

# Desarrollo y validación de una técnica de cromatografía líquida de alta resolución para la determinación de atorvastatina en plasma en un biomodelo experimental de arteriosclerosis en pollo

E. Fernández-Varón<sup>a</sup>, R. Bermejo<sup>b</sup>, I. Ayala<sup>c</sup>, B. García-Pérez<sup>d</sup>, A. Tvarijonaviciūtė<sup>c</sup> y C. Cárceles<sup>a</sup>

<sup>a</sup>Departamento de Farmacología. Facultad de Veterinaria. Universidad de Murcia. Murcia. España.

<sup>b</sup>Departamento de Química Física Analítica. EUP de Linares. Universidad de Jaén. Jaén. España.

<sup>c</sup>Departamento de Medicina Veterinaria. Facultad de Veterinaria. Universidad de Murcia. Murcia. España.

<sup>d</sup>Servicio de Medicina Interna. Hospital Universitario Virgen de la Arrixaca. Murcia. España.

---

**Introducción.** La atorvastatina es un inhibidor de la HMG-CoA reductasa que ha mostrado una gran eficacia en la reducción de las concentraciones de colesterol y triglicéridos en los pacientes con hiperlipidemia primaria o hiperlipidemia combinada. Cuando se utilizan biomodelos animales de arteriosclerosis con frecuencia se extrapolan erróneamente dosis de humanos a los animales de experimentación, lo que puede evitarse mediante estudios farmacocinéticos previos que permitan diseñar regímenes de dosificación adecuados. Para ello, es preciso disponer de técnicas que nos permitan detectar el fármaco en cuestión en plasma —en nuestro estudio la atorvastatina en un biomodelo de arteriosclerosis en el pollo— y que la

cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) utilizada tenga una buena reproducibilidad y exactitud.

**Métodos.** La técnica utilizada para detectar y cuantificar las concentraciones de atorvastatina en plasma fue la HPLC con detector de fluorescencia. Previamente se realizó un estudio de fluorescencia de la molécula con el fin de determinar las longitudes de onda utilizadas, tanto de excitación como de emisión. Una vez puesta a punto la técnica, se utilizó para la determinación de las concentraciones en el estado estacionario del fármaco en el biomodelo de arteriosclerosis en el pollo.

**Resultados.** Tras el procesamiento de las muestras correspondientes y la inyección en el sistema HPLC, se obtuvo un pico correspondiente a la atorvastatina a los 16,3 min. La concentración de atorvastatina en plasma fue lineal ( $r > 0,999$ ) en el rango de concentraciones utilizadas. El porcentaje de recuperación de la técnica estuvo en el rango comprendido entre el 88 y el 96%.

**Conclusiones.** Los datos obtenidos en nuestro estudio han mostrado unos buenos resultados en cuanto a su facilidad, bajo coste y buena reproducibilidad de la técnica.

**Palabras clave:**

Atorvastatina. HPLC. Farmacocinética. Biomodelo. Arteriosclerosis.

---

Trabajo financiado por la Fundación Séneca (Centro de Coordinación de la Investigación de Murcia), PI-7/00785/FS/01. Mención Especial del Comité Científico a las mejores comunicaciones presentadas en el XVII Congreso Nacional de la Sociedad Española de Arteriosclerosis (Murcia, 2-5 junio de 2004).

Correspondencia: Dr. E. Fernández-Varón.  
Departamento de Farmacología. Facultad de Veterinaria.  
Universidad de Murcia. Campus de Espinardo.  
30071 Murcia. España.  
Correo electrónico: emiliofv@um.es

Recibido el 24 de febrero de 2005 y aceptado el 7 de abril de 2005.

## DEVELOPMENT AND VALIDATION OF AN HPLC METHOD FOR THE MEASUREMENT OF ATORVASTATIN IN AN EXPERIMENTAL MODEL OF ATHEROSCLEROSIS IN CHICKENS

**Introduction.** Atorvastatin is a hydroxy-methylglutaryl coenzyme A (HMG-CoA) reductase inhibitor that has shown to be efficacious in reducing both cholesterol and triglycerides in patients with primary hyperlipidemia or combined hyperlipidemia. An erroneous extrapolation of human doses to animal arteriosclerosis biomodels is often employed. This practice can be avoided through pharmacokinetics studies aimed to designing correct dosing regimens. Therefore, it is necessary to develop methods of drug analysis in plasma. In our study, atorvastatin was used in a biomodel of atherosclerosis in chickens. It is essential for these methods to have optimum precision and accuracy.

**Methods.** We used a High Performance Liquid Chromatography (HPLC) method with fluorescence detection for atorvastatin analysis and quantification. Previously, a fluorescence study of atorvastatin molecule in order to establish excitation and emission wavelengths was conducted. The method was used to determine the steady-state concentrations of this drug in the chicken atherosclerosis biomodel.

**Results.** After processing of plasma samples and injection in the HPLC system, the peak corresponding to atorvastatin appeared at 16.3 min. Plasma atorvastatin concentrations were lineal ( $r > 0.999$ ) for the range of concentrations used. Recovery obtained in our study showed the present method to be easy, low-cost and with acceptable precision.

**Conclusions.** Our present data show a technical procedure providing good results regarding its easiness, low cost and good reproducibility.

### Key words:

Atorvastatin. HPLC. Pharmacokinetics. Biomodel. Atherosclerosis.

## Introducción

La atorvastatina (ATV) es un inhibidor de la HMG-CoA reductasa que hasta el momento ha mostrado una gran eficacia en la reducción de las concentraciones de colesterol y triglicéridos en pacientes con hiperlipemia primaria (familiar y no familiar) o hiperlipidemia combinada<sup>1</sup>. El régimen de dosificación de esta estatina varía entre 10 y 80 mg cada 24 h.

Aunque se ha descrito en la bibliografía algún método de determinación de atorvastatina en comprimidos<sup>2</sup> y en plasma mediante técnicas de cromatografía líquida asociada a espectrometría de masas<sup>3-6</sup>, así como para otros fármacos del grupo, estas técnicas resultan muy complejas y económicamente inaccesibles para muchos grupos de investigadores.

La atorvastatina posee una propiedad química intrínseca que le confiere una gran utilidad, la fluorescencia; es decir, si una solución acuosa de atorvastatina es irradiada a una determinada longitud de onda, las moléculas del fármaco emitirán una radiación fluorescente directamente proporcional a la concentración de fármaco que se encuentre en el medio. Esta característica puede utilizarse para determinar las concentraciones de atorvastatina en muestras biológicas mediante las correspondientes técnicas cromatográficas de separación a través de cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) con un detector de fluorescencia, técnica ya descrita para la atorvastatina<sup>7,8</sup> y otras estatinas, como la fluvastatina<sup>9,10</sup>.

El objetivo de este estudio ha sido desarrollar y validar un método de determinación de atorvastatina en plasma, obtenido de un biomodelo experimental de arteriosclerosis en pollos a través de la técnica de HPLC con un detector de fluorescencia.

## Métodos

### Productos y reactivos

La atorvastatina cálcica pura fue proporcionada por Pfizer Pharmaceuticals (Madrid, España). Todos los reactivos utilizados fueron de alto grado de pureza (Sigma-Aldrich, España): acetonitrilo, hidrogenosulfato de tetrabutilamonio, metanol y polietilenglicol 200.

### Soluciones patrón estándar

Las soluciones patrón de atorvastatina cálcica se prepararon a una concentración de 20 mg/l en una mezcla entre agua y metanol de 80:20, que fueron utilizadas como soluciones patrón madre, y posteriormente se añadirían al plasma blanco para la ulterior determinación de la precisión, la recuperación, la exactitud y el límite de cuantificación de la técnica. Estas soluciones patrón fueron protegidas de la luz en todo momento.

### Método analítico

A 300 µl de plasma se le adicionó 300 µl de acetonitrilo para conseguir la precipitación de las proteínas del plasma. A continuación se sometió durante 5 min a un baño de ultrasonidos y, posteriormente, se centrifugó durante 10 min a 1.500 g. Se extrajeron 300 µl del sobrenadante que se introdujeron en los viales del autoinyector para su posterior procesamiento tras la inyección de 50 µl en el sistema.

El sistema HPLC está formado por una bomba LC-10Asvp, un detector de fluorescencia RF-10Axl y un autoinyector SIL-10Advp (Shimadzu, Kyoto, Japón). Todo el sistema está conectado al programa Shimadzu Class-VP™ Chromatography Data

System programme (Shimadzu, Columbia, Estados Unidos). La separación cromatográfica se realizó mediante una columna de fase reversa Discovery C18, 150 × 4,6 mm, 5 µm (Supelco, Bellefonte, Estados Unidos). La fase móvil empleada consistió en una mezcla de acetonitrilo (40%) y una solución acuosa de hidrogenosulfato de tetrabutilamonio (5 g/l; pH = 3) (60%), y se utilizó un método isocrático con una velocidad de flujo constante de 1,0 ml/min. Con estas condiciones el pico correspondiente a la ATV en el cromatograma apareció aproximadamente a los 16,3 min.

### Estudio de fluorescencia de atorvastatina

Previamente a la puesta en marcha del método, se realizó un estudio de fluorescencia de la molécula de ATV con el fin de establecer si ésta poseía propiedades fluorescentes, como era de esperar a la vista de su estructura química, y en caso afirmativo, establecer las longitudes de onda de excitación y de emisión a utilizar, ya que en la bibliografía no se encontraron datos al respecto. Mediante un espectrofluorímetro Shimadzu FP-6500 (Tokio, Japón) se establecieron los espectros de excitación y de emisión de la ATV, con unas longitudes de onda de excitación y de emisión óptimas:

$$\lambda_{\text{ex}} = 310 \text{ nm}; \lambda_{\text{em}} = 386 \text{ nm}$$

### Calibración del método

La curva de calibración del método se realizó mediante la adición de cantidades adecuadas de la solución madre a muestras de plasma blanco para obtener concentraciones finales de ATV de 5, 25, 50 y 100 µg/ml. Estas muestras fueron procesadas del modo anteriormente descrito. La curva de calibración se obtuvo representando las áreas de los picos correspondientes a la ATV en los cromatogramas frente a las concentraciones estándares a que correspondería cada pico, realizando una regresión lineal a través de la cual se obtuvo una ecuación que permite calcular las concentraciones de ATV en función del área del pico obtenido.

### Recuperación, precisión y exactitud

La recuperación del método se calculó mediante la determinación de ATV añadida a las mismas concentraciones estándares en la fase móvil utilizada. La precisión del método se realizó mediante ensayos repetidos (n = 5) interdía e intradía (3 días consecutivos) de 3 concentraciones estándares. La exactitud del método se calculó mediante la comparación de las concentraciones medidas frente a los valores reales añadidos.

### Determinación de atorvastatina en el biomodelo de arteriosclerosis en el pollo

Se extrajo aproximadamente 1 ml de sangre de la vena braquial derecha del grupo experimental E (dieta aterogénica y administración de atorvastatina) a 5 animales del grupo. La muestra se extrajo justo antes de la administración de la dosis diaria de ATV con el fin de que correspondiera a la concentración mínima en el estado estacionario. La muestra de sangre se centrifugó (1.500 g, 10 min) y se extrajo el plasma, que fue procesado el mismo día de su extracción mediante el método descrito anteriormente.

### Resultados

En la tabla 1 se muestran los coeficientes de recuperación de atorvastatina de las muestras utilizadas como control en plasma.

El análisis mediante regresión lineal de las concentraciones empleadas como patrón mostraron linealidad en el rango utilizado en nuestro estudio, con un coeficiente de correlación para todas las curvas realizadas  $\geq 0,999$ , y se obtuvo la ecuación lineal mediante la cual es posible calcular las concentraciones de ATV en función del área del pico correspondiente.

Los análisis realizados con el fin de determinar la precisión (medida como coeficiente de variación [CV] intradía e interdía) y la exactitud<sup>11,12</sup> (medida a través de la diferencia entre la concentración medida y la teórica esperada) se muestran en las tablas 2 y 3. Para todas las concentraciones utilizadas el CV y la exactitud fue  $< 5\%$ , lo cual indica que el método es fiable, reproducible y exacto. Así, no es necesario utilizar un estándar interno.

El límite de cuantificación de esta técnica para la ATV se estableció como la concentración más baja de la curva de calibración obtenida, lo que garantiza que siempre se hallen concentraciones fiables al aplicar la ecuación obtenida.

Las media  $\pm$  desviación estándar de las concentraciones obtenidas tras el procesamiento de las muestras de los animales fue de  $6,3 \pm 0,1$  µg/ml.

**Tabla 1. Recuperación de atorvastatina de plasma**

| Concentración teórica (mg/ml) | Recuperación (%)<br>Media $\pm$ DE (n = 5) |
|-------------------------------|--|
| 25                            | 92,5 $\pm$ 3,2                             |
| 50                            | 88,3 $\pm$ 2,1                             |
| 100                           | 95,8 $\pm$ 4,6                             |

DE: desviación estándar.

**Tabla 2. Exactitud y precisión en la determinación de atorvastatina (intradía)**

| Concentración teórica (µg/ml) | Concentración medida (µg/ml) | Exactitud (%) | Precisión del CV (%) |
|-------------------------------|------------------------------|---------------|----------------------|
| 25                            | 24,84 $\pm$ 1,04             | 99,36         | 4,18                 |
| 50                            | 50,62 $\pm$ 1,64             | 101,24        | 3,25                 |
| 100                           | 99,8 $\pm$ 2,65              | 99,8          | 2,66                 |

CV: coeficiente de variación.

**Tabla 3. Exactitud y precisión en la determinación de atorvastatina (interdía)**

| Concentración teórica (µg/ml) | Concentración medida (µg/ml) | Exactitud (%) | Precisión del CV (%) |
|-------------------------------|------------------------------|---------------|----------------------|
| 25                            | 25,06 $\pm$ 1,3              | 100,24        | 5,19                 |
| 50                            | 50,51 $\pm$ 1,78             | 101,01        | 3,53                 |
| 100                           | 100,53 $\pm$ 2,14            | 100,53        | 2,13                 |

CV: coeficiente de variación.

## Discusión

El desarrollo de un método de HPLC basado en la detección de fluorescencia requiere, en primer lugar, que la molécula analizada posea intrínsecamente la propiedad de fluorescencia cuando es excitada mediante una radiación a una longitud de onda determinada. La existencia de ciclos insaturados aromáticos con propiedades resonantes hacía pensar que la ATV posee propiedades de fluorescencia, lo cual fue corroborado mediante el estudio llevado a cabo, en el cual se obtuvieron sus espectros de emisión y excitación correspondientes que marcaron las longitudes de onda óptimas que debían utilizarse en la excitación (310 nm) y emisión (386 nm). Esto supone una gran ventaja, ya que no precisa derivar. El siguiente paso corresponde a la elección de la fase móvil más adecuada. Tras realizar diversas pruebas con distintos compuestos<sup>13</sup>, se observó que las mejores condiciones se alcanzaban con la mezcla acetonitrilo-hidrogenosulfato de tetrabutylamonio (5 g/l) en una proporción del 40-60%, utilizando un método isocrático. Asimismo, tras probar distintas columnas, los resultados óptimos se alcanzaron con la de 150 × 4,6 mm y 5 µm de tamaño de partícula.

Por otro lado, el método elegido para procesar las muestras está basado en la precipitación de las proteínas con acetonitrilo y el posterior baño de ultrasonidos, aunque se pudo observar que no se conseguía precipitar la totalidad de las proteínas, a la vista de los picos que aparecían en los primeros tiempos de elución (2-5 min), que podrían corresponder a la detección de los aminoácidos triptofano, fenilalanina y tirosina de las proteínas que tienen la capacidad de fluorescencia a determinadas longitudes de onda. Pero esta precipitación incompleta no supone ningún problema en nuestro estudio, ya que el pico correspondiente a la ATV apareció sobre los 16,3 min, muy alejado, por tanto, de esa contaminación inicial en los primeros tiempos; así se demuestra la buena selectividad del método, capaz de separar la ATV en el plasma del resto de componentes que pudieran aparecer. En estas condiciones, la precisión, la exactitud, la linealidad y la recuperación obtenidas garantizan unos buenos resultados al aplicar este método. Sin embargo, cabe destacar que el límite de cuantificación obtenido por la técnica, situado en 5 µg/ml, no es demasiado bajo, hecho que debe tenerse en cuenta a la hora de extrapolar este método al análisis de ATV en otros biomodelos animales, así como en el plasma humano, ya que las concentraciones obtenidas en las muestras de plasma del biomodelo de pollo están por encima de nuestro límite de cuanti-

ficación, lo cual valida nuestro método solamente en este biomodelo<sup>14</sup>. Por consiguiente, para aplicar este método a otro biomodelo o a seres humanos, habría que estudiar de nuevo todos los factores descritos en este estudio para saber si en otros casos el método resulta válido. A estos efectos, hay que resaltar que la disponibilidad de técnicas que nos permitan medir las concentraciones plasmáticas de atorvastatina u otros fármacos en biomodelos animales, es de un gran importancia a la hora de diseñar e interpretar los resultados obtenidos. Con frecuencia, las dosis utilizadas son extrapoladas erróneamente de las dosis utilizadas en seres humanos, con lo que las concentraciones del fármaco que se obtendrán en el biomodelo correspondiente con frecuencia difieren considerablemente de las alcanzadas en humanos. Este problema puede evitarse realizando un estudio farmacocinético previo con el fin de conocer los principales parámetros farmacocinéticos en el biomodelo animal concreto, como el aclaramiento plasmático, el tiempo de vida media y la biodisponibilidad; de este modo se puede diseñar un adecuado régimen de dosificación en función de nuestro biomodelo. El primer paso para ello ha sido establecer un sistema de detección de atorvastatina en plasma mediante una técnica de HPLC, que en nuestro estudio ha mostrado unos buenos resultados en cuanto a su facilidad, bajo coste y buena reproducibilidad.

## Bibliografía

1. Lea AP, McTavish D. Atorvastatin. A review of its pharmacology and therapeutic potential in the management of hyperlipidaemias. *Drugs*. 1997;53:828-47.
2. Ertük S, Sevinç-Akta E, Ersoy L, Samiye F. An HPLC method for the determination of atorvastatin and its impurities in bulk drug and tablets. *J Pharm Biomed Anal*. 2003;33:1017-23.
3. Jemal M, Ouyang Z, Chen B, Teitz D. Quantification of the acid and lactone forms of atorvastatin and its biotransformation products in human serum by high-performance liquid chromatography with electrospray tandem mass spectrometry. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*. 1999;13:1003-15.
4. Xiu-Sheng M, Metcalfe CD. Determination of cholesterol-lowering statin drugs in aqueous samples using liquid chromatography-electrospray ionization tandem mass spectrometry. *J Chromatogr A*. 2003;998:133-41.
5. Nakashima A, Saxer C, Niina M, Masuda N, Iwasaki K, Furukawa K. Determination of fluvastatin and its five metabolites in human plasma using simple gradient reversed-phase high-performance liquid chromatography with ultraviolet detection. *J Chromatogr B*. 2001;760:17-25.
6. Bullen WW, Miller RA, Hayes RN. Development and validation of a high-performance liquid chromatography tandem mass spectrometry assay for atorvastatin, ortho-hydroxy atorvastatin, para-hydroxy atorvastatin in human, dog, and rat plasma. *J Am Soc Mass Spectrom*. 1999;10:55-66.
7. Altuntas TG, Erk N. Liquid chromatographic determination of atorvastatin in bulk drug, tablets, and human plasma. *J Liq Chromatogr RT*. 2004;27:83-93.
8. García S, Soria ML. Extracción en fase sólida y determinación de atorvastatina en suero por HPLC con detección por UV y fluorescencia. *Rev Toxicol*. 2002;19:109.

9. Al-Rawithi S, Hussein RF, Alzahrani A. Sensitive assay for the determination of fluvastatin in plasma utilizing high-performance liquid chromatography with fluorescence detection. *Ther Drug Monit.* 2003;25:88-92.
10. Muck W, Park S, Jager W, Voith B, Wandel E, Galle PR, et al. The pharmacokinetics of cerivastatin in patients on chronic hemodialysis. *Int J Clin Pharmacol Ther.* 2001;39:192-8.
11. Karnes HT, March C. Precision, accuracy, and data acceptance criteria in biopharmaceutical analysis. *Pharm Res.* 1993;10:1426-26.
12. Braggio S, Barnaby RJ, Grossi P, Cugola M. A strategy for validation of bioanalytical methods. *J Pharm Biomed Anal.* 1996;14:375-88.
13. Gazdag M, Szepesi G, Szeleczki E. Optimization for selectivity in reversed-phase chromatography. *J Chromatogr A.* 1988;454:83-94.
14. Grdinic V, Vukovic J. Prevalidation in pharmaceutical analysis (I). Fundamentals and critical discussion. *J Pharm Biomed Anal.* 2004; 35:489-512.