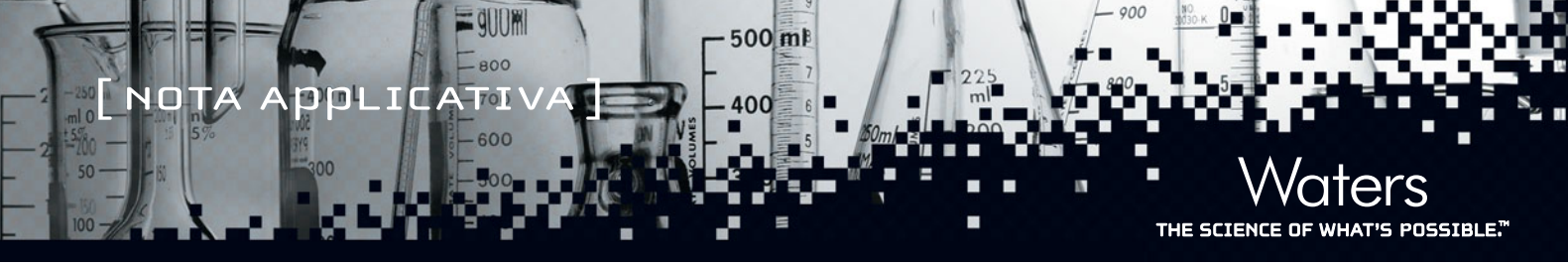

TRASFERIMENTO DELL'ANALISI USP PER LA SIMVASTATINA AL SISTEMA UPLC

Paul Rainville e Robert Plumb
Waters Corporation, Milford, MA, USA

INTRODUZIONE

La simvastatina (Figura 1) è un agente ipolipidemizzante, derivato sinteticamente da un prodotto di fermentazione *dell'Aspergillus terreus*. Dopo ingestione orale, la simvastatina (un lattone inattivo) è idrolizzata nella corrispondente forma beta-idrossiacida. Si tratta di un inibitore della 3-idrossi-3-metilglutaril coenzima A (HMG-CoA) reduttasi. Questo enzima catalizza la conversione dell'HMG-CoA in mevalonato, una fase precoce e limitante la velocità nella biosintesi del colesterolo.

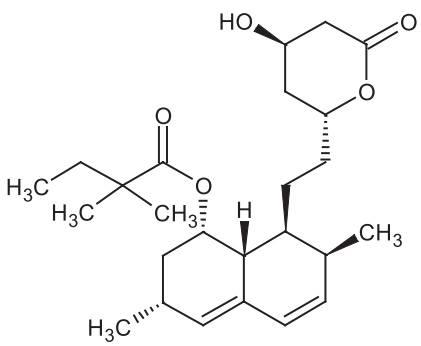

Figura 1. Struttura chimica della simvastatina.

La simvastatina è generalmente somministrata per via orale in compresse contenenti 5, 10, 20, 40 o 80 mg del principio attivo farmaceutico (simvastatina) e i seguenti ingredienti inattivi: cellulosa, idrossipropil cellulosa, idrossipropilmetilcellulosa, ossidi del ferro, lattosio, magnesio stearato, amido, talco, biossido di titanio e altri eccipienti. L'idrossianisolo butilato è aggiunto come conservante.

L'analisi di uniformità del contenuto della simvastatina è realizzata utilizzando la cromatografia liquida ad alte prestazioni (HPLC) con rivelatore UV. Quanto più rapidamente questa analisi viene eseguita, tanto più rapidamente il prodotto finito può essere distribuito e potranno realizzarsi gli utili. L'attuale analisi monografica USP 30–NF 25 delle compresse di simvastatina necessita di un cromatografo liquido dotato di un rivelatore UV a 238-nm e di una colonna da 4,6 mm x 25 cm rispondente al codice L1, mantenuta a una temperatura di 45 °C, e un flusso di 1,5 mL al minuto. L'esecuzione dell'analisi richiede un fattore di capacità, k´, non inferiore a 3,0. L'efficienza della colonna non deve essere inferiore a 4.500 piatti teorici, con un fattore di simmetria non superiore a 2,0 e una deviazione standard relativa per iniezioni ripetute non superiore a 2,0%. L'attuale analisi basata sul sistema HPLC ha un tempo di analisi di 12 minuti, con un tempo di ritenzione di 9,28 minuti per il principio attivo simvastatina.

UltraPerformance LC® è una nuova soluzione nell'ambito della chimica analitica separativa e si basa sui noti e consolidati principi della cromatografia liquida, utilizzando particelle porose sub-2 µm. Queste particelle operano a velocità lineari della fase mobile elevate e producono separazioni rapide con sensibilità e risoluzione migliori. La tecnologia UPLC® consente dunque di ridurre enormemente i tempi di analisi, pur garantendo il rispetto dei criteri di accettazione dell'analisi in termini di numero di piatti teorici, risoluzione e ritenzione dell'analita. In questa nota applicativa illustriamo le modalità di trasferimento dell'analisi HPLC per la simvastatina al sistema UPLC. L'analisi UPLC è confrontata con i criteri dell'analisi USP in termini di prestazioni e qualità.

ESECUZIONE DI PROVA

Una soluzione standard di simvasta na, preparata secondo la metodica USP, è stata diluita a 100 µg/mL per essere sottoposta alle analisi cromatografiche.

Condizioni HPLC

Sistema LC:	Sistema ACQUITY UPLC®
Colonna:	XBridge™ C_{18}
	4,6 x 250 mm, 5 µm
Fase mobile:	65% acetonitrile/35% tampone fosfato, pH 4,5
Velocità di flusso:	1,5 mL/min
Volume di iniezione:	10 µL
Temperatura:	45 °C
Rilevamento:	ACQUITY UPLC PDA @ 238 nm

TRASFERIMENTO DELL'ANALISI USP PER LA SIMVASTATINA AL SISTEMA UPLC

Condizioni UPLC

Sistema LC:	Sistema ACQUITY UPLC
Colonna:	ACQUITY UPLC BEH C_{18}
	2,1 x 100 mm, 1,7 µm e
	2,1 x 30 mm, 1,7 µm
Fase mobile:	65% acetonitrile/35% soluzione acquosa
Velocità di flusso:	0,56 mL/min
Volume di iniezione:	0,8 µL
Temperatura:	45 °C
Rilevamento:	ACQUITY UPLC PDA @ 238 nm

RISULTATI E DISCUSSIONE

La figura 2 illustra la separazione HPLC della simvastatina; si può vedere che l'analita è stato eluito con un tempo di ritenzione di 9,28 minuti. L'analisi HPLC ha generato un valore di k' di 5,5 e un numero di piatti teorici 4σ di 12.112, con un fattore di scodamento di 0,94.

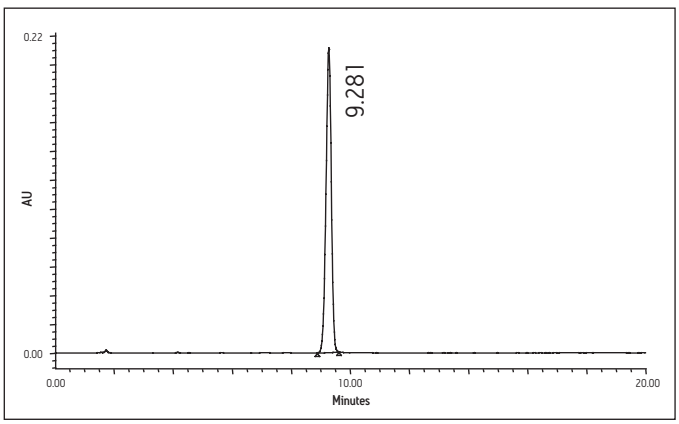

Figure 2: Separazione HPLC della simvastatina.

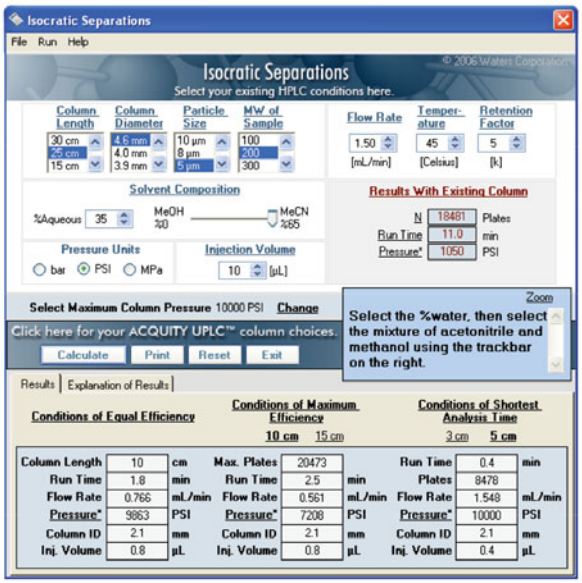

Figura 3: Calcolatore della console ACQUITY UPLC.

Il metodo HPLC è stato adattato all'UPLC usando il calcolatore della console ACQUITY UPLC. Il calcolatore consente all'utente di immettere le condizioni HPLC in uso, incluse lunghezza della colonna, composizione della fase mobile e velocità di flusso. Il calcolatore genera quindi tre risultati: 1.) le condizioni di "Pari efficienza", 2.) le condizioni di "Massima efficienza" e 3.) le condizioni di "Tempo d'analisi minimo". Nella figura 3 riportata sopra sono illustrati i risultati ottenuti inserendo le condizioni HPLC per la simvastatina.

I dati generati mostrano tre risultati relativi a tre condizioni UPLC potenziali. Il calcolatore trasferisce le condizioni HPLC al sistema UPLC, tenendo conto delle variazioni del diametro della colonna e della dimensione delle particelle nel calcolo della velocità di flusso. Le condizioni equivalenti sono calcolate regolando la velocità di flusso secondo un rapporto di $2{,}1^2/4{,}6^2$ per tenere conto della geometria della colonna e, quindi, moltiplicando per il rapporto di 5/1,7 per tener conto della riduzione di dimensione delle particelle.

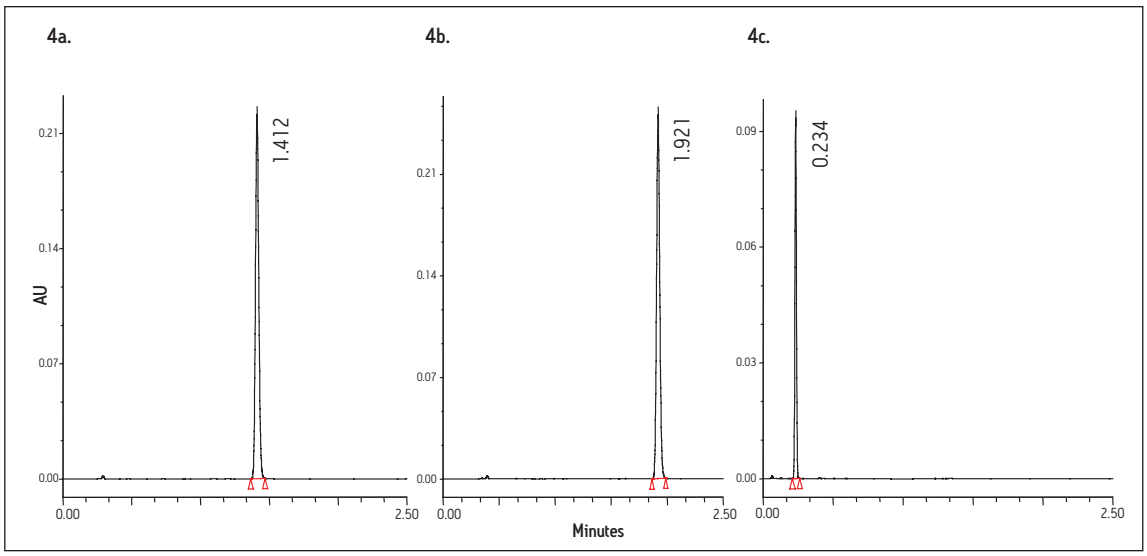

Figura 4. Analisi UPLC per la simvastatina usando 4a.) le condizioni di Pari efficienza, 4b.) le condizioni di Massima efficienza e 4c.) le condizioni di Tempo d'analisi minimo, come indicato dal calcolatore della console ACQUITY UPLC.

Analisi UPLC

Il volume di iniezione è stato adattato per tener conto della variazione del volume totale della colonna.

Le condizioni trasferite di Pari efficienza hanno suggerito l'uso di una colonna C_{18} da 2,1 x 100 mm, 1,7 µm, operante a una velocità di flusso di 766 µL/min e a un volume d'iniezione di 0,8 µL. Siccome il volume di iniezione suggerito era molto basso, nell'autocampionatore è stato installato un loop d'iniezione da 2 µL. I dati ottenuti utilizzando queste condizioni sono illustrati nella figura 4a.

I risultati indicano un tempo di analisi di 1,41 minuti. Il sistema ACQUITY UPLC ha prodotto un'efficienza di 12.874, un valore di k´ di 4,88 e un fattore di scodamento USP di 1,10. Questi valori sono migliori dei valori HPLC originali di 12.112 per l'efficienza, 5,5 per k´ e di 0,94 per il fattore di scodamento.

Le condizioni di Massima efficienza hanno richiesto l'uso di una velocità di flusso di 560 µL/min e un tempo di analisi di 1,92 minuti. I dati ottenuti utilizzando queste condizioni sono illustrati nella figura 4b, dove si può osservare che la ritenzione del picco è stata leggermente superiore rispetto alle condizioni di Pari efficienza. I calcoli delle prestazioni cromatografiche hanno rivelato che l'efficienza cromatografica è cresciuta, arrivando a un valore di 17.685, il fattore k´ è stato di 5 e il fattore di scodamento è stato di 1,10.

Le condizioni di Tempo d'analisi minimo sono state eseguite su una colonna C_{18} da 2,1 x 30 mm, 1,7 µm, a una velocità di flusso di 1,5 mL/min. I dati generati sono illustrati nella figura 4c. Queste condizioni hanno determinato un tempo di analisi di appena 0,23 minuti; l'efficienza di questa separazione è però risultata al di sotto dei criteri di accettazione USP per questa analisi.

Trasferimento metodo: il rapporto L/dp

Il trasferimento metodo è stato ottenuto mantenendo il rapporto L/dp costante; le condizioni iniziali hanno previsto l'utilizzo di una colonna da 250 mm e di una particella da 5 µm, per un valore di L/dp di 50 (250/5). Passando a una colonna C18 da 2,1 x 100 mm, 1,7 µm, il rapporto L/dp è aumentato e passato a 59, e ciò ha consentito di ottenere un sistema cromatografico più efficiente. Quando è stata impiegata una colonna C_{18} da 2,1 x 30 mm, 1,7 µm, il rapporto L/dp è stato ridotto a 29; per questo motivo l'efficienza dell'analisi cromatografica non ha soddisfatto i criteri di accettazione USP.

TRASFERIMENTO DELL'ANALISI USP PER LA SIMVASTATINA AL SISTEMA UPLC

Esecuzione dell'analisi

L'analisi UPLC scelta per l'utilizzo e la valutazione è stata quella che ha impiegato le condizioni di Pari efficienza, in quanto ha prodotto il massimo rendimento, soddisfacendo, al tempo stesso i criteri di accettazione dell'analisi. La riproducibilità dell'analisi è stata valutata utilizzando le condizioni sviluppate dal calcolatore della console. I risultati generati sono mostrati di seguito nella tabella 1, dove possiamo osservare che la RSD percentuale per questa metodologia è di 0,883 per sei iniezioni ripetute da 0,8 µL dello standard di simvastatina. Questi risultati si sono situati perfettamente entro i criteri di accettazione USP per la metodologia.

NOME PICCO: SIMVASTATINA						
	INIEZ.	NOME PICCO	RT	AREA	% AREA	ALTEZZA
1	1	Simvastatina	1.374	388681	100.00	234823
2	2	Simvastatina	1.374	389533	100.00	235199
3	3	Simvastatina	1.374	383973	100.00	231690
4	4	Simvastatina	1.375	380276	100.00	229737
5	5	Simvastatina	1.375	386983	100.00	233379
6	6	Simvastatina	1.375	386800	100.00	233178
MEDIA			1.375	386041		
DEV. STD.			0.000	3410		
RSD %			0.03	0.833		

Tabella 1. Riproducibilità dell'analisi UPLC per la simvastatina utilizzando la metodica di Pari efficienza.

CONCLUSIONI

La metodologia USP HPLC-UV per l'analisi del farmaco riduttore del colesterolo simvastatina è stata trasferita con successo a un metodo ACQUITY UPLC. La metodologia finale ha ridotto il tempo dell'analisi: da una ritenzione dell'analita di 9,28 minuti con l'HPLC a una ritenzione dell'analita di appena 1,41 minuti con l'UPLC (un aumento della velocità di 7 volte). Il calcolatore della console ACQUITY UPLC è servito da semplice guida per trasferire la metodologia al sistema ACQUITY UPLC, che ha impiegato particelle sub-2 µm. Il calcolatore ha fornito tre opzioni distinte per i metodi UPLC: condizioni di Pari efficienza, Efficienza massima e Tempo d'analisi minimo. I calcoli con la condizione di Pari efficienza hanno fatto conseguire un trasferimento delle prestazioni cromatografiche con condizioni quasi del tutto corrispondenti a quelle HPLC originali. Con le condizioni di Pari efficienza e Massima efficienza UPLC i criteri di efficienza, k´ e accodamento dell'analisi USP sono stati raggiunti o anche superati. La RSD percentuale relativa al grado di riproducibilità dell'analisi, determinato per il metodo di Pari efficienza, è risultata inferiore all'1% per sei iniezioni ripetute. Infine, l'analisi è stata trasferita sul sistema ACQUITY UPLC con le condizioni di Tempo d'analisi minimo, facendo conseguire un tempo di analisi di 0,3 minuti con una ritenzione dell'analita di 0,23 minuti, per un incremento del rendimento di 40 volte.

Abbiamo dimostrato la semplicità di trasferimento metodo dal sistema HPLC all'UPLC e i vantaggi che si possono ottenere in qualsiasi laboratorio orientato al risparmio di tempo e risorse e/o alla redditività; in questi casi il sistema UPLC può aumentare significativamente il rendimento, fornendo risultati di qualità. Inoltre, l'ampia gamma di dimensioni delle colonne ACQUITY UPLC BEH consente ai ricercatori di disporre della flessibilità necessaria per adattare le loro separazioni UPLC agli obiettivi fissati.

Waters

THE SCIENCE OF WHAT'S POSSIBLE.™

Waters, ACQUITY UPLC, UltraPerformance LC e UPLC sono marchi depositati di Waters Corporation. XBridge e The Science of What's Possible sono marchi di fabbrica di Waters Corporation. Tutti gli altri marchi di fabbrica sono proprietà esclusiva dei rispettivi proprietari.

©2006-2007 Waters Corporation. Stampato negi U.S.A.
Gennaio 2007 720001901IT LG-CP

Waters Corporation
34 Maple Street
Milford, MA 01757 U.S.A.
T: +1 508 478 2000
F: +1 508 872 1990
www.waters.com