

# Análisis de la simvastatina en preparaciones farmacéuticas mediante cromatografía de capa fina de alto rendimiento

## *Analysis of simvastatin in pharmaceutical preparations by high performance thin layer chromatography*

MEYYANATHAN SN\*, RAMASARMA GVS, SURESH B.

Dept. de Química Farmacéutica, J.S.S. College of Pharmacy, Ootacamund – 643 001, Tamilnadu, India.  
E-mail: meyys@rediffmail.com

### RESUMEN

Se ha desarrollado un nuevo método de cromatografía de capa fina de alto rendimiento (HPTLC) sencillo, preciso, rápido y selectivo para el análisis de la simvastatina en preparaciones farmacéuticas. En este método se utiliza la fexofenadina como estándar interno. La fase estacionaria era gel de sílice 60 F<sub>254</sub> prelavado con metanol; como fase móvil se utilizó solución de acetato de etilo, metanol y amoníaco al 25% (7:1,5:0,5 v/v). La detección y la cuantificación se realizaron densitométricamente a  $\lambda = 220$  nm. El rango lineal del análisis fue 0,08 - 0,8  $\mu\text{g}$  y la recuperación porcentual 100,7 %.

PALABRAS CLAVE: HPTLC. Simvastatina. Fexofenadina y comprimidos.

### ABSTRACT

*A new simple, precise, rapid, and selective high-performance thin layer chromatography (HPTLC) method has been developed for the analysis of simvastatin in pharmaceutical preparations. The method uses fexofenadine as an internal standard. The stationary phase was silica gel 60 F<sub>254</sub> prewashed with methanol; ethyl acetate - methanol - ammonia solution 25% (7:1.5:0.5, v/v) was used as mobile phase. Detection and quantification were performed densitometrically at  $\lambda = 220\text{nm}$ . The linear range of the analysis was 0.08 - 0.8  $\mu\text{g}$  and the percentage recovery was 100.7 %.*

KEY WORDS: HPTLC. Simvastatin. Fexofenadine. Tablets.

### INTRODUCCIÓN

La simvastatina éster del (1s-[1 $\alpha$ ,3 $\alpha$ ,7 $\beta$ ,8 $\beta$ {2s\*,4s\*},8a $\beta$ ]-2,2-acido dimetil butanoico-1,2,3,7,8,8ahexa hidro-3,7-dimetil-8-[2-(tetrahidro-4-hidroxi-6-oxo-2H-piran-2-yl)etil]-1-naftalenil es un agente antihiperlipidémico. Se encuentra en la lista de la farmacopea estadounidense (United States Pharmacopoeia, USP)<sup>1</sup>; para su análisis se han publicado cromatografías de gases (GC)<sup>2-4</sup>, y cromatografías líquidas de alto rendimiento (HPLC)<sup>5-9</sup>.

En este artículo publicamos un nuevo método de HPTLC para la determinación de la fexofenadina a partir de formas farmacéuticas de dosifi-

### INTRODUCTION

Simvastatin is (1s-[1 $\alpha$ ,3 $\alpha$ ,7 $\beta$ ,8 $\beta$ {2s\*,4s\*},8a $\beta$ ]-2,2-dimethyl butanoic acid-1,2,3,7,8,8a-hexa hydro-3,7-dimethyl-8-[2-(tetrahydro-4-hydroxy-6-oxo-2H-pyran-2-yl)ethyl]-1-napthalenyl ester is an anti-hyperlipidemic agent. It is listed in the United States Pharmacopoeia (USP)<sup>1</sup>; Gas chromatographic (GC)<sup>2-4</sup>, High-performance liquid chromatographic (HPLC)<sup>5-9</sup> have been reported for its analysis.

In this paper we report a new HPTLC method for determination of simvastatin from pharmaceutical solid dosage forms. The method is simple, precise, rapid, and selective.

cación sólida. El método es simple, preciso, rápido y selectivo.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### *Disolventes y productos químicos*

Los estándares de referencia de simvastatina (99,52%) y fexofenadina (IS) fueron proporcionados por Artemis Pharmaceuticals (Hyderabad, India) y Biochem Pharmaceuticals (Mombai, India) respectivamente. Las formulaciones en comprimidos se adquirieron de las disponibles comercialmente. El acetato etílico, metanol y amoniacó (AR) de calidad cromatográfica fueron proporcionados por Merck (India).

### *Soluciones estándar y de muestra*

2.2.1 Solución estándar: La simvastatina (50 mg) se pesó con precisión en un matraz volumétrico de 50 ml, disuelto en metanol (25 ml), y la solución se diluyó hasta volumen con el mismo disolvente para conseguir una solución de trabajo estándar (1 mg mL<sup>-1</sup>).

2.2.2 Solución de muestra: Se pesaron y molieron finos veinte comprimidos, y el polvo equivalente a 100 mg de fexofenadina pesado con exactitud se transfirió a un matraz volumétrico de 100 ml, se disolvió en metanol (50 ml) y se agitó en un agitador mecánico durante 15 minutos. A continuación, la solución se diluyó hasta volumen con el mismo disolvente, se mezcló y, por último, se filtró con papel Whatmann N° 42. Se diluyó una muestra de 5 ml del filtrado hasta 10 ml con metanol en un matraz volumétrico; esta solución se utilizó para el análisis.

### *Cromatografía*

La cromatografía se realizó sobre placas de gel de sílice 60 F<sub>254</sub> HPTLC con revestimiento de aluminio prelavadas con metanol; las placas se desarrollaron con solución de acetato de etilo, metanol y amoniacó al 25% (7:1,5:0,5 v/v) en una cámara Camag de doble compartimiento.

Las soluciones estándar de simvastatina se transfirieron a distintos matraces volumétricos de 10 ml y se diluyeron hasta volumen con el

## MATERIALS AND METHODS

### *Solvents and Chemicals*

Reference standards of Simvastatin (99.52%) and Fexofenadine (IS) were procured from Artemis Pharmaceuticals (Hyderabad, India) and Biochem Pharmaceuticals (Mumbai, India) respectively. Tablet formulations were procured commercially. Chromatographic grade ethyl acetate, methanol and ammonia (AR) were obtained from Merck (India).

### *Standard and sample Solutions*

2.2.1 Standard solution: Simvastatin (50mg) was accurately weighed into a 50-ml volumetric flask, dissolved in a methanol (25 ml), and the solution was diluted to volume with the same solvent to furnish a working standard solution (1mg mL<sup>-1</sup>).

2.2.2 Sample solution: Twenty tablets were weighed and finely powdered and accurately weighed powder equivalent to 100mg of simvastatin was transferred to a 100-ml volumetric flask, dissolved in methanol (50 ml), and shaken on mechanical shaker for 15 minutes. The solution was then diluted to volume with the same solvent, mixed, and finally filtered through Whatmann No. 42 filter paper. A sample (5ml) of the filtrate was diluted to 10 ml with methanol in a volumetric flask; this solution was used for analysis.

### *Chromatography*

Chromatography was performed on aluminum - backed silica gel 60 F<sub>254</sub> HPTLC plates prewashed with methanol; plates were developed with ethyl acetate - methanol - ammonia solution 25% (7:1.5:0.5, v/v) in a Camag twin - trough chamber.

Standard solutions of Simvastatin were transferred to different 10-ml volumetric flasks and diluted to volume with the methanol such that the final concentrations of Simvastatin were 0.08 - 0.8 µg µL<sup>-1</sup> containing 0.8 µg Fexofenadine (IS) each. Both standards and samples (1 µL simvastatin containing 0.8µg Fexofenadine (IS)) were applied to the plates as 6-mm bands by

metanol de manera que las concentraciones finales de simvastatina fueran de 0,08 - 0,8  $\mu\text{g mL}^{-1}$ , conteniendo cada una de ellas 0,8  $\mu\text{g}$  de fexofenadina (IS). Ambos estándares y muestras (1  $\mu\text{L}$  de fexofenadina conteniendo 0,8 $\mu\text{g}$  de fexofenadina (IS)) se aplicaron a las placas en bandas de 6 mm mediante un aplicador de muestras Camag Linomat IV.

Tras el desarrollo y secado de las placas, la evaluación de ambos fármacos se realizó mediante densitometría de barrido a  $\lambda = 220$  nm mediante un escáner Camag TLC Scanner III controlado mediante el software CATS.V.4.06 (Camag). Se registraron las áreas pico de todos los picos. La cantidad de simvastatina se calculó a partir del área pico mediante la siguiente fórmula:

$$\text{Cantidad de simvastatina (mg)} = (\text{Rmuest} \times \text{C} \times \text{D} \times \text{Peso medio}) / (\text{Restánd} \times \text{W})$$

Donde Rmuest es el área del pico de la simvastatina de muestra, Restánd es el área del pico de la simvastatina estándar, C es la concentración de la solución estándar ( $\text{mg mL}^{-1}$ ), D es el factor de dilución y W es el peso del comprimido (en mg).

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### *Chromatografía*

La fase móvil resolvió los dos fármacos muy eficazmente, como se muestra en la **Figura 1**. Los valores del factor de retardo (Rf) de simvastatina y fexofenadina (IS) fueron 0,89 y 0,20 respectivamente.

Los espectros de absorción típicos de la simvastatina y la fexofenadina (IS) se muestran en las **Figuras 2 y 3**; para realizar la detección se seleccionó la longitud de onda de 220 nm porque la sensibilidad de detección era similar para ambos fármacos. El valor  $\lambda_{\text{máx}}$  de la simvastatina obtenido con el instrumental de HPTLC Camag fue 233 nm, y con el espectrofotómetro de UV Shimadzu fue 238 nm. El valor  $\lambda_{\text{máx}}$  de la fexofenadina obtenido con el instrumental de HPTLC Camag fue 212 nm, y con el espectrofotómetro de UV Shimadzu fue 215 nm. El valor del coeficiente de extinción molar ( $\epsilon$ ) de la simvastatina obtenido mediante fotodensitometría HPTLC fue  $2,2134 \times 10^4$  y el obtenido mediante espectrofotometría UV fue  $2,1539 \times 10^4$ . El método

means of a Camag Linomat IV sample applicator.

After development and drying of the plates, evaluation of both drugs was performed by scanning densitometry at  $\lambda = 220$  nm by means of a Camag TLC Scanner III controlled by CATS.V.4.06 software (Camag). Peak areas were recorded for all the peaks. The amount of Simvastatin was computed from the peak area by use of the formula:

$$\text{Amount of Simvastatin (mg)} = (\text{Rspl} \times \text{C} \times \text{D} \times \text{Average wt}) / (\text{Rstd} \times \text{W})$$

Where, Rspl is the area of the Simvastatin sample peak, Rstd is the area of the Simvastatin standard peak, C is the concentration of standard solution ( $\text{mg mL}^{-1}$ ), D is the dilution factor, and W is the weight of tablet (mg).

## RESULTS AND DISCUSSION

### *Chromatography*

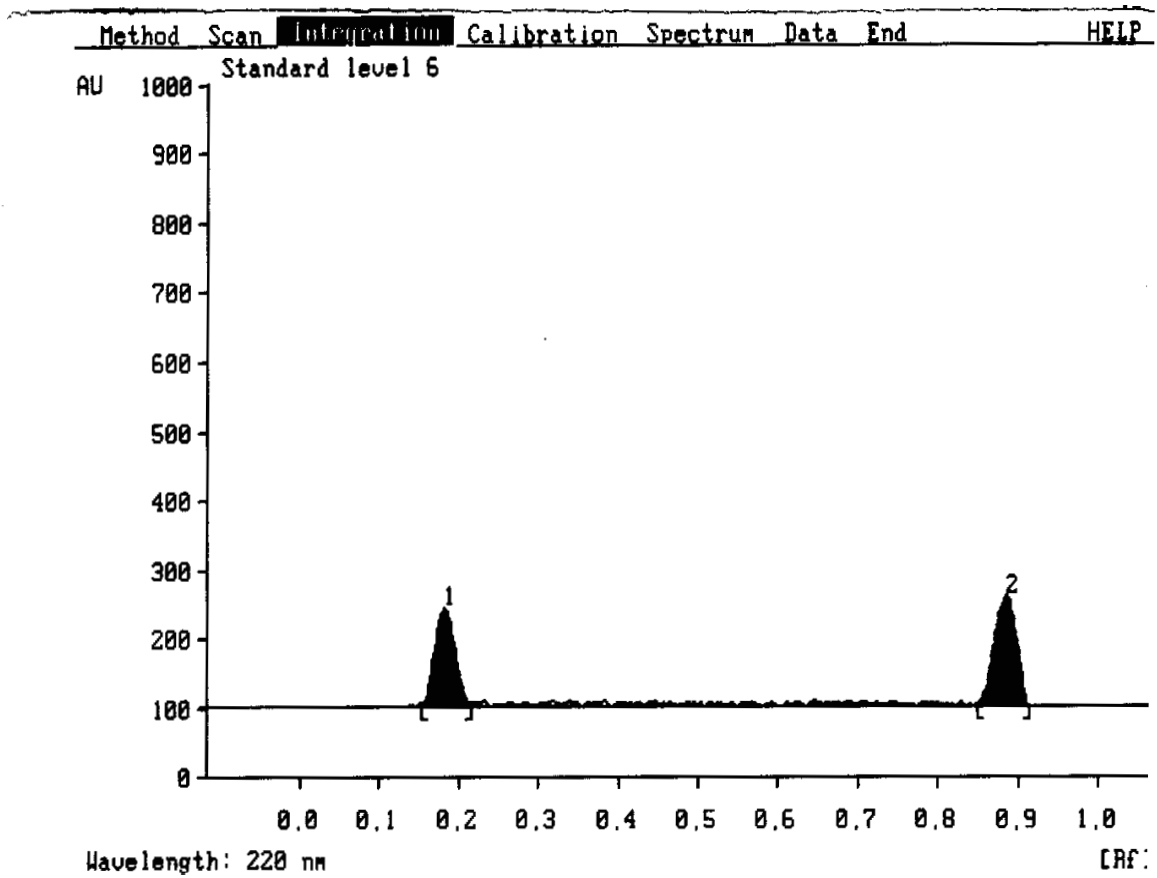
The mobile phase resolved the two drugs very efficiently, as is shown in **Figure 1**. The Rf values of Simvastatin and Fexofenadine (IS) were 0.89 and 0.20, respectively.

Typical absorption spectra of Simvastatin and Fexofenadine (IS) are shown in **Figure 2 and 3**; the wavelength 220 nm was selected for detection because this resulted in similar detection sensitivities for both drugs. The  $\lambda_{\text{max}}$  obtained for simvastatin by using HPTLC Camag instrument was 233 nm and by using UV Shimadzu spectrophotometer was 238 nm. The  $\lambda_{\text{max}}$  obtained for fexofenadine by using HPTLC Camag instrument was 212 nm and by using UV Shimadzu spectrophotometer was 215 nm. The values of the molar extinction coefficient ( $\epsilon$ ) obtained by HPTLC photodensitometry for the simvastatin was  $2.2134 \times 10^4$  and by UV spectrophotometry was  $2.1539 \times 10^4$ . The method was used to determine the Simvastatin content of three commercial brands of tablets; the results are shown in **Table 1**. The low RSD values are indicative of the high accuracy and precision of the method.

se utilizó para determinar el contenido de simvastatina de tres marcas comerciales de comprimidos; los resultados se muestran en la **Tabla 1**. Los bajos valores de desviación estándar relativa (DER) son indicativos del alto grado de exactitud y precisión del método.

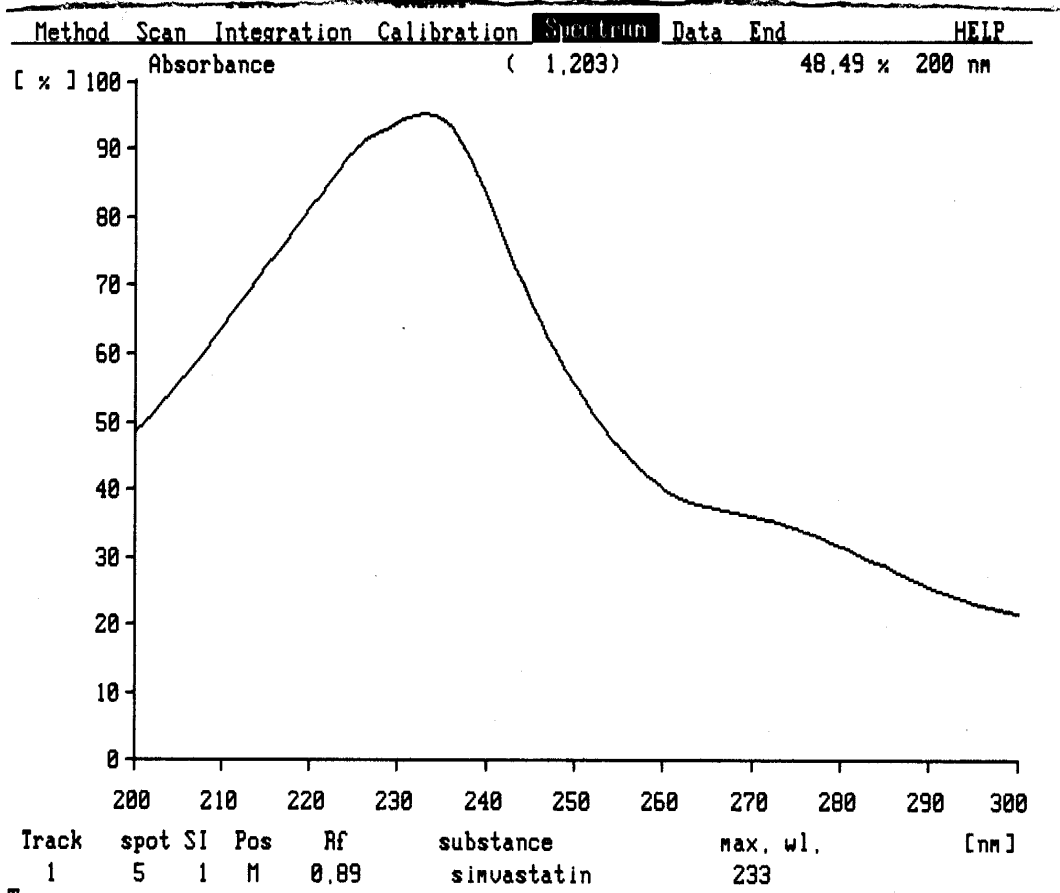
**FIGURA 1.** Cromatograma de HPTLC de la simvastatina y la fexofenadina (IS).

**FIGURE 1.** Typical HPTLC chromatogram of Simvastatin and Fexofenadine (IS).



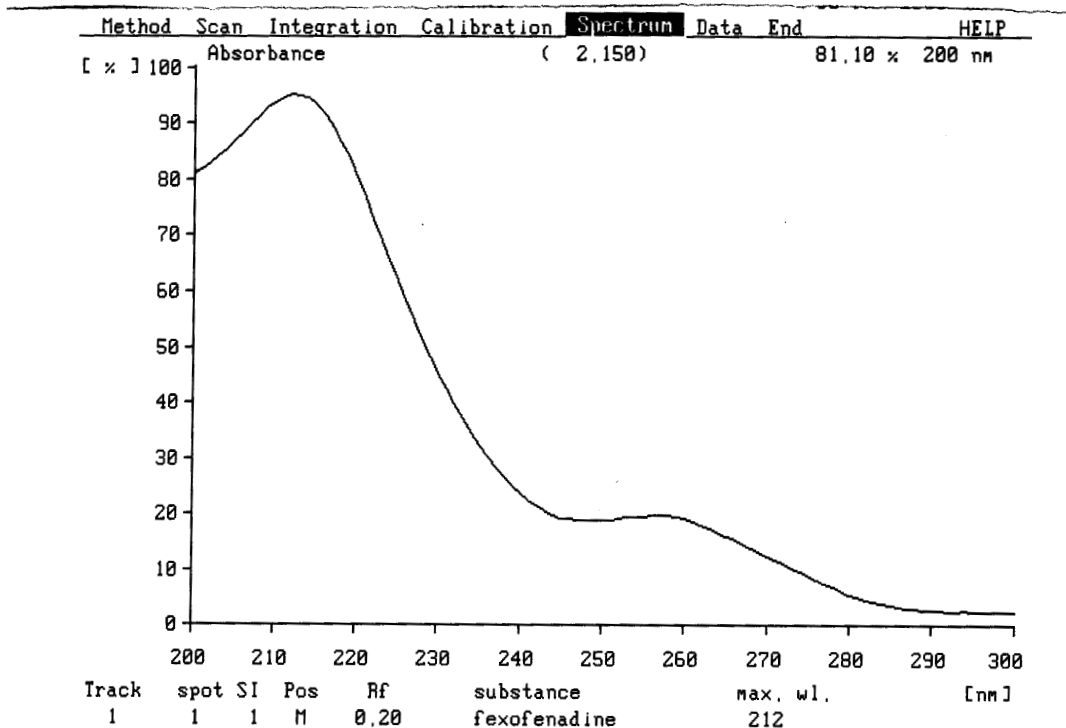
**FIGURA 2.** Espectro de absorción de UV típico de la simvastatina mediante el uso de HPTLC.

**FIGURE 2.** Typical UV Absorption spectra of Simvastatin by using HPTLC.



**FIGURA 3.** Espectro de absorción de UV típico de la fexofenadina (IS) mediante el uso de HPTLC.

**FIGURE 3.** Typical UV Absorption spectra of Fexofenadine (IS) by using HPTLC.



**TABLA 1.** Linealidad y rango de la simvastatina.**TABLE 1.** Linearity and range of Simvastatin

Concentración (ng $\mu\text{L}^{-1}$ ) Concentration	Área pico Peak Area
80	300.4
100	334.3
200	521.2
400	984.4
800	1721.2

### *Idoneidad del sistema*

Las pruebas de idoneidad del sistema son parte integral de un análisis de cromatografía y se deben utilizar para verificar que la resolución y reproducibilidad del sistema cromatográfico son las adecuadas para el análisis. Para determinar la efectividad del método desarrollado en este estudio se realizaron pruebas de idoneidad del sistema en una solución de simvastatina de almacén estándar recién preparada.

#### 3.2.1 Linealidad y límites de cuantificación y detección

Los trazados de calibración de área pico frente a concentración fueron lineales en el rango de 0,08 – 0,8  $\mu\text{g}$  de la simvastatina, y los valores de interceptación no fueron significativamente distintos de cero. Las líneas de calibrado calibración se representaron mediante la ecuación lineal  $Y_{\text{sim}} = 142,2X + 1,99$ ; en esta ecuación, el coeficiente de correlación lineal  $r$  fue 0,99.

El límite de cuantificación (LDC) y el límite de detección (LDD) se calcularon mediante las ecuaciones  $LDD = 3 \times N/B$  y  $LDC = 10 \times N/B$ , donde  $N$  es la desviación estándar de las áreas pico de los fármacos ( $n = 3$ ), tomada como medida del ruido, y  $B$  es la pendiente de la curva de calibración correspondiente. El límite de cuantificación fue 0,20  $\mu\text{g}$  y el límite de detección 0,04  $\mu\text{g}$ .

#### 3.2.2 Exactitud y precisión

La exactitud y precisión del método se estudiaron realizando experimentos mediante la técnica de adición estándar. A la muestra analizada anteriormente se añadieron tres niveles distintos de los estándares (sección 3.1.1), cada uno de los cuales se repitió tres veces. La cantidad de fármaco (en mg) detectada mediante el método (eje  $y$ ) se determinó en función de la cantidad de

### *System suitability*

System suitability tests are an integral part of a chromatographic analysis and should be used to verify that the resolution and reproducibility of the chromatographic system are adequate for the analysis. To ascertain the effectiveness of the method developed in this study system suitability tests were performed on freshly prepared standard stock solution of Simvastatin.

#### 3.2.1 Linearity and Limits of Quantification and Detection

Calibration plots of peak area against concentration were linear in the range 0.08 – 0.8  $\mu\text{g}$  for Simvastatin and the intercept values were not significantly different from zero. The calibration lines were represented by the linear equation  $Y_{\text{sim}} = 142.2X + 1.99$ ; for this equation the correlation coefficient,  $r$ , was 0.99.

The limit of quantification (LOQ) and limit of detection (LOD) were calculated by use of the equations  $LOD = 3 \times N/B$  and  $LOQ = 10 \times N/B$  Where  $N$  is the standard deviation of the peak areas of the drugs ( $n = 3$ ), taken as a measure of the noise, and  $B$  is the slope of the corresponding calibration curve. The limit of quantification was 0.20  $\mu\text{g}$  and the limit of detection was 0.04  $\mu\text{g}$ .

#### 3.2.2 Accuracy and Precision

The accuracy and precision of the method were studied by performing experiments by the standard addition technique. Three different levels of the standards were added to a previously analyzed sample (Section 3.1.1), each level being repeated thrice. The amount (mg) of drug found by the method ( $y$  axis) was plotted against the amount of the standard drug added ( $x$  axis). The intercept on the  $y$  axis indicates the amount of the drug (mg) present per tablet. The percentage

fármaco estándar añadida (eje x). La intersección en el eje y indica la cantidad de fármaco (en mg) presente en cada comprimido. El porcentaje de recuperación se calculó a partir de la cantidad de fármaco detectada mediante la siguiente fórmula:

$$\% \text{ de recuperación} = [n (\Sigma XY) - (\Sigma X) (\Sigma Y)] / [n (\Sigma X^2) - (\Sigma X)^2] \times 100$$

donde X es la cantidad de fármaco estándar añadida, Y la cantidad de fármaco detectada mediante el método propuesto y n es el número de observaciones.

La recuperación de simvastatina obtenida fue del 100,7%, como se muestra en la **Tabla 2**. Esto indica que los excipientes de los comprimidos no interfirieron.

### 3.2.3 Resistencia y robustez

La resistencia es una medida de la reproducibilidad del resultado de una prueba en las condiciones normales esperadas con distintos instrumentos y analistas. Los resultados de las pruebas de resistencia se indican en la **Tabla 3**. La robustez es una medida de la capacidad de un método para no verse afectado por variaciones pequeñas pero deliberadas en las condiciones del método, y es indicativa de la fiabilidad del mismo. Los resultados de los estudios de robustez se muestran en la **Tabla 4**.

recovery was calculated from the amount of the drug found by use of the formula:

$$\% \text{ Recovery} = [n (\Sigma XY) - (\Sigma X) (\Sigma Y)] / [n (\Sigma X^2) - (\Sigma X)^2] \times 100$$

Where X is the amount of standard drug added, Y the amount of drug found by the proposed method, and n is the number of observations.

The recovery obtained for Simvastatin was 100.7%, as is shown in **Table 2**. This shows that there is no interference from the excipients in the tablets.

### 3.2.3 Ruggedness and Robustness

Ruggedness is a measure of the reproducibility of a test result under normal, expected operating conditions from instrument to instrument and from analyst to analyst. The results of ruggedness testing are reported in **Table 3**. Robustness is a measure of the capacity of a method to remain unaffected by small but deliberate variations in method conditions, and is an indication of the reliability of the method. Typical results from robustness studies are shown in **Table 4**.

**TABLA 2.** Resultados del ensayo de HPTLC de la simvastatina.

**TABLE 2.** Results from HPTLC assay of Simvastatin

Marca Brand	Componente Component	Indicado (mg) Label claim	Detectado por el método propuesto (mg) Amount found by proposed method	RSD[%](n=3)
Marca I Brand I	simvastatina sinvastatin	5	4.95	0.44
Marca II Brand II	simvastatina sinvastatin	10	9.89	0.72
Marca III Brand III	simvastatina sinvastatin	20	20.2	0.60

**TABLA 3.** Resultados del análisis de recuperación.**TABLE 3.** Results from recovery analysis

Marca Brand	Componente Component	Cantidad añadida Amount added	Cantidad recuperada Amount recovered
		0	4.95
Marca I	simvastatina	1	6.14
Brand I	simvastatin	2	7.08
		3	8.20
Recuperación media = 101,4% (n=3)			
Mean recovery = 101.4% (n=3)			
		0	9.89
Marca II	simvastatina	1	11.15
Brand II	simvastatin	2	12.08
		3	13.16
Recuperación media = 100,8% (n=3)			
Mean recovery = 100.8% (n=3)			
		0	20.20
Marca III	simvastatina	1	21.10
Brand III	simvastatin	2	22.32
		3	23.04
Recuperación media = 99,9% (n=3)			
Mean recovery = 99.9% (n=3)			
Promedio de la media de recuperación = 100,7 %			
Average mean recovery = 100.7 %			

**Tabla 4.** Resultados de los estudios de resistencia.**TABLE 4.** Results from ruggedness studies.

	Marca I Simvastatina <sup>a)</sup>	Marca II Simvastatina	Marca III Simvastatina
	Brand I Simvastatin <sup>a)</sup>	Brand II Simvastatin	Brand III Simvastatin
Analista 1 Analyst 1	101.4	100.8	99.9
Analista 2 Analyst 2	101.1	101.6	100.4

<sup>a)</sup> Todos los valores indican recuperaciones porcentuales.

<sup>a)</sup> All values are percentage recoveries.



**TABLA 5.** Resultados de los estudios de robustez.**TABLE 5.** Results from robustness studies.

Distancia de desarrollo Development distance [cm]	Ensayo de simvastatina [%] Simvastatin assay [%]		
	Marca I Brand I [5 mg]	Marca II Brand II [10 mg]	Marca III Brand III [20 mg]
7.0	98.5	99.0	100.8
7.5	99.2	99.6	101.9
8.0	100.4	100.6	102.2

### CONCLUSIÓN

El método de HPTLC propuesto para la determinación de la simvastatina en formas de dosificación sólidas es exacta, precisa, rápida y selectiva. Por tanto, se puede adoptar fácilmente y con comodidad para la realización de análisis de control de calidad rutinarios.

### CONCLUSION

The HPTLC method proposed for the determination of Simvastatin in solid dosage forms is accurate, precise, rapid, and selective. It can, therefore, be easily and conveniently adopted for routine quality control analysis.

### AGRADECIMIENTOS

Los autores desean expresar su agradecimiento a los profesores T. Subburaju y K.Elango, CADRAT, Ooty y Sri Shivarathree Desikendra Mahaswamigalavaru de Suttur mutt por proporcionar los medios para realizar la HPTLC.

### ACKNOWLEDGEMENT

The authors are grateful to Professors T. Subburaju and K.Elango, CADRAT, Ooty and Sri Shivarathree Desikendra Mahaswamigalavaru of Suttur mutt for providing HPTLC facilities.

### BIBLIOGRAFÍA/BIBLIOGRAPHY

1. The United States Pharmacopeia The national formulary. Asian ed. Rockville MD 1999. p.1521.
2. Takano T, Abe S, Hata S. Selected ion monitoring method for quantifying simvastatin and its acid form in human plasma using the ferrocenylboronate derivative. *Biomed Environ Mass Spectrom* 1990 Sep; (19) 9: 577-581.
3. Morris MJ, Gilbert JD, Hsich JYK, Matuszewski BK, Ramjit HG, Bayne WF. Determination of the HMG-CoA reductase inhibitors simvastatin, lovastatin and pravastatin in plasma by gas chromatography - chemical-ionization mass spectrometry. *Biol Mass Spectrom* 1993 Jan; (22) 1: 1-8.
4. Cai KH, Zheng WH, Zhou Y, Lin GY, Zhao XL. Analysis method and pharmacokinetic studies of simvastatin in plasma. *Fenxi Huaxue* 1999 Nov 20; (27) 11:1254 -1257.
5. Carlucci G, Mazzeo P, Biordi L, Bologna M. Simultaneous determination of simvastatin and its hydroxy acid form in human plasma by high-performance liquid chromatography with UV detection. *J Pharm Biomed Anal* 1992 Sep; (10) 9: 693-697.
6. Ochiai H, Uchiyama N, Imagaki K, Hata S, Kamei T. Determination of simvastatin and its active metabolite in human plasma by column-switching high-performance liquid chromatography with fluorescence detection after derivatization with 1-bromoacetylpyrene. *J Chromatogr Biomed Appl* 1997 June 20; 694(1): 211- 217.
7. Tan L, Yang LL, Zhang X, Yuan YS, Ling SS. Determination of simvastatin in human plasma by high-performance liquid chromatography. *Sepu* 2000 May; (18) 3: 232 -234.
8. Jemal M, Ouyang Z, Powell ML. Direct-injection LC-MS-MS method for high-throughput simultaneous quantitation of simvastatin and simvastatin acid in human plasma. *J Pharm Biomed Anal* 2000 Aug 15; (23) 2-3: 323 - 340.
9. Zhao JJ, Xie IH, Yang AY, Road cap BA, Rogers JD. Quantitation of simvastatin and its - hydroxy-acid in human plasma by liquid-liquid cartridge extraction and liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *J Mass Spectrometry* 2000 Sep; (35) 9:1133 - 1143.