunku 57:43. Detekcję prowadzono przy długości fali 240 nm.

Oznaczenie odzysku

Do oznaczenia odzysku przygotowano 3 serie próbek dla 3 stężeń roztworów atorwastatyny: 0,1 µg/ml; 0,5 µg/ml; 5 µg/ml. W tym celu pobrano 500 µl osocza, 500 µl buforu fosforanowego 50 µl metanolu oraz 3000 µl octanu etylu wraz z 2,2'-dinitrobifenylem. Następnie wytrząsano przez 10 min, po czym poddano je 10-minutowemu wirowaniu przy prędkości 2000 g. Po odwirowaniu pobrano fazę organiczną. Rozpuszczalnik odparowano przy użyciu azotu w temp. 40°C, a suchą pozostałość rozpuszczono w 50 µl metanoleowego roztworu atorwastatyny o stężeniach odpowiednio 1,0 µg/ml, 5,0 µg/ml oraz 50 µg/ml z dodatkiem 50 µl metanolu.

LOD i LOQ

W ramach walidacji metody wyznaczono także granicę wykrywalności (LOD) oraz granicę oznaczalności (LOQ) substancji. Pierwszy współczynnik określa najmniejsze stężenie lub też najmniejszą ilość substancji, jaka możliwa jest do wykrycia przy wykorzystaniu danej metody.

Granica oznaczalności natomiast wyraża najmniejsze stężenie lub najmniejszą ilość substancji, jaka możliwa jest do ilościowego oznaczenia z użyciem danej metody analitycznej przy założonej dokładności i precyzji [10].

$$\text{LOD} = \frac{3,3 \cdot s}{b}$$

$$\text{LOQ} = 2 \cdot \text{LOD}$$

gdzie:

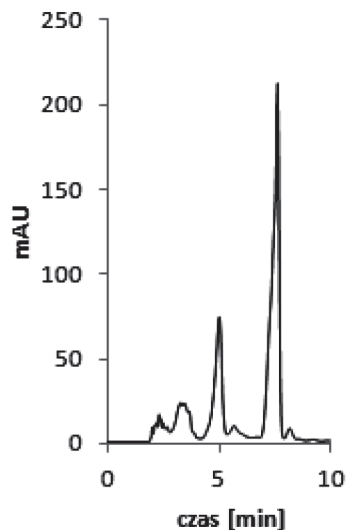
s – odchylenie standardowe wyników dla serii próbek ślepych

b – współczynnik kierunkowy krzywej kalibracyjnej

Wyniki

Celem pracy było opracowanie i walidacja metody oznaczania atorwastatyny – jednego z najszerzej stosowanych leków w hipercholesterolemii. Badania takie przeprowadzono przy wykorzystaniu wysokosprawnej chromatografii cieczowej (HPLC) z detektorem UV i przy zastosowaniu 2,2'-dinitrobifenylu jako wzorca

wewnętrzny (IS). Sporządzona została krzywa wzorcowa, będąca zależnością stosunku powierzchni piku atorwastatyny do powierzchni piku IS od stężenia leku [$P_{\text{ato}}/P_{\text{IS}} = f(c)$]. Obejmowała zakres stężeń 0,05-10 µg/ml. Współczynnik korelacji przekroczył wartość 0,999 co świadczy o liniowości metody. Uzyskano chromatogram, na którym czas retencji badanego leku wyniósł 5,0 minut, a 2,2'-dinitrobifenylu 7,6 minut (rycina 1). W innych metodach jako wzorzec wewnętrzny wykorzystywano diklofenak lub ibuprofen. Jako rozpuszczalnik organiczny stosowano acetonitryl lub metanol. Fazę wodną stanowiła woda, bądź bufor (fosforanowy, octanowy). Detekcję prowadzono przy następujących długościach fali 237, 247 bądź 254 nm [11]. W opracowanej metodzie do izokratycznej elucji zastosowano mieszaninę acetonitrylu i buforu fosforanowego w stosunku 57:43 (v/v), a detekcję przeprowadzono przy długości fali 240 nm.



Rycina 1. Chromatogram analizy (Atorwastatyna t_r – 5,0 min, 2,2'-dinitrobifenyl t_r – 7,6).

Figure 1. The chromatogram of analysis (Atorvastatin t_r – 5,0 min, 2,2'-dinitrobifenyl t_r – 7,6)

Shah i wsp. [12] opisali metodę oznaczania atorwastatyny wykorzystującą metodę HPLC w odwróconym układzie faz. Jako wzorzec wewnętrzny wykorzystano naproksen. Fazę ruchomą stanowiła mieszanina metanolu i wody w stosunku 68:32 o pH = 3 doprowadzoną za pomocą kwasu trifluorooctowego. Detekcja prowadzona była przy długości fali 241 nm. Zakres krzywej

Tabela I. Parametry walidacji

Table I. The validation parameters

Stężenie [µg/l]	Oznaczenie <i>Inter-day</i>		Oznaczenie <i>Intra-day</i>	
	Precyzja [%]	Dokładność [%]	Precyzja [%]	Dokładność [%]
0,1	14,76	108,69	11,33	106,64
0,5	3,58	104,29	2,08	94,74
5,0	1,27	97,13	3,94	92,16

wzorcowej wynosił 3,0-384,0 ng/ml, a współczynnik korelacji wyniósł 0,999.

Dokonano także oznaczeń *inter-* oraz *intra-day* w celu potwierdzenia powtarzalności metody analitycznej. Oba oznaczenia wykonano dla stężeń 0,1 µg/ml, 0,5 µg/ml, 5 µg/ml, a otrzymane wyniki zebrano w tabeli I. Dla oznaczenia *interday* współczynnik precyzji nie przekroczył 14,76%. W przypadku analizy *intraday* wyniósł mniej niż 11,33%. Wartości współczynnika dokładności dla oznaczenia *interday* mieściły się w zakresie 97,13-108,69%. Ten sam parametr dla analizy *intraday* był zawarty w przedziale 92,16-106,64%. Otrzymane wyniki świadczą o dobrej powtarzalności opracowanej metody.

Przeprowadzono analizę odzysku dla stężeń 0,1 µg/ml, 0,5 µg/ml oraz 5 µg/ml. Odzysk dla poszczególnych stężeń wyniósł kolejno 89,28%; 93,69%; 96,38%, natomiast współczynnik precyzji nie przekraczał 8,43% (tabela II). Metoda opracowana przez Shah i wsp. charakteryzuje się odzyskiem równym 98% [12].

Tabela II. Odzysk atorwastatyny z matrycy

Table II. The recovery of atorvastatin from the matrix

Stężenie [µg/l]	Odzysk [%]	Precyzja [%]
0,1	89,28	2,19
0,5	93,69	5,39
5,0	96,38	8,43

Ostatnimi wyznaczanymi parametrami w celu walidacji metody było oznaczenie LOD oraz LOQ. Są

to kolejno najniższe stężenie wykrywalne oraz oznaczone przy wykorzystaniu danej metody analitycznej i świadczą o jej czułości. W opracowanej metodzie wynosiły one kolejno 0,024 µg/ml oraz 0,048 µg/ml. W celu zbadania selektywności metody przeprowadzono analizę potencjalnie najczęściej przyjmowanych leków wraz z atorwastatyną takich jak perindopril, bisoprolol, amlodypina, hydrochlortiazyd, piracetam, kwas acetylosalicylowy, klopidogrel. Żadna z wymienionych substancji nie interferowała z pikami analitów

Wnioski

Wszystkie parametry wyznaczone w trakcie badań były zbliżone do ich wartości literaturowych. Świadczy to o wystarczająco dokładnej walidacji metody, która z powodzeniem może zostać wykorzystana do analizy poziomu atorwastatyny w osoczu pacjentów.

Konflikt interesów/Conflict of interest

Brak/None

Podziękowania/Acknowledgments

Autorzy pragną podziękować firmie Biofarm Sp. z o.o. za udzielenie atorwastatynie do badań.

Adres do korespondencji:

✉ Andrzej Czyrski

Katedra i Zakład Farmacji Fizycznej i Farmakokinetyki
Uniwersytet im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu
ul. Święcickiego 6; 60-781 Poznań

☎ (+48 61) 854 64 33

✉ aczyrski@ump.edu.pl

Piśmiennictwo

1. Sarr FS, André C, Guillaume YC. Statins – biomimetic membrane binding mechanism investigated by molecular chromatography. *J Chromatogr B*. 2008;868(1-2):20-7.
2. Ferrières J, Bérard E, Crisan O i wsp. Residual dyslipidaemia after statin treatment in France: Prevalence and risk distribution. *Arch Cardiovasc Dis*. 2010;103(5):302-9.
3. Reiner Ž, Catapano AL, Graham I. ESC/EAS Guidelines for the management of dyslipidaemias. *Eur Heart J*. 2011;32:1769-818.
4. Ghataka A, Faheemb O, Thompson PD. The genetics of statin-induced myopathy. *Atherosclerosis*. 2010;210(2):337-43.
5. Zając M, Pawełczyk E, Jelińska A. *Chemia leków dla studentów farmacji i farmaceutów*. Poznań; 2006. str. 264-266.
6. Papadopoulos G, Delakas D, Nakopoulou L. Statins and prostate cancer: Molecular and clinical aspects. *Eur J of Cancer*. 2011;47(6): 819-30.
7. Butterfield DA, Barone E, Mancuso C. Cholesterol-independent neuroprotective and neurotoxic activities of statins: Perspectives for statin use in Alzheimer disease and other age-related neurodegenerative disorders. *Pharmacological Res*. 2011;64(3):180-6.
8. Kouroumichakis I., Papanas N., Proikaki S: Statins in prevention and treatment of severe sepsis and septic shock. *Eur J of Intern Med*. 2011;22(2):125-33.
9. Pfefferkorn JA, Litchfield J, Hutchings R: Discovery of novel hepatoselective HMG-CoA reductase inhibitors for treating hypercholesterolemia: A bench-to-bedside case study on tissue selective drug distribution. *Bioorg Med Chem Lett*. 2011;21(9):2725-31.
10. Konieczka P, Namieśnik J, Zygmunt B. *Ocena i kontrola jakości wyników analitycznych*. Gdańsk; 2004. str. 111-161.
11. Nováková L, Šatínský D, Solich P. HPLC methods for the determination of simvastatin and atorvastatin. *TRAC- Trend Anal Chem*. 2008;27(4):352-67.
12. Shah Y, Iqbal Z, Ahmad L. Simultaneous determination of rosuvastatin and atorvastatin in human serum using RP-HPLC/UV detection: Method development, validation and optimization of various experimental parameters. *J Chromatogr B*. 2011;879(9-10):557-63.