

การพัฒนาวิธีวิเคราะห์ยาซิมวาสตาตินและซิมวาสตาตินอัยดรอกซีแอซิด  
ในพลาสมาด้วยวิธีเอชพีแอลซีและการนำมาประยุกต์  
ในการศึกษาชีวสมมูลในสุนัข

นางสาวศุภางค์ คนดี

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาเภสัชศาสตรมหาบัณฑิต  
สาขาวิชาเภสัชกรรม ภาควิชาเภสัชกรรม  
บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย  
ปีการศึกษา 2541  
ISBN 974-639-595-5  
ลิขสิทธิ์ของ บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

**DEVELOPMENT OF HPLC METHOD FOR ANALYSIS OF  
PLASMA SIMVASTATIN AND SIMVASTATIN HYDROXY ACID  
AND APPLICATION TO BIOEQUIVALENCE STUDIES IN DOGS**

**MISS SUPANG KONDEE**

**A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements  
for the Degree of Master of Science in Pharmacy**

**Department of Pharmacy**

**Graduate School**

**Chulalongkorn University**

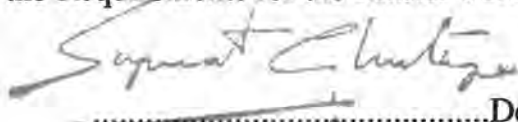
**Academic year 1998**

**ISBN 974-639-595-5**

Thesis Title      Development of HPLC method for analysis of plasma  
simvastatin and simvastatin hydroxy acid and application to  
bioequivalence studies in dogs  
By                      Miss Supang Kondee  
Department        Pharmacy  
Thesis Advisor    Associate Professor Parkpoom Tengannaui, Ph. D.

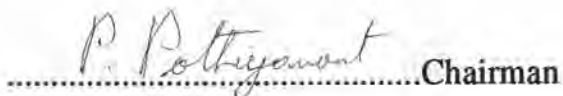
---

Accepted by the Graduate School, Chulalongkorn University in Partial  
Fulfillment of the Requirements for the Master's Degree.

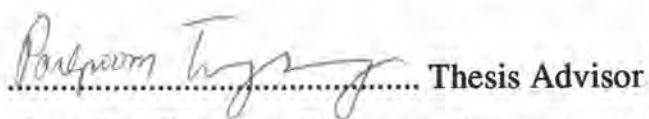


.....Dean of Graduate School  
(Professor Supawat Chutivongse, M. D.)


Thesis Committee



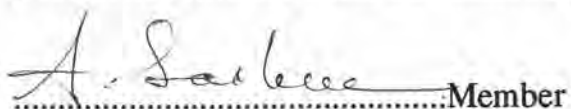
.....Chairman  
(Associate Professor Pranom Pothiyant, M. Sc.)



.....Thesis Advisor  
(Associate Professor Parkpoom Tengannaui, Ph. D.)



.....Member  
(Associate Professor Uthai Suvanakoot, Ph. D.)



.....Member  
(Associate Professor Achariya Sailasuta, Ph. D.)

ศุภางค์ คนดี : การพัฒนาวิธีวิเคราะห์ยาซิมวาสตาตินและซิมวาสตาตินไฮดรอกซีแอซิดในพลาสมาด้วยวิธีเอชพีแอลซีและการนำมาประยุกต์ในการศึกษาชีวสมมูลในสุนัข (DEVELOPMENT OF HPLC METHOD FOR ANALYSIS OF SIMVASTATIN AND SIMVASTATIN HYDROXY ACID AND APPLICATION TO BIOEQUIVALENCE STUDIES IN DOGS) อ. ที่ปรึกษา : รศ. ดร. ภาคภูมิ เต็งอำนวย, 137 หน้า. ISBN 974-639-595-5.

การประเมินผลยาเม็ดซิมวาสตาตินชนิดเคลือบฟิล์ม ขนาด 10 มิลลิกรัม จำนวน 4 ผลิตภัณฑ์ ผลการศึกษาในหลอดทดลองพบว่าเปอร์เซ็นต์ของยาที่ระบุตามฉลาก และความสม่ำเสมอของผลิตภัณฑ์ของยาเม็ดทุกผลิตภัณฑ์ ได้มาตรฐานตามที่กำหนดในเภสัชตำรับสหรัฐอเมริกา อัตราเร็วคงที่ของการละลายจากยาเม็ดทั้ง 4 ผลิตภัณฑ์ในสารละลาย 0.05 เปอร์เซ็นต์โซเดียมลอริลซัลเฟตในฟอสเฟตบัฟเฟอร์พีเอช 5.5 มีค่าตั้งแต่ 0.062 ถึง 0.273 ต่อนาที ค่าอัตราเร็วคงที่ของการละลายจากยาเม็ดของผลิตภัณฑ์ C มีค่าต่ำกว่าค่าเดียวกันของผลิตภัณฑ์ A, B และ D อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p < 0.05$ ) การเปรียบเทียบชีวประโยชน์ของยาเม็ดซิมวาสตาตินทั้ง 4 ผลิตภัณฑ์ กระทำในสุนัขพันธุ์ทางเพศผู้สุขภาพดี จำนวน 12 ตัว โดยใช้แบบแผนการทดลองข้าม สุนัขได้รับยาเม็ดซิมวาสตาตินในขนาด 200 มิลลิกรัมครั้งเดียว วัฏระดับยาในพลาสมาโดยวิธีเอชพีแอลซี แล้วนำข้อมูลมาวิเคราะห์เพื่อหาพารามิเตอร์ทางเภสัชจลนศาสตร์ที่เกี่ยวข้อง ผลการวิเคราะห์ข้อมูลพบว่า ค่าพื้นที่ใต้เส้นโค้งระหว่างความเข้มข้นของยาในพลาสมา กับเวลาและเวลาที่ความเข้มข้นของยาสูงสุดในพลาสมาของยาทั้ง 4 ผลิตภัณฑ์ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ อัตราส่วนของค่าพื้นที่ใต้เส้นโค้งระหว่างความเข้มข้นของยาในพลาสมา กับเวลาของยาเม็ดผลิตภัณฑ์ B, C และ D เทียบกับยาเม็ดผลิตภัณฑ์ A อยู่ภายในช่วง 80-125 เปอร์เซ็นต์ของช่วงระยะความเชื่อมั่นที่ 90 เปอร์เซ็นต์ แม้ค่าความเข้มข้นของยาสูงสุดในพลาสมาของยาทั้ง 4 ผลิตภัณฑ์ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ แต่อัตราส่วนของค่าความเข้มข้นของยาสูงสุดในพลาสมาของยาเม็ดผลิตภัณฑ์ B, C และ D เทียบกับยาเม็ดผลิตภัณฑ์ A ไม่อยู่ภายในช่วง 80-125 เปอร์เซ็นต์ของช่วงระยะความเชื่อมั่นที่ 90 เปอร์เซ็นต์ จะเห็นได้ว่ายาเม็ดซิมวาสตาตินของทั้ง 4 ผลิตภัณฑ์มีความสมมูลกันเมื่อดูจากปริมาณยาทั้งหมดที่ดูดซึมเข้าสู่ร่างกาย ค่าอัตราเร็วคงที่ของการขับถ่ายยามีค่าระหว่าง 1.05 ถึง 1.92 ต่อชั่วโมงขณะที่ค่าครึ่งชีวิตของยาวัดอยู่ในช่วง 0.47 ถึง 1.66 ชั่วโมง แม้ทั้ง 4 ผลิตภัณฑ์จะสามารถลดระดับโคเลสเตอรอลหลังจากให้ยา 2 ชั่วโมงเมื่อเทียบกับค่าเริ่มต้นก่อนได้รับยา แต่การลดของระดับโคเลสเตอรอลดังกล่าวไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ การศึกษาความสัมพันธ์เชิงเส้นตรงระหว่างข้อมูลในหลอดทดลองและข้อมูลในร่างกายพบว่า เปอร์เซ็นต์ยาที่ละลายออกมาที่เวลา 15 และ 30 นาทีและอัตราเร็วคงที่ของการละลายจากยาเม็ดไม่มีความสัมพันธ์กับค่าความเข้มข้นของยาสูงสุดในพลาสมา เวลาที่ความเข้มข้นของยาสูงสุดในพลาสมาของยาและค่าพื้นที่ใต้เส้นโค้งระหว่างความเข้มข้นของยาในพลาสมา กับเวลา ซึ่งหมายความว่าไม่สามารถใช้ข้อมูลในหลอดทดลองที่พัฒนาได้นี้มาคาดคะเนชีวประโยชน์ของยาเม็ดซิมวาสตาตินชนิดเคลือบฟิล์มได้

ภาควิชา ..... เกษตรกรรม  
สาขาวิชา ..... เกษตรกรรม  
ปีการศึกษา ..... 2541

ลายมือชื่อนิสิต ..... *Ahem and*  
ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา ..... *P. T...*  
ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม .....

## C875170 : MAJOR PHARMACY

KEY WORD: ; SIMVASTATIN / BIOAVAILABILITY

SUPANG KONDEE : DEVELOPMENT OF HPLC METHOD FOR ANALYSIS OF SIMVASTATIN AND SIMVASTATIN HYDROXY ACID AND APPLICATION TO BIOEQUIVALENCE STUDIES IN DOGS.  
 THESIS ADVISOR : ASSOC. PROF. PARKPOOM TENGAMNUAY, Ph.D. 137 pp. ISBN 974-639-595-5.

Four brands of 10-mg simvastatin film-coated tablets were evaluated. *In vitro* studies indicated that all brands met the general requirements of the USP 23 for content of active ingredient and uniformity of dosage units. The dissolution rate constants of all brands in 0.5 % sodium lauryl sulphate in 0.01 M monobasic sodium phosphate pH 5.5 ranged from 0.062 to 0.273 min<sup>-1</sup>. The value of brand C was significantly (p<0.05) lower than those of brands A (innovator's product), B and D. The comparative bioavailabilities of brands B, C, and D relative to brand A were conducted in 12 healthy male mongrel dogs using a single dose of 200 mg simvastatin in a crossover design. Individual plasma drug concentration-time profiles of total simvastatin hydroxy acid (SVA) were analyzed by HPLC for relevant pharmacokinetics parameters. There were no statistically significant differences in AUC (ANOVA, p>0.05) and t<sub>max</sub> (Friedman test, p>0.05) values of brand B, C, and D with those of brand A. The 90% exact confidence intervals for the AUC ratios of brand B, C, and D to those of brand A were within 80-125% bioequivalence range. Although, there were no significant differences (ANOVA, p>0.05) in C<sub>max</sub> of brand B, C, and D with those of brand A. The 90% exact confidence intervals for ratios of C<sub>max</sub> of brand B, C, and D relative to those of brand A were out of 80-125% range. This implies that brands B, C, and D were considered to be equivalent to brand A with respect to the extent of drug absorption. The elimination rate constants (K<sub>el</sub>) of total SVA were between 1.05 and 1.92 hr<sup>-1</sup> whereas the elimination half-lives (t<sub>1/2</sub>) ranged from 0.47 to 1.66 hr. These values are in agreement with the previously reported half-life for total SVA of 1.9 hr. Although, all the four brands were capable of reducing blood cholesterol within 2 hr after administration, however, the values were not significantly different from the initial values. Correlative studies between the *in vitro* and *in vivo* data of all four brands indicates that there were no significant correlations between the two data (%Q<sub>15</sub>, %Q<sub>30</sub>, dissolution rate constants of drug versus C<sub>max</sub>, t<sub>max</sub> and AUC values). This means that the *in vitro* data obtained under the present testing conditions could not be used to predict the bioavailability of simvastatin film-coated tablets.

ภาควิชา.....เภสัชกรรม.....

สาขาวิชา.....เภสัชกรรม.....

ปีการศึกษา.....2541.....

ลายมือชื่อนิสิต.....S. Kondee.....

ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา.....P. Tengamnuay.....

ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม.....

## ACKNOWLEDGEMENTS

I would like to express my deepest gratitude and infinite thanks to my advisor, Associate Professor Parkpoom Tengamnuay, for his invaluable advice, continual guidance, and encouraging my work during the entire course of this study. I am also very grateful to Associate Professor Achariya Sailasuta for her kindness, helpful advice, and technical support in the animal experiments.

Special thanks are also given to Miss Phoemchit Siripipat, Head of the Drug Analysis section at Regional Medical Science Centre, Chiangrai, who provided me a chance to continue my study in Master Degree. I am greatly indebted to the Graduate School, Chulalongkorn University for granting partial financial support to fulfill this study. Special acknowledgements are also given to all staff members in the Department of Pharmacy, and the Animal Hospital, the Faculty of Veterinary Science, for their kind assistance throughout this study. My thankfulness is also extend to Dr. Pisit Sirisattayawong, Dr. Kachen Wongsathapornchai, Dr. Pongsakorn Chuammitri, and Miss Somporn Techangamsuwan, for their helpfulness and kindness throughout the dog experiments. I would like to express my thanks to those whose name have not been mentioned but their assistance and encouragement firmly deserve acknowledgments.

Finally, I wish to express my appreciation and special thanks to my lovely friends for their love, cheerfulness, and encouragement. Greatest thanks and love go to my family for their kindness, love, and continued support throughout these past years.



## CONTENTS

	<b>page</b>
THAI ABSTRACT.....	iv
ENGLISH ABSTRACT.....	v
ACKNOWLEDGEMENTS.....	vi
CONTENTS.....	vii
LIST OF TABLES.....	viii
LIST OF FIGURES.....	xii
LIST OF ABBREVIATIONS.....	xv
<b>CHAPTER</b>	
I. INTRODUCTION.....	1
II. REVIEW OF LITERATURE.....	5
III. MATERIALS AND METHODS.....	30
IV. RESULTS AND DISCUSSION.....	43
V. CONCLUSIONS.....	98
REFERENCES.....	101
APPENDICES.....	113
VITA.....	137

## LIST OF TABLES

Table		page
1	Characteristics of lipoprotein in human plasma.....	7
2	Classification of primary hyperlipoproteinaemias.....	10
3	Solubilities of simvastatin.....	13
4	Schedule of Repeated Latin Square Design for the <i>in vivo</i> Bioequivalence study.....	37
5	Percentage labeled amount from four brands of simvastatin tablets.....	43
6	Uniformity of dosage units from four brands of simvastatin tablets.....	44
7	Mean percent dissolved of simvastatin in dissolution medium at each sampling time.....	46
8	Dissolution rate constants ( $K_d$ ) of four brands of simvastatin in dissolution medium.....	47
9	Statistical differences of dissolution rate constants of simvastatin tablet assessed by one-way ANOVA and Dunnett's test.....	48
10	Within-run results of the simvastatin hydroxy acid HPLC assay.....	54
11	Between-run results of the simvastatin hydroxy acid HPLC assay.....	54
12	Relative physical recoveries of the simvastatin hydroxy acid HPLC assay.....	55



<b>Table (cont.)</b>		<b>page</b>
13	% Coefficient of variation results simvastatin hydroxy acid HPLC assay at LOQ concentration.....	55
14	Individual plasma concentration of simvastatin, analyzed as total simvastatin hydroxy acid, in 12 dogs after taking a 200 mg of oral dose of simvastatin tablets (brand A).....	58
15	Individual plasma concentration of simvastatin, analyzed as total simvastatin hydroxy acid, in 12 dogs after taking a 200 mg of oral dose of simvastatin tablets (brand B).....	59
16	Individual plasma concentration of simvastatin, analyzed as total simvastatin hydroxy acid, in 12 dogs after taking a 200 mg of oral dose of simvastatin tablets (brand C).....	60
17	Individual plasma concentration of simvastatin, analyzed as total simvastatin hydroxy acid, in 12 dogs after taking a 200 mg of oral dose of simvastatin tablets (brand D).....	61
18	Mean plasma simvastatin, analyzed as total simvastatin hydroxy acid, in 12 dogs after taking a 200 mg of different brands of simvastatin tablets .....	62
19	Statistical results from Bartlett's test of the pharmacokinetic parameters.....	78
20	The area under plasma concentration-time curves (AUC) of total simvastatin hydroxy acid after taking four different brands simvastatin tablets .....	79
21	The peak plasma concentration ( $C_{max}$ ) of total simvastatin hydroxy acid after taking four different brands simvastatin tablets .....	80

<b>Table (cont.)</b>	<b>page</b>
22 The time to peak plasma concentration ( $t_{max}$ ) of total simvastatin hydroxy acid after taking four different brands simvastatin tablets.....	81
23 Log AUC values of total simvastatin hydroxy acid after taking four different brands simvastatin tablets.....	83
24 Log $C_{max}$ values of total simvastatin hydroxy acid after taking four different brands simvastatin tablets.....	84
25 Statistical comparison of log AUC for four brands of simvastatin tablets assessed by randomized block ANOVA, Dunnett's test, and 90 % confidence intervals.....	85
26 Statistical comparison of log $C_{max}$ for four brands of simvastatin tablets assessed by randomized block ANOVA, Dunnett's test, and 90 % confidence intervals.....	86
27 Statistical comparison of $t_{max}$ for four brands of simvastatin tablets assessed by Friedman test.....	87
28 Elimination rate constants ( $K_{el}$ ) of total simvastatin hydroxy acid after taking four different brands simvastatin tablets.....	92
29 Plasma elimination half-life ( $t_{1/2}$ ) of total simvastatin hydroxy acid after taking four different brands simvastatin tablets.....	93
30 The difference in total cholesterol level at 2 hr after 200 mg single oral dose of four brands of simvastatin tablets.....	95
31 Statistical comparison of percent change in TC at 2 hr relative to time zero for four brands of SV tablets as assessed by paired t-test.....	96

<b>Table (cont.)</b>		<b>page</b>
32	<i>In vitro</i> - <i>in vivo</i> correlations.....	97
33	Test products.....	114
34	Standard curve of simvastatin in 45% acetonitrile in water.....	116
35	Standard curve of simvastatin in dissolution medium.....	118
36	Standard curve of simvastatin hydroxy acid in dog plasma.....	120
37	Animal demographic data.....	123
38	Exemplified data for dissolution rate constants ( $K_d$ ) determination according to sigma-minus method.....	135
39	The difference in total cholesterol level at 2 hr after 200 mg single oral dose of four brands of simvastatin tablets (raw data).....	136

## LIST OF FIGURES

Figure		page
1	Structures of lactone and hydroxy acid form of simvastatin....	1
2	Lipoprotein metabolism.....	8
3	Schematic representation of multivalent feedback regulation of HMG-CoA reductase.....	16
4	Biotransformation profile for simvastatin.....	29
5	The major veins of the forelimb and the hindlimb of the dogs	38
6	Dissolution profiles of four brands of simvastatin tablets in dissolution medium.....	45
7a	High performance liquid chromatographic chromatograms of simvastatin hydroxy acid and the internal standard in dog plasma .....	52
7b	High performance liquid chromatographic chromatograms of simvastatin and simvastatin hydroxy acid in dog plasma .....	53
8	Plasma concentration time-profiles of simvastatin, analyzed as total simvastatin hydroxy acid, of dog No.1 after taking 200 mg of different brands of simvastatin tablets.....	63
9	Plasma concentration time-profiles of simvastatin, analyzed as total simvastatin hydroxy acid, of dog No.2 after taking 200 mg of different brands of simvastatin tablets.....	64
10	Plasma concentration time-profiles of simvastatin, analyzed as total simvastatin hydroxy acid, of dog No.3 after taking 200 mg of different brands of simvastatin tablets.....	65

<b>Figure (cont.)</b>	<b>page</b>
11 Plasma concentration time-profiles of simvastatin, analyzed as total simvastatin hydroxy acid, of dog No.4 after taking 200 mg of different brands of simvastatin tablets.....	66
12 Plasma concentration time-profiles of simvastatin, analyzed as total simvastatin hydroxy acid, of dog No.5 after taking 200 mg of different brands of simvastatin tablets.....	67
13 Plasma concentration time-profiles of simvastatin, analyzed as total simvastatin hydroxy acid, of dog No.6 after taking 200 mg of different brands of simvastatin tablets.....	68
14 Plasma concentration time-profiles of simvastatin, analyzed as total simvastatin hydroxy acid, of dog No.7 after taking 200 mg of different brands of simvastatin tablets.....	69
15 Plasma concentration time-profiles of simvastatin, analyzed as total simvastatin hydroxy acid, of dog No.8 after taking 200 mg of different brands of simvastatin tablets.....	70
16 Plasma concentration time-profiles of simvastatin, analyzed as total simvastatin hydroxy acid, of dog No.9 after taking 200 mg of different brands of simvastatin tablets.....	71
17 Plasma concentration time-profiles of simvastatin, analyzed as total simvastatin hydroxy acid, of dog No.10 after taking 200 mg of different brands of simvastatin tablets.....	72
18 Plasma concentration time-profiles of simvastatin, analyzed as total simvastatin hydroxy acid, of dog No.11 after taking 200 mg of different brands of simvastatin tablets.....	73
19 Plasma concentration time-profiles of simvastatin, analyzed as total simvastatin hydroxy acid, of dog No.12 after taking 200 mg of different brands of simvastatin tablets.....	74

<b>Figure (cont.)</b>	<b>page</b>
20 Comparison of mean plasma simvastatin time-profiles, analyzed as total simvastatin hydroxy acid, from 12 dogs after taking 200 mg of different brands of simvastatin tablets.	75
21 Standard curve of simvastatin in 45% acetonitrile in water.....	117
22 Standard curve of simvastatin in dissolution medium.....	119
23 Standard curve of total simvastatin hydroxy acid in dog plasma.....	121



**LIST OF ABBREVIATIONS**

ANOVA	=	analysis of variance
AUC	=	area under the plasma concentration-time profile curve
°C	=	degree Celcius
$C_{\max}$	=	peak plasma concentration
conc	=	concentration
C.V.	=	coefficient of variation
d.f.	=	degree of freedom
EMS	=	error mean square
g	=	gram
hr	=	hour
$K_d$	=	dissolution rate constant
$K_e$	=	elimination rate constant
kg	=	kilogram
L	=	litre
M	=	molar
mg	=	milligram
min	=	minute
ml	=	millilitre
MS	=	mean square
N	=	normal
ng	=	nanogram
nm	=	nanometre
PAR	=	peak area ratio
rpm	=	revolutions per minute
r	=	correlation coefficiencie

**LIST OF ABBREVIATIONS (CONT.)**

$r^2$	=	coefficient of determination
S.D.	=	standard deviation
S.E.M.	=	standard error of the mean
SGPT	=	Serum glutamic pyruvic transaminase
SS	=	sum of square
$t_{1/2}$	=	terminal half life
$t_{max}$	=	time to peak plasma concentration
USP	=	United States Pharmacopoeia
US FDA	=	United States Food & Drug Administration
UV	=	ultraviolet
V/V	=	volume by volume
$\mu$ l	=	microlitre
$\mu$ g or mcg	=	microgram