



УДК 543.544

## Определение ловастатина методом тонкослойной хроматографии

Аванесян С.С.<sup>1</sup>, Тимченко Л.Д.<sup>1</sup>, Писков С.И.<sup>1</sup>, Ковалев Д.А.<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Северо-Кавказский федеральный университет, Ставрополь

<sup>2</sup>Ставропольский научно-исследовательский противочумный институт, Ставрополь

Поступила в редакцию 01.07.2015 г.

Широта биологической активности ловастатина привлекает научный интерес и диктует необходимость разработки и совершенствования простых методов его определения. Разработана простая методика определения ловастатина методом тонкослойной хроматографии. Осуществлен подбор хроматографических пластинок и оптимального растворителя для хроматографирования. Определены возможные проявляющие реагенты для обработанных и необработанных УФ-индикатором пластин.

**Ключевые слова:** ловастатин, тонкослойная хроматография

## TLC determination of lovastatin

Avanesyan S.S.<sup>1</sup>, Timchenko L.D.<sup>1</sup>, Piskov S.I.<sup>1</sup>, Kovalev D.A.<sup>2</sup>

<sup>1</sup>North-Caucasus Federal University, Stavropol

<sup>2</sup>Stavropol Research Institute for Plague Control, Stavropol

Lovastatin causes scientific interest with features of its pharmacological and biological activity, that causes necessity for development and improvement of simple methods of its quantitative and qualitative determination. Today for an assessment of a lovastatin the high performance liquid chromatography is used, but HPLC is quite labor-consuming and expensive method, in particular, for primary analysis of a large number of samples. The favourably different is the thin-layer chromatography possessing ability of launching of several samples simultaneously, however TLC isn't proven for determination of a lovastatin. In this connection, the simple, fast and economical way of detection of a lovastatin is developed by method of TLC. The selection and matching of chromatographic plates, solvent systems and a way of detection of chromatograms are made. Optimum solvent for a chromatography is benzene-acetone (8:2). For detection of colourless compound lovastatin are used physical and chemical methods. As a developer for plates with the UV-indicator the ultra-violet radiation may be used. For the plates without UV-indicator the 10-% solution of H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>; 0.1 N solution of KMnO<sub>4</sub> or 10-% solution of phosphomolybdic acid may be used as a detection reagent. Under UV-irradiation on the TLC-1A plate on a white background slightly noticeable pale pink spots of a lovastatin are detected. On plates PTLC-AF-A-UV under UV-irradiation lovastatin is detected as dark spots on a fluorescent background. The 10-% solution of H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> provides light brown spots are formed after dehumidification at a 100° C. The 0.1 N solution of KMnO<sub>4</sub> provides yellow coloring of spots of a lovastatin (PTSH-AF-A-STH-1A) on a pink background. At use of phosphomolybdic acid the dark spots on a yellow background of a plate are formed. At increase in quantity of a lovastatin from 10 µg to 50 µg the proportional extension of the area of a spot is also observed, that confirms an opportunity to carry out a preliminary quantitative assessment of the content of lovastatin in area extent of a spot. The 10% solution of phosphomolybdic acid is the best of the detecting reagent. It is possible to detect the contents more precisely by means of elution of a spot with the suitable solvent and measurement of optical density on the spectrophotometer at wavelength λ=238 nm, if the solvent is ethanol, and at λ=242 nm at use of chloroform. The developed simple, fast and economic way of determination of lovastatin by method of a thin layer chromatography may be used in the analysis of pharmaceutical preparations, researches of the intermediate

and final products of synthesis, and also at an assessment of natural raw materials after preliminary purification.

**Keywords:** lovastatin, thin layer chromatography.

## Введение

Ловастатин все чаще привлекает внимание ученых своей фармакологической активностью. Он уже достаточно апробирован в клинических исследованиях в качестве гиполипидемического средства, однако в настоящее время продолжается изучение других особенностей его биологической активности. Имеются новые данные о его нейропротекторном [1, 2], противоопухолевом [3], антиоксидантном [4] свойствах. Появляются сведения об экспериментах по включению ловастатина в фармакологические комбинации при антиостеопорозной терапии [5], лечении неврологических и психических патологий [6]. Продолжаются исследования токсического действия ловастатина [7].

В связи с этим требуется постоянный качественный и количественный контроль содержания ловастатина не только в готовых очищенных препаратах, но и в сырьевых объектах и промежуточных продуктах синтеза. К настоящему времени для определения уровня ловастатина используется высокоэффективная жидкостная хроматография (ВЭЖХ) [8, 9], которая служит современным чувствительным методом исследования без каких-либо ограничений по физико-химическим свойствам субстанций. Вместе с тем ВЭЖХ является довольно трудоемкой и дорогостоящей методикой в частности для первичного анализа большого числа образцов, что нередко является основным элементом при скрининге.

Выгодно отличающейся в этом от ВЭЖХ является тонкослойная хроматография (ТСХ). Доступный и простой метод ТСХ сегодня остается популярным при изучении химического состава как фармакологических соединений [10, 11], так и биологических объектов [12, 13]. Однако, обладающий возможностью определения нескольких образцов одновременно, метод ТСХ не отработан для определения ловастатина, что актуализирует и объясняет востребованность настоящего исследования. Целью данной работы являлась разработка методики определения ловастатина методом ТСХ.

## Эксперимент

В процессе разработки методики были проведены работы по подбору хроматографических пластинок, системы растворителей и детектирующих реагентов. Учитывая, что ловастатин в своем составе содержит лактоновое кольцо, за основу для системы растворителей используемых при его элюировании был принят состав бензол-ацетон (9:1), используемый для кумаринов, также имеющих лактоновое кольцо [14].

Были апробированы соотношения бензола и ацетона 9:1 и 8:2. Элюирующие системы готовили путем смешивания растворов в указанном соотношении непосредственно перед использованием. Для каждой элюирующей системы определялись величины  $R_f$ . В качестве хроматографических пластинок были использованы пластины Sorbfil марки ПТСХ-АФ-А-УФ с УФ-индикатором УФ-254 и пластины Sorbfil Plates марки СТХ-1А с алюминиевой подложкой.

Для разработки методики использовали образец ловастатина 99.6% (ОАО Нижфарм), соответствующий тестам по Европейской Фармакопее. Стандартный

раствор ловастатина в хлороформе с концентрацией 100 мг/мл готовили по точной навеске. Рабочий раствор ловастатина получали разбавлением стандартного хлороформом до концентрации 5 мг/мл. Для сравнительной оценки чувствительности обнаружения и площади пятна наносили микрошприцем точечно 3 объема рабочего раствора ловастатина 2, 5, 10 мкл с содержанием в них соответственно 10, 25 и 50 мкг ловастатина. Диаметр стартового пятна равнялся 3-4 мм.

Процесс хроматографирования проводили в хроматографической камере 180×75×170 мм, снабженной герметичной крышкой. Элюирование проводилось по восходящему варианту. Высота слоя растворителя 50 мм.

### Обсуждение результатов

Разрешающая способность системы растворителей максимальна в области  $R_f=0.5$  и уменьшается как в сторону старта, так и в сторону фронта. В связи с этим оптимальной системой растворителей считается та, в которой зоны компонентов располагаются вблизи линии с  $R_f=0.5$  [14].

В системе бензол-ацетон (9:1) значение относительной скорости перемещения ловастатина было низким  $R_f=0.08\pm 0.01$  поэтому за систему растворителей была выбрана система бензол-ацетон (8:2), в которой величина  $R_f$  ловастатина составила  $0.28\pm 0.01$ .

Для качественного обнаружения бесцветного соединения ловастатина использовали физические и химические методы [15]. Физический метод применим для обнаружения соединений флуоресцирующих при облучении светом определенной длины волны и не флуоресцирующих соединений, разделенных на слоях адсорбента содержащих УФ-индикатор.

Для определения ловастатина хроматографические пластины рассматривались как в видимом свете, так и в УФ-области спектра. В видимом свете пятна вещества не наблюдались. В УФ-области спектра на пластине марки СТХ-1А на белом фоне выделялись слегка заметные бледно-розовые пятна ловастатина. При наблюдении в УФ-свете пластин ПТСХ-АФ-А-УФ, ловастатин обнаруживался в виде темных пятен на флуоресцирующем фоне  $R_f=0.28 \pm 0.01$  (рис. 1).

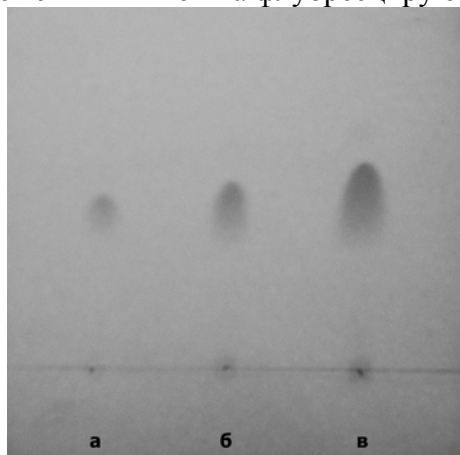


Рис. 1. Хроматограмма ТСХ ловастатина в трех количествах (а-10 мкг; б-25 мкг; в-50 мкг) в ультрафиолетовом свете

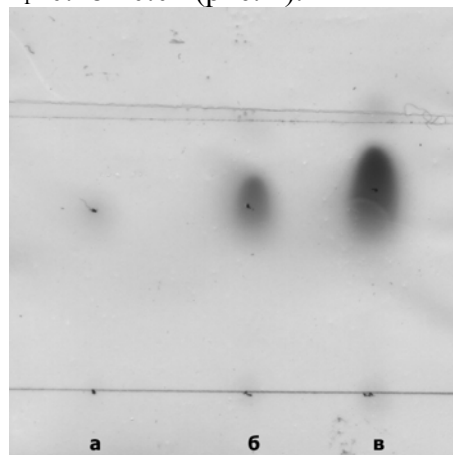


Рис. 2. Хроматограмма ТСХ ловастатина в трех количествах (а-10 мкг; б-25 мкг; в-50 мкг) в присутствии этанольного раствора серной кислоты

При проявлении хроматограмм с использованием химических реагентов образуются окрашенные пятна исследуемого вещества в видимом свете. Были использованы наиболее распространенные неспецифические проявители: 10% этанольный раствор серной кислоты, 0.1 н раствор перманганата калия и 10% спиртовой раствор фосфорномолибденовой кислоты [14, 15].

При обработке пластины (ПТСХ-АФ-А-УФ) 10% раствором серной кислоты после подсушивания при температуре 100°C образовывались светло-коричневые пятна ловастатина,  $R_f=0.28\pm 0.01$  (рис. 2).

При использовании в качестве детектирующего реагента 0.1 н раствора  $KMnO_4$  зоны ловастатина на розовом фоне пластин (ПТСХ-АФ-А-СТХ-1А) приобретали желтое окрашивание,  $R_f=0.31\pm 0.01$  (рис. 3).

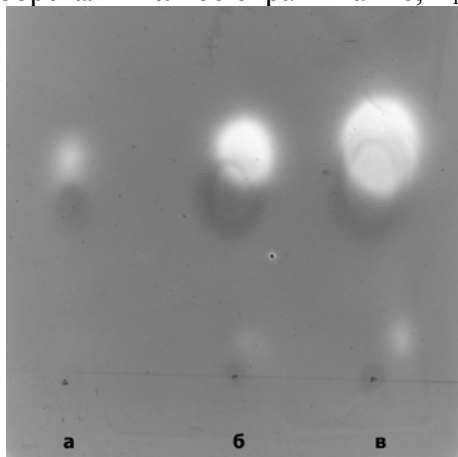


Рис. 3. Хроматограмма ТСХ ловастатина в количествах (а-10 мкг; б-25 мкг; в-50 мкг) в присутствии раствора  $KMnO_4$

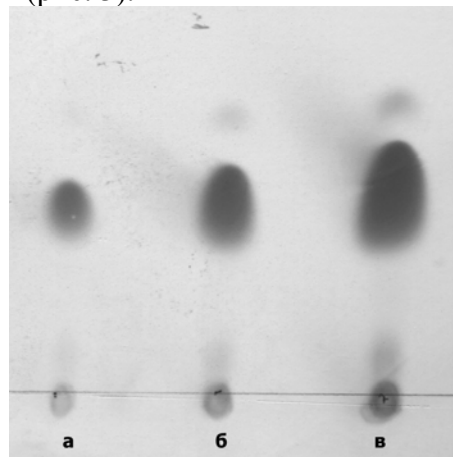


Рис. 4. Хроматограмма ТСХ ловастатина в трех количествах (а-10 мкг; б-25 мкг; в-50 мкг) в присутствии фосфорномолибденовой кислоты

При использовании 10% фосфорномолибденовой кислоты на желтом фоне пластины проявлялись темные пятна ловастатина,  $R_f=0.47\pm 0.01$  (рис 4).

С увеличением количества ловастатина с 10 до 50 мкг наблюдалось и пропорциональное увеличение площади пятна, что подтверждает возможность проводить количественную оценку содержания ловастатина по площади пятна. При этом согласно данным ТСХ наиболее оптимальным детектирующим реагентом, позволяющим получать симметричные хроматографические зоны ловастатина с наименьшим размыванием и обеспечивающим низкий предел обнаружения, что является необходимым условием для проведения количественного анализа, была выбрана 10% фосфорномолибденовая кислота.

Более точно определять содержание можно посредством элюирования пятна соответствующим растворителем и измерением оптической плотности на спектрофотометре при длине волны  $\lambda=238$  нм, если растворитель этанол и при  $\lambda=242$  нм при использовании хлороформа [16].

## Заключение

Разработана простая, быстрая и экономичная методика определения ловастатина, основанная на методе тонкослойной хроматографии, которую можно использовать при качественном, полуколичественном и количественном анализе

фармацевтических препаратов, исследовании промежуточных и конечных продуктов синтеза, а также при оценке природного сырья после предварительной очистки.

В качестве хроматографических пластин можно использовать пластины с силикагельным покрытием, как обработанные, так и не обработанные УФ-индикатором. Оптимальным растворителем для хроматографирования ловастатина является бензол-ацетон (8:2). При проведении качественной и полуколичественной оценки ловастатина проявителем пластин с УФ-индикатором может служить ультрафиолетовое излучение. Проявляющими реагентами для пластин, не обработанных УФ-индикатором, могут выступать 10% H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>; 0.1 н KMnO<sub>4</sub>; 10% фосфорномолибденовая кислота. Оптимальным детектирующим реагентом является 10% фосфорномолибденовая кислота.

Количественное определение ловастатина с минимум определения 10 мкг можно проводить как по площади хроматографического пятна, так и на спектрофотометре замерив оптическую плотность элюированного экстракта.

*Исследование проведено при финансовой поддержке Минобрнауки России, в рамках выполнения базовой части государственного задания (2014/216).*

### Список литературы

1. Li R., Xu D.-E., Ma T. // *Neuroscience*. 2015. Vol. 294, pp. 14-20.
2. Aguirre-Vidal Y., Montes S., Tristan-López L. et al. // *NeuroToxicology*. 2015. Vol. 48, pp. 166-170.
3. Siddiqui R.A., Harvey K.A., Xu Z. et al. // *Bioorganic & Medicinal Chemistry*. 2014. Vol. 22, pp. 1899-1908.
4. Kumar S., Srivastava N., Gomes J. // *Food and Chemical Toxicology*. 2011. Vol. 49, pp. 898-902.
5. Abdul-Majeed S., Mohamed N., Soelaiman I.-N. // *Life Sciences*. 2015. Vol. 125, pp. 42-48.
6. Ghanizadeh A., Rezaee Z., Dehbozorgi S. et al. // *Psychiatry Research*, Vol. 219, pp. 431-435.
7. Саватеева-Любимова Т.Н., Сивак К.В. // *Биомедицина*. 2012. № 4. С. 76-79.
8. Wang J., Luzum J.A., Phelps M.A., Kitzmiller J.P. // *Journal of Chromatography*. 2015. Vol. 983-984., pp. 18-25.
9. Kumar S., Srivastava N., Gupta B.S. et al. // *Food and Bioproducts Processing*. 2014. Vol. 92, pp. 416-424.
10. Kaale E., Nyamweru B.C., Manyanga V. et al. // *International Journal of Chemical and Analytical Science*. 2013. Vol. 4, pp. 73-79.
11. Dhaneshwar S.R. // *Instrumental Thin-Layer Chromatography*. 2015. pp. 451-478.
12. Alajmi M.F., Alam P. // *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*. 2014. Vol. 4, pp. 152-157.
13. Sharma O.P., Kumar N., Singh B., Bhat T.K. // *Food Chemistry*. 2012. Vol. 132, pp. 671-674.
14. Шаршунова, М., Шварц В., Михалец Ч. Тонкослойная хроматография в фармации и клинической биохимии. / Под ред. В.Г. Березкина. М: Мир, 1980. 621 с.
15. Лабораторное руководство по хроматографическим и смежным методам. М. «Мир», 1982. 400 с.
16. Аванесян С.С., Тимченко Л.Д., Писков С.И. Спектрофотометрический метод определения ловастатина // *Интер-медикал*. 2015. № 5 (11). С. 98-102.

### References

1. Li R., Xu D.-E., Ma T., *Neuroscience*, 2015, Vol. 294, pp. 14-20. doi:10.1016/j.neuroscience.2015.03.005
2. Aguirre-Vidal Y., Montes S., Tristan-López L. et al., *NeuroToxicology*, 2015, Vol.48, pp. 166-170. doi:10.1016/j.neuro.2015.03.012
3. Siddiqui R.A., Harvey K.A., Xu Z. et al., *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 2014, Vol.

- 22, pp. 1899-1908. doi: 10.1016/j.bmc.2014.01.051
4. Kumar S., Srivastava N., Gomes J., *Food and Chemical Toxicology*, 2011, Vol. 49, pp. 898-902. doi:10.1016/j.fct.2010.12.014
5. Abdul-Majeed S., Mohamed N., Soelaiman I.-N., *Life Sciences*, 2015, Vol. 125, pp. 42-48. doi:10.1016/j.lfs.2014.12.012
6. Ghanizadeh A., Rezaee Z., Dehbozorgi S. et al., *Psychiatry Research*, Vol. 219, pp. 431-435. doi:10.1016/j.psychres.2014.06.039
7. Savateeva-Lyubimova T.N., Sivak K.V., *Biomedicine*, 2012, No. 4, pp. 76-79.
8. Wang J., Luzum J.A., Phelps M.A., Kitzmiller J.P., *Journal of Chromatography*, 2015, Vol. 983-984, pp. 18-25. doi:10.1016/j.jchromb.2014.12.029
9. Kumar S., Srivastava N., Gupta B.S. et al. *Food and Bioprocess Processing*, 2014, Vol. 92, pp. 416-424. doi:10.1016/j.fbp.2013.10.007
10. Kaale E., Nyamweru B.C., Manyanga V. et al., *International Journal of Chemical and Analytical Science*, 2013, Vol. 4, pp. 73-79. doi:10.1016/j.ijcas.2013.05.001
11. Dhaneshwar S.R., *Instrumental Thin-Layer Chromatography*, 2015, pp. 451-478. doi:10.1016/B978-0-12-417223-4.00017-0
12. Alajmi M.F., Alam P., *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*, 2014, Vol. 4, pp. 152-157. doi: 10.1016/S2221-1691(14)60224-0
13. Sharma O.P., Kumar N., Singh B., Bhat T.K., *Food Chemistry*, 2012, Vol. 132, pp. 671-674. doi:10.1016/j.foodchem.2011.10.069
14. Sharshunova, M., Schwartz W., Mikhalets Ch., *The thin layer chromatography in pharmacy and clinical biochemistry*. M: «World», 1980, 621 p.
15. *Laboratornoe rukovodstvo po hromatograficheskim i smezhnym metodam*, M. «Mir», 1982. 400 p.
16. Avanesjan S.S., Timchenko L.D., Piskov S.I., *Inter-medikal*, 2015, № 5 (11), pp. 98-102.

**Аванесян Светлана Суреновна** – с.н.с. ПНИЛ «Экспериментальной иммуноморфологии, иммунопатологии и иммунобиотехнологии» Центра коллективного пользования научным оборудованием, Северо-Кавказский федеральный университет, Ставрополь.

**Тимченко Людмила Дмитриевна** – д.вет.н., профессор, зав. ПНИЛ «Экспериментальной иммуноморфологии, иммунопатологии и иммунобиотехнологии» Центра коллективного пользования научным оборудованием, Северо-Кавказский федеральный университет, Ставрополь.

**Писков Сергей Иванович** – к.б.н., в.н.с. ПНИЛ «Экспериментальной иммуноморфологии, иммунопатологии и иммунобиотехнологии» Центра коллективного пользования научным оборудованием, Северо-Кавказский федеральный университет, Ставрополь.

**Ковалев Дмитрий Анатольевич** – к.х.н., зам. директора по развитию и инновациям, зав. лабораторией биохимии, Ставропольский научно-исследовательский противочумный институт, Ставрополь.

**Avanesyan Svetlana Surenovna** – senior research associate of PNIL "Experimental immunomorphology, immunopathology and immunobiotechnology" Center of collective use of the scientific equipment, North Caucasian federal university, Stavropol.

**Timchenko Lyudmila Dmitrievna** – doctor of Veterinary, professor, manager of PNIL «Experimental immunomorphology, immunopathology and immunobiotechnology» Center of collective use of the scientific equipment, North Caucasian federal university, Stavropol.

**Piskov Sergey Ivanovich** – Cand. Sci., (Biology), leading Researcher of PNIL «Experimental immunomorphology, immunopathology and immunobiotechnology» Center of collective use of the scientific equipment, North Caucasian federal university, Stavropol, e-mail: [piskovsi77@mail.ru](mailto:piskovsi77@mail.ru)

**Kovalev Dmitry Anatolyevich** – Cand. Sci., (Chemistry), Deputy Director of Development and Innovation, Head of the Laboratory of Biochemistry, Stavropol Research Institute for Plague Control, Stavropol.