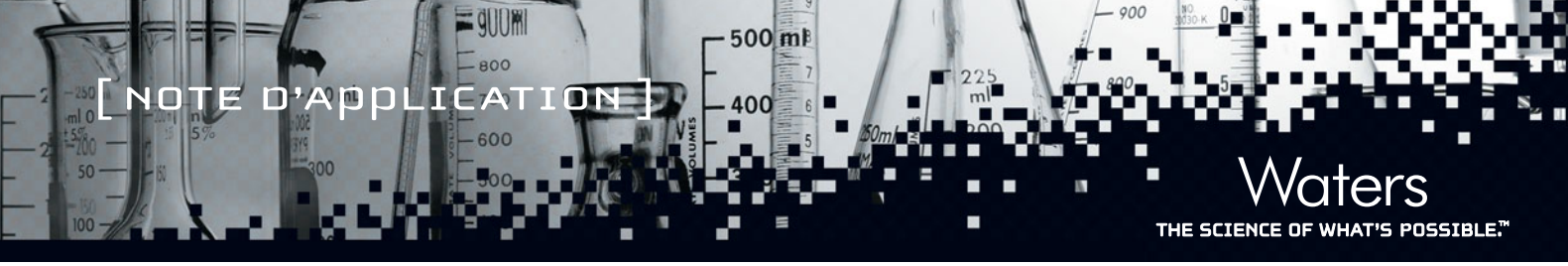

TRANSPOSITION DU CONTRÔLE USP DE LA SIMVASTATINE EN UPLC

Paul Rainville et Robert Plumb
Waters Corporation, Milford, MA, États-Unis

INTRODUCTION

La simvastatine (figure 1), utilisée comme agent diminuant la lipidémie, est un dérivé synthétique d'un produit de fermentation de *Aspergillus terreus*. Après ingestion orale, la simvastatine (une lactone inactive) est hydrolisée jusqu'à la forme b-hydroxyacide correspondante. Ce produit est un inhibiteur de la hydroxyméthylglutaryl-coenzyme A réductase (HMG-CoA réductase). L'enzyme catalyse la conversion du HMG-CoA en mévalonate, ce qui constitue une étape précoce et limitante de la biosynthèse du cholestérol.

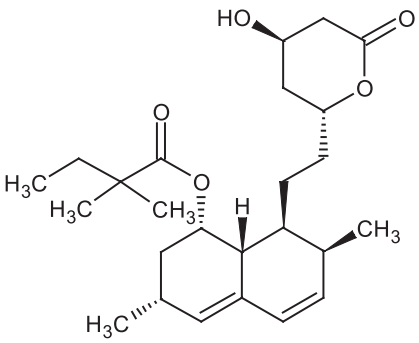

Figure 1. Structure chimique de la simvastatine.

La simvastatine est le plus souvent administrée par voie orale sous forme de comprimé contenant 5 mg, 10 mg, 20 mg ou 80 mg du principe actif (simvastatine) ainsi que les excipients suivants : cellulose, hydroxypropyl cellulose, hydroxypropyl méthylcellulose, oxydes de fer, lactose, stéarate de magnésium, amidon, talc, dioxyde de titanium et autres substances. L'hydroxyanisol butylé est ajouté comme conservateur.

L'analyse mesurant l'uniformité de lot pour la simvastatine est obtenue à l'aide de la chromatographie liquide à haute performance (HPLC) avec détection par ultraviolets (UV). Plus cette analyse peut être réalisée rapidement, plus le produit fini peut être commercialisé rapidement et générer des bénéfices. La monographie USP 30–NF 25 pour les comprimés de simvastatine fait appel à l'utilisation d'un système chromatographique en phase liquide opérant à un débit d'environ 1,5 mL par minute, équipé d'un détecteur UV travaillant à 238 nm, et d'une colonne de 4,6 mm x 25 cm contenant des particules de type L1 et maintenue à une température de 45 °C. Les performances de l'analyse dépendent du facteur de capacité, k´, lequel ne doit pas être inférieur à 3,0. L'efficacité de la colonne ne doit pas être inférieure à 4 500 plateaux théoriques, avec un facteur de symétrie USP ne dépassant pas 2,0 et une déviation standard relative pour les injections répétées ne dépassant pas 2,0 %. L'analyse actuelle basée sur la technologie HPLC implique une durée d'analyse de 12 minutes, avec un temps de rétention de 9,28 minutes pour le principe actif, la simvastatine.

L'UltraPerformance LC® est une nouvelle génération de sciences séparatives reposant sur les principes bien établis de la chromatographie liquide et utilisant des particules poreuses inférieures à 2 µm. Ces particules opèrent à des vitesses linéaires élevées pour produire des séparations rapides avec une sensibilité et une résolution accrues. Par conséquent, la technologie UPLC® permet de réduire considérablement la durée d'analyse tout en répondant malgré tout aux critères d'acceptation basés sur le nombre de plateaux, la résolution et la rétention des composés. Dans cette note d'application, nous démontrons la manière dont l'analyse HPLC de la simvastatine a été transposée en UPLC. L'analyse UPLC est comparée aux critères USP en termes de performances et de qualité.

CONDITIONS EXPÉRIMENTALES

Une solution étalon de simvastatine a été préparée conformément à la méthodologie USP, puis diluée jusqu'à une concentration de 100 µg/mL pour l'analyse chromatographique.

Conditions HPLC

Système LC :	Système ACQUITY UPLC®
Colonne :	XBridge™ C_{18} 4,6 x 250 mm, 5 µm
Phase mobile :	65 % acétonitrile/35 % tampon phosphate, pH 4,5
Débit :	1,5 mL/min
Volume d'injection :	10 µL
Température :	45 °C
Détection :	ACQUITY UPLC PDA à 238 nm

TRANSPOSITION DU CONTRÔLE USP DE LA SIMVASTATINE EN UPLC

Conditions UPLC

Système LC :	Système ACQUITY UPLC
Colonne :	ACQUITY UPLC BEH C_{18}
	2,1 x 100 mm, 1,7 µm et
	2,1 x 30 mm, 1,7 µm
Phase mobile :	65 % acétonitrile/35 % eau
Débit :	0,56 mL/min
Volume d'injection :	0,8 µL
Température :	45 °C
Détection :	ACQUITY UPLC PDA à 238 nm

RÉSULTATS ET DISCUSSION

La séparation HPLC de la simvastatine est illustrée en figure 2. On peut constater que le composé a été élué en 9,28 minutes. L'analyse HPLC a généré une valeur k' de 5,5, un nombre de plateaux 4σ de 12 112 et un facteur de symétrie USP de 0,94.

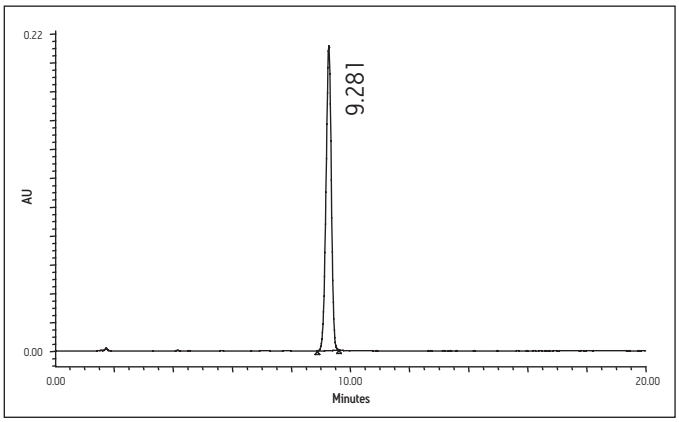

Figure 2. Séparation HPLC de la simvastatine.

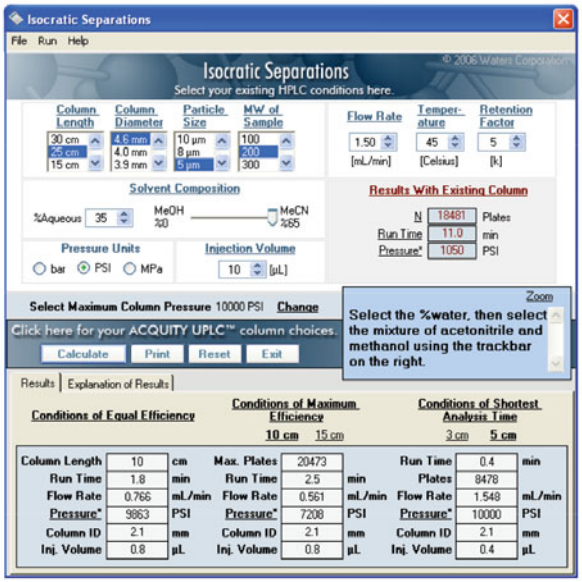

Figure 3. Calculateur de la console ACQUITY UPLC.

La méthode HPLC a été tranposée en UPLC à l'aide du calculateur de la console ACQUITY UPLC. Le calculateur permet à l'utilisateur de saisir les conditions HPLC actuelles, y compris la longueur de la colonne, la composition de la phase mobile et le débit. Le calculateur génère ensuite trois résultats : 1) les conditions dites d'« efficacité égale », 2) les conditions dites d'« efficacité maximale » et 3) les conditions dites du « temps d'analyse le plus court ». Les conditions HPLC pour la simvastatine ont été saisies et les résultats obtenus sont présentés ci-dessous (figure 3).

Les données générées font apparaître trois résultats liés à chaque condition de transposition en UPLC. Le calculateur transpose les conditions HPLC en UPLC, en tenant compte des changements intervenus au niveau du diamètre de la colonne et de la taille des particules pour calculer le débit. Les conditions équivalentes sont calculées en ajustant le débit selon un ratio de $2{,}1^2/4{,}6^2$ pour tenir compte du diamètre de la colonne, puis multipliées par un ratio de 5/1,7 pour tenir compte de la réduction de la taille des particules.

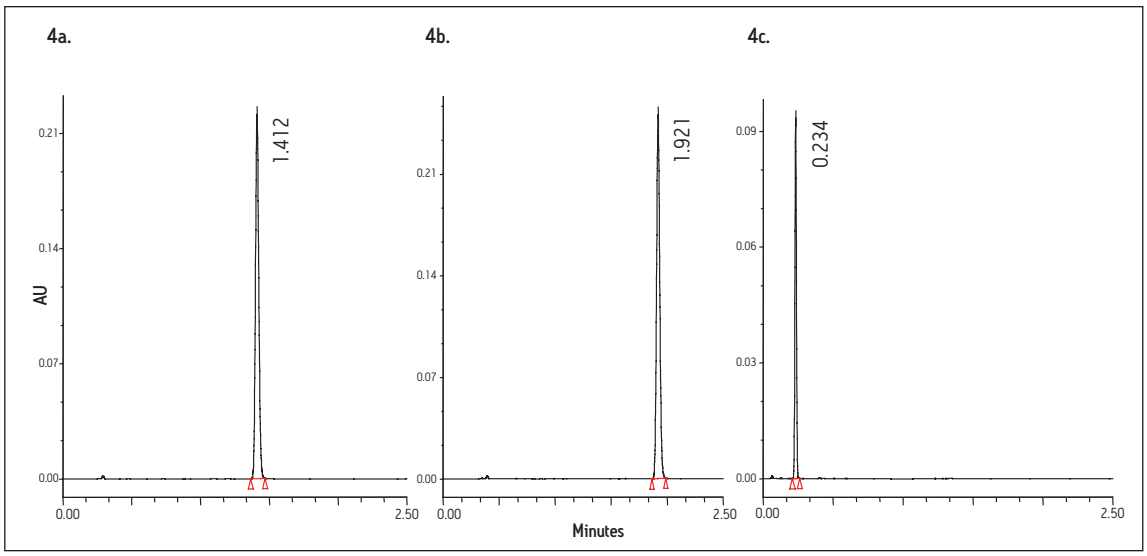

Figure 4. Analyse UPLC de la simvastatine utilisant 4a) les conditions d'efficacité égale, 4b) les conditions d'efficacité maximale et 4c) les conditions du temps d'analyse le plus court, selon les transpositions du calculateur de la console ACQUITY UPLC.

Analyses UPLC

Le volume d'injection a été transposé et tient compte du changement de volume de la colonne.

Les conditions obtenues selon le critère d'efficacité égale suggèrent un volume d'injection de 0,8 µL et l'utilisation d'une colonne de 2,1 x 100 mm, 1,7 µm, C_{18} opérant à un débit de 766 µL/min. Dans la mesure où le volume d'injection suggéré était très faible, une boucle d'injection de 2 µL a été installée sur l'injecteur automatique. Les données obtenues dans ces conditions sont illustrées en figure 4a.

Les résultats indiquent une durée d'analyse de 1,41 minutes. Le système ACQUITY UPLC a produit une efficacité de 12 874 plateaux théoriques, une valeur k´ de 4,88 et un facteur de symétrie USP de 1,10. Ces valeurs sont supérieures aux valeurs HPLC d'origine qui étaient respectivement de 12 112 pour l'efficacité, 5,5 pour k´, et 0,94 pour le facteur de symétrie USP.

Les conditions obtenues selon le critère d'efficacité maximale ont nécessité l'utilisation d'un débit de 560 µL/min et une durée d'analyse de 1,92 minutes. Les données obtenues dans ces conditions sont illustrées ci-dessous en figure 4b. On peut constater que la rétention du pic était légèrement supérieure à celle obtenue dans les conditions d'efficacité égale. Les calculs de performance chromatographique indiquent que l'efficacité est de 17 685 plateaux théoriques, le facteur k´ de 5 et le facteur de symétrie USP de 1,10.

Les conditions obtenues selon le critère du temps d'analyse le plus court ont été réalisées sur une colonne de 2,1 x 30 mm, 1,7 µm, C_{18}, à un débit de 1,5 mL/min. Les données générées sont illustrées en figure 4c. Ces conditions ont conduit à une durée d'analyse de 0,23 minute seulement ; toutefois, la valeur d'efficacité de cette séparation était inférieure aux critères d'acceptation USP.

Transposition de la méthode et paramètre L/dp

La transposition de méthode a été obtenue en maintenant le rapport L/dp constant ; l'analyse initiale a utilisé une colonne de 250 mm et de granulométrie 5 µm, ce qui a produit une valeur L/dp de 50 (250/5). En utilisant une colonne de 2,1 x 100 mm, 1,7 µm, C_{18}, la valeur L/dp devient 59, ce qui a permis d'utiliser un système chromatographique plus efficace. Toutefois, lors de l'utilisation de la colonne de 2,1 x 30 mm, 1,7 µm, C_{18}, la valeur de L/dp a été réduite à 29 ; c'est pourquoi l'efficacité chromatographique n'a pas atteint les critères d'acceptation USP.

TRANSPOSITION DU CONTRÔLE USP DE LA SIMVASTATINE EN UPLC

Performances de l'analyse

Les conditions UPLC retenues pour l'utilisation et l'évaluation étaient celles de la transposition utilisant le critère d'efficacité égale, car elles produisaient la plus grande cadence d'analyses tout en répondant aux critères d'acceptation du test. Les performances de reproductibilité ont été évaluées en utilisant les conditions développées par le calculateur de la console. Les résultats générés sont illustrés ci-dessous dans le tableau 1, où l'on peut constater que le coefficient de variation pour cette méthodologie a été déterminé à 0,883 pour six injections répétées de 0,8 µL d'une solution étalon de simvastatine. Ces résultats se situaient largement dans les critères d'acceptation USP pour la méthodologie.

NOM DU PIC: SIMVASTATINE						
	INJECTION	NOM DU PIC	TR	AIRE	% AIRE	HAUTEUR
1	1	Simvastatine	1,374	388681	100,00	234823
2	2	Simvastatine	1,374	389533	100,00	235199
3	3	Simvastatine	1,374	383973	100,00	231690
4	4	Simvastatine	1,375	380276	100,00	229737
5	5	Simvastatine	1,375	386983	100,00	233379
6	6	Simvastatine	1,375	386800	100,00	233178
MOYENNE			1,375	386041		
ÉCART TYPE			0,000	3410		
% ÉCART TYPE RELATIF			0,03	0,833		

Tableau 1. Reproductibilité de l'analyse UPLC de la simvastatine utilisant la méthodologie définie par le critère d'efficacité égale.

CONCLUSION

La méthodologie USP utilisant la technique HPLC-UV pour l'analyse du médicament de simvastatine destiné à réduire le taux de cholestérol a été transposée avec succès vers une méthode ACQUITY UPLC. La méthodologie finale a réduit la durée d'analyse passant de 9,28 minutes avec la méthode HPLC à 1,41 minutes seulement avec la méthode UPLC (soit une multiplication de la cadence d'analyses par sept). Le calculateur de la console ACQUITY UPLC a été utilisé pour transposer facilement la méthodologie existante vers la méthode ACQUITY UPLC utilisant des particules inférieures à 2 µm. Le calculateur a donné trois options différentes pour les méthodes UPLC : conditions d'efficacité égale, d'efficacité maximale et de temps d'analyse le plus court. Les calculs liés au critère d'efficacité égale ont produit une transposition quasi exacte des performances chromatographiques par rapport aux conditions HPLC d'origine. Dans les conditions UPLC répondant à la transposition selon le critère d'efficacité égale ou maximale, les paramètres USP en matière d'efficacité, de k' et de symétrie ont été remplis ou dépassés. La performance de reproductibilité a été déterminée pour la méthode d'efficacité égale et a donné un écart type inférieur à 1 % pour la répétition de six injections. Enfin, l'analyse a été transposée sur le système ACQUITY UPLC avec une méthode répondant au critère du temps d'analyse le plus court, ce qui a produit une durée d'analyse de 0,3 minute avec un temps de rétention pour notre composé de 0,23 minute, le tout aboutissant à une multiplication par 40 du débit.

Nous avons démontré la facilité de transposer la méthode d'analyse HPLC vers une analyse UPLC ainsi que les avantages que cela peut apporter dans tout laboratoire où le temps, les ressources et/ou les bénéfices sont essentiels. La méthode UPLC permet d'augmenter considérablement le débit en conservant une bonne qualité des résultats. De plus, grâce aux différentes dimensions de colonnes ACQUITY UPLC BEH, les chromatographistes disposent de la flexibilité nécessaire pour adapter leurs séparations UPLC aux objectifs visés.

Waters

THE SCIENCE OF WHAT'S POSSIBLE.™

Waters, ACQUITY UPLC, UltraPerformance LC et UPLC sont des marques deposées de Waters Corporation. XBridge et The Science of What's Possible sont des maques de Waters Corporation. Toutes les autres marques sont la propriété de leurs propriétaires respectifs.

©2006-2007 Waters Corporation. Imprimé aux États-Unis.
Janvier 2007 720001901FR LG-CP

Waters Corporation
34 Maple Street
Milford, MA 01757 États-Unis.
T: +1 508 478 2000
F: +1 508 872 1990
www.waters.com