

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA  
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS  
FARMACÊUTICAS**

**DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE  
METODOLOGIAS PARA AVALIAÇÃO DE EZETIMIBA  
POR CROMATOGRÁFIA LÍQUIDA E  
ESPECTROMETRIA DE MASSAS**

**DISSERTAÇÃO DE MESTRADO**

**Paulo Renato de Oliveira**

**Santa Maria, RS, Brasil**

**2007**

**DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE METODOLOGIAS  
PARA AVALIAÇÃO DE EZETIMIBA POR  
CROMATOGRAFIA LÍQUIDA E ESPECTROMETRIA DE  
MASSAS**

**por**

**Paulo Renato de Oliveira**

Dissertação apresentada ao Curso de Mestrado do Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Área de Concentração em Controle e Avaliação de Insumos e Produtos Farmacêuticos, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como requisito parcial para obtenção do grau de  
**Mestre em Ciências Farmacêuticas.**

**Orientador: Prof. Dr. Sérgio Luiz Dalmora**

**Santa Maria, RS, Brasil**

**2007**

**Universidade Federal de Santa Maria  
Centro de Ciências da Saúde  
Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas**

A Comissão Examinadora, abaixo assinada,  
aprova a Dissertação de Mestrado

**DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE METODOLOGIAS PARA  
AVALIAÇÃO DE EZETIMIBA POR CROMATOLOGRAFIA LÍQUIDA E  
ESPECTROMETRIA DE MASSAS**

elaborada por  
**Paulo Renato de Oliveira**

como requisito parcial para obtenção do grau de  
**Mestre em Ciências Farmacêuticas**

**COMISSÃO EXAMINADORA:**

**Sérgio Luiz Dalmora, Dr.**  
(Presidente/Orientador)

**Carlos Roberto Jorge Soares, Dr. (IPEN-USP)**

**Rui Oliveira Macedo, Dr. (UFPB)**

Santa Maria, 30 de março de 2007.

## **AGRADECIMENTOS**

---

Ao Prof. Dr. Sérgio Luiz Dalmora, pelo apoio, amizade, confiança, orientação e revisão crítica.

Aos colegas, bolsistas e técnicos dos Laboratórios de Bioequivalência e Controle da Qualidade de Produtos Biológicos, pelo auxílio e amizade.

Aos professores, colegas e funcionários do Departamento de Farmácia Industrial.

Aos meu pais, Valmorim e Clara, e minha irmã, Elenise, pelo apoio, incentivo, amor e educação.

À Larissa, pelo amor, carinho, atenção e compreensão, fundamentais para a conclusão de mais uma etapa.

À UFSM, que possibilitou a execução deste trabalho.

A todos que, mesmo não citados, contribuíram de alguma maneira para a conclusão deste trabalho.

## RESUMO

Dissertação de Mestrado  
Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas  
Universidade Federal de Santa Maria

### **DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE METODOLOGIAS PARA AVALIAÇÃO DE EZETIMIBA POR CROMATOLOGRAFIA LÍQUIDA E ESPECTROMETRIA DE MASSAS**

AUTOR: PAULO RENATO DE OLIVEIRA

ORIENTADOR: SÉRGIO LUIZ DALMORA

Data e Local da Defesa: Santa Maria, 30 de março de 2007.

Ezetimiba é um inibidor seletivo da absorção intestinal do colesterol e de fitosteróis, pertencente ao grupo das 2-ezetidinonas, indicado para o tratamento da hipercolesterolemia e fitosterolemia. No presente trabalho foram desenvolvidas e validadas metodologias para avaliação de ezetimiba em produtos farmacêuticos e plasma humano. As análises por cromatografia líquida em fase reversa (CL-FR) foram realizadas utilizando coluna Synergi fusion C<sub>18</sub> (150 mm x 4,6 mm), mantida a 45 °C. A fase móvel foi composta de tampão fosfato de potássio 0,03 M, pH 4,5/acetonitrila (35:65, V/V), eluída na vazão de 0,6 mL/min e detecção no ultravioleta a 234 nm. A separação cromatográfica foi obtida no tempo de 15 minutos, sendo linear na faixa de concentração de 0,5-200 µg/mL. O método foi aplicado para análise simultânea de ezetimiba e sinvastatina em produtos farmacêuticos comerciais. Paralelamente, desenvolveu-se e validou-se método por cromatografia líquida combinada à espectrometria de massas (CL-EM/EM). Executaram-se as análises utilizando coluna Luna C<sub>18</sub> (50 mm x 4,6 mm) e fase móvel composta de acetonitrila:água (85:15, V/V) na vazão de 0,4 mL/min. O espectrômetro de massas, equipado com fonte de electrospray positivo, foi empregado no modo de monitoramento de reação múltipla (MRM), monitorando as transições de 392,0>161,0 e 359,3>280,0, para a ezetimiba e etoricoxibe (padrão interno), respectivamente. A separação cromatográfica foi obtida em 2 minutos, sendo linear nas faixas de concentração de 0,25-20 ng/mL (ezetimiba) e 1-300 ng/mL (ezetimiba e seu metabólito). Os procedimentos foram validados, avaliando-se os parâmetros de especificidade, linearidade, precisão, exatidão, robustez, limite de detecção e quantificação, incluindo para o método bioanalítico os efeitos de matriz, recuperação e estudos de estabilidade, cujos resultados cumpriram os requisitos preconizados. O método proposto foi utilizado na análise de produtos farmacêuticos, demonstrando correlação significativa dos resultados (P>0,05). Além disso, o método de extração líquido-líquido desenvolvido e otimizado propiciou significativa

percentagem de recuperação da ezetimiba, seu metabólito e do padrão interno nas amostras de plasma. Os procedimentos pesquisados podem ser aplicados para estudos de biodisponibilidade e para aprimorar o controle da qualidade de medicamentos.

Palavras-chave: cromatografia líquida, espectrometria de massas, ezetimiba, validação, plasma humano, produtos farmacêuticos.

## **ABSTRACT**

Master's Degree Dissertation  
Postgraduate Program in Pharmaceutical Sciences  
Federal University of Santa Maria

### **DEVELOPMENT AND VALIDATION OF METHODOLOGIES FOR THE EVALUATION OF EZETIMIBE BY LIQUID CHROMATOGRAPHY AND MASS SPECTROMETRY**

AUTHOR: PAULO RENATO DE OLIVEIRA

ADVISER: SÉRGIO LUIZ DALMORA

Presentation date: Santa Maria, March 30<sup>th</sup> 2007.

Ezetimibe selectively inhibits the intestinal absorption of dietary cholesterol and related plant sterols, from the 2-azetidiones group, and is used for the treatment of hypercholesterolemia and phytosterolemia. The methodologies for the evaluation of ezetimibe in pharmaceutical products and plasma were developed and validated in the present work. The reversed-phase liquid chromatography (RP-LC) analysis was carried out using a Synergi fusion C<sub>18</sub> column (150 mm x 4.6 mm), maintained at 45 °C. The mobile phase consisted of potassium phosphate buffer 0.03 M, pH 4.5/acetonitrile (35:65, V/V), run at a flow rate of 0.6 mL/min with detection at 234 nm. The chromatographic separation was obtained within 15 min and it was linear in the concentration range of 0.5-200 µg/mL. The method was successfully applied for the simultaneous determination of ezetimibe and simvastatin in pharmaceutical products. The liquid chromatography-tandem mass spectrometry (LC-MS/MS) method was developed and validated using a Luna C<sub>18</sub> column (50 mm x 3.0 mm) and the mobile phase consisted of acetonitrile:water (85:15, V/V), run at a flow rate of 0.4 mL/min. The mass spectrometer, equipped with electrospray positive source, was used in multiple reaction monitoring mode (MRM), monitoring the transitions of 392.0>161.0 and 359.3>280.0, for ezetimibe and etoricoxib (internal standard), respectively. The chromatographic separation was obtained within 2 min and it was linear in the concentration range of 0.25-20 ng/mL (ezetimibe) and 1-300 ng/mL (ezetimibe and its glucuronide metabolite). The procedures were validated evaluating parameters such as the specificity, linearity, precision, accuracy, robustness, limit of detection and limit of quantitation. Besides, for the bioanalytical method, the matrix effects, recovery and stability studies were also analyzed, giving results within the acceptable range. The proposed method was applied for the analysis of pharmaceutical products, showing significant correlation ( $P > 0.05$ ) of the results. Moreover, the liquid-liquid extraction method developed and optimized allowed high mean

recoveries of ezetimibe and internal standard from the plasma samples. The procedures can be applied for the bioavailability studies and for the quality control of pharmaceutical products.

Keywords: liquid chromatography, mass spectrometry, ezetimibe, validation, human plasma, pharmaceutical products.



## LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 – Estrutura química da ezetimiba ..... 19

FIGURA 2 – Mecanismos de metabolização da ezetimiba – Adaptado de Kosoglou et al., 2005 ..... 25

### **PUBLICAÇÃO CIENTÍFICA 3.1**

FIGURE 1 – Chemical structures of ezetimibe (I) and simvastatin (II) ..... 48

FIGURE 2 – Representative LC chromatogram of ezetimibe (1) and simvastatin (2) pharmaceutical formulation (50 µg/mL) ..... 49

FIGURE 3 – LC chromatograms of ezetimibe. (A) Ezetimibe pharmaceutical formulation (50 µg/mL): peak 1 – ezetimibe. (B) After oxidation: peak 1 – hydrogen peroxide, peak 2 – ezetimibe. (C) After basic hydrolysis: peaks 1 and 3 – degraded forms, peak 2 – ezetimibe. (D) After acidic hydrolysis: peaks 1, 2, 3, 5 and 6 – degraded forms, peak 4 – ezetimibe.. 50

FIGURE 4 – LC chromatograms of simvastatin. (A) Simvastatin pharmaceutical formulation (50 µg/mL): peak 1 – simvastatin. (B) After oxidation: peak 1 – hydrogen peroxide, peak 2 – simvastatin. (C) After basic hydrolysis: peak 1 – degraded form. (D) After acidic hydrolysis: peak 1 – degraded form, peak 2 – simvastatin ..... 51

### **PUBLICAÇÃO CIENTÍFICA 3.2**

FIGURE 1 – Representative LC-MS-MS chromatogram of low QC plasma sample containing ezetimibe (5 ng mL<sup>-1</sup>) and IS (20 ng mL<sup>-1</sup>) ..... 62

FIGURE 2 – Mean plasma concentrations after a single 10 mg oral dose administration of ezetimibe to six healthy human volunteers ..... 64

## LISTA DE TABELAS

### **PUBLICAÇÃO CIENTÍFICA 3.1**

TABLE 1 – Inter-day precision data of LC for ezetimibe and simvastatin in samples of pharmaceutical formulation ..... 52

TABLE 2 – Between-analysts precision data of LC for ezetimibe and simvastatin in samples of pharmaceutical formulation..... 53

TABLE 3 – Accuracy of LC for ezetimibe and simvastatin in samples of pharmaceutical formulation..... 54

TABLE 4 – Chromatographic conditions and range investigated during robustness testing . 55

TABLE 5 – Results of the system suitability test ..... 56

TABLE 6 – Determination of ezetimibe and simvastatin in pharmaceutical dosage forms by the LC method..... 57

### **PUBLICAÇÃO CIENTÍFICA 3.2**

TABLE 1 – Recovery of ezetimibe and etoricoxib from human plasma after the extraction procedures ..... 62

TABLE 2 –Intra-day precision and accuracy for the determination of ezetimibe in human plasma ..... 62

TABLE 3 –Inter-day precision and accuracy for the determination of ezetimibe in human plasma ..... 63

TABLE 4 – Summary of stability of ezetimibe in human plasma..... 63

TABLE 5 – Determination of ezetimibe in pharmaceutical dosage forms by the LC and LC-MS-MS methods ..... 63

## LISTA DE ABREVIATURAS

ACAT	Acilcoenzima A:colesterol aciltransferase
Acetil-CoA	Acetil-Coenzima A
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
APCI	Ionização química a pressão atmosférica
Apo E	Apolipoproteína E
ASC	Área sob a curva da concentração plasmática versus tempo
CL	Cromatografia líquida
CL-EM/EM	Cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas
CL-FR	Cromatografia líquida em fase reversa
CL-UV	Cromatografia líquida com detecção no ultravioleta
Cmax	Concentração plasmática máxima
dL	Decilitro
EFS	Extração em fase sólida
ELL	Extração líquido-líquido
EM	Espectrometria de massas
ES	Electrospray
FDA	Food and Drug Administration
h	Hora
HCl	Ácido clorídrico
HDL	Lipoproteína de alta densidade
HMG-CoA	3-hidroxi-3-metilglutaril coenzima A
ICH	International Conference on Harmonisation
IDL	Lipoproteína de densidade intermediária
LDL	Lipoproteína de baixa densidade
LPL	Lipoproteína lipase
M	Molaridade
mg	Miligrama
min	Minutos
mL	Mililitro
mm	Milímetro
MRM	Monitoramento de reação múltipla

NaOH	Hidróxido de sódio
ng	Nanograma
nm	Nanômetro
NPC1L1	Proteína semelhante a Niemann-Pick C1 1
PI	Padrão interno
$r^2$	Coefficiente de determinação
RNA <sub>m</sub>	Ácido ribonucleico mensageiro
$T_{1/2\beta}$	Tempo de meia-vida terminal
t <sub>max</sub>	Tempo para atingir a concentração plasmática máxima
UI	Unidade Internacional
UV	Ultravioleta
USP	Farmacopéia Americana
V	Volume
VLDL	Lipoproteína de muito baixa densidade
V <sub>s</sub>	Versus
°C	Grau Celsius
µg	Micrograma
µL	Microlitro
µm	Micrometro

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	14
<b>2 REVISÃO DA LITERATURA</b> .....	18
<b>3 PUBLICAÇÕES CIENTÍFICAS</b> .....	31
<b>4 DISCUSSÃO</b> .....	65
<b>5 CONCLUSÕES</b> .....	69
<b>6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	71

## **INTRODUÇÃO**

---

## 1 INTRODUÇÃO

---

A aterosclerose é a principal causa de doenças cardiovasculares (PATER, 2001; SANTOS, 2001) e caracteriza-se pelo estreitamento das paredes dos vasos sanguíneos devido à deposição de gordura na camada mais interna da artéria, a íntima. A ruptura da placa e a conseqüente trombose podem levar ao bloqueio de artérias e causar ataque cardíaco. O principal fator de risco é a combinação do elevado nível plasmático da lipoproteína de baixa densidade (LDL) e baixo nível da de alta (HDL) (SCHAEFER, 2002; CHOY et al., 2004). O papel das dislipidemias no desenvolvimento das doenças cardiovasculares tem sido estabelecido por evidências epidemiológicas, clínicas, genéticas e de estudos em animais de laboratório (GRUNDY, 2002; RUSSEL & PROCTOR, 2006). Para a reversão do quadro clínico pode-se intervir no controle dos fatores de risco através do uso de medicamentos, bem como através de programas de atividade física e terapia nutricional.

A dieta e, quando necessária, a terapia farmacológica são indicadas para pessoas com coronariopatia prévia ou com múltiplos fatores de risco e, em particular, para aquelas com história familiar de doença cardiovascular precoce e com portadoras de diabetes. A terceira diretriz brasileira sobre dislipidemias e de prevenção da aterosclerose do Departamento de Aterosclerose da Sociedade Brasileira de Cardiologia sugere que os níveis plasmáticos ótimos de LDL e HDL sejam inferiores a 100 e superiores a 40 mg/dL, respectivamente, para indivíduos maiores de 20 anos de idade.

Os níveis plasmáticos de colesterol têm origem endógena (derivados da biossíntese) e exógena (a partir da absorção intestinal) e podem ser reduzidos através de mecanismos que envolvam a diminuição da síntese do colesterol, aumento da eliminação ou redução da absorção intestinal (IGLESIAS & DÍEZ, 2003). Os medicamentos hipocolesterolemizantes de primeira escolha, representados pela classe das estatinas, inibem a enzima 3-hidroxi-3-metilglutaril coenzima A (HMG-CoA) redutase, e por conseqüência a síntese do colesterol somente pela via endógena. Entretanto, nem todos os pacientes respondem adequadamente ao tratamento, sendo necessária a administração concomitante de outros fármacos que agem por diferentes mecanismos, para manter os níveis recomendados de colesterol (KOSOGLOU et al., 2002).

Recentemente, foi desenvolvida a ezetimiba, que representa o primeiro composto da nova classe de medicamentos, as 2-azetidionas, que inibe seletivamente a absorção intestinal de colesterol e de fitosteróis, sem interferir na absorção de vitaminas lipossolúveis,

triglicerídios e ácidos biliares. É indicada para o tratamento da hipercolesterolemia, podendo ser administrada isoladamente ou em associação com inibidor da enzima HMG-CoA redutase (CATAPANO, 2001; CLADER, 2004; SUDHOP et al., 2005).

Os avanços recentes na área farmacêutica viabilizaram a produção de novos fármacos de interesse terapêutico, que necessitam de métodos analíticos e bioanalíticos para sua determinação quantitativa em produtos farmacêuticos, estudos de dissolução e em matriz biológica, e que são importantes para o controle da qualidade e para a avaliação e interpretação dos dados de biodisponibilidade. A escolha do procedimento baseia-se em vários fatores, que incluem a estrutura e características do fármaco, pureza, quantidade de amostra e finalidade da análise, bem como a disponibilidade de equipamentos e reagentes. O desenvolvimento de métodos envolve a avaliação e otimização de condições, incluindo etapas de preparação da amostra, separação cromatográfica, detecção e quantificação. A validação é necessária para demonstrar, através de estudos experimentais, que o método atende às exigências das aplicações analíticas, assegurando a confiabilidade e reprodutibilidade dos resultados obtidos. Os parâmetros fundamentais de avaliação incluem linearidade, exatidão, especificidade, precisão, recuperação, limites de quantificação e de detecção e teste de adequabilidade do sistema. Para metodologias bioanalíticas são também necessários estudos de estabilidade do fármaco na matriz biológica, de recuperação e de efeitos de matriz (ICH, 1996; CAUSON, 1997; ICH, 1999; FDA, 2001).

A cromatografia líquida, especialmente com detecção no UV, tem sido empregada devido à resolução, precisão e exatidão significativas. Além disso, acoplada à espectrometria de massas, constitui-se em técnica de identificação e caracterização de componentes em misturas complexas de amostras, sendo amplamente adotada na pesquisa clínica e para a determinação de fármacos em matrizes biológicas. Nesse contexto, tem viabilizado estudos de biodisponibilidade e bioequivalência, importantes para o desenvolvimento de medicamentos genéricos. Atualmente está sendo usada de modo crescente para análise de matéria-prima e produtos farmacêuticos, pois oferece eficiência na quantificação, alta especificidade e sensibilidade e tempo de ensaio adequado (NIESSEN, 2003; KORFMACHER, 2005). Convém observar também a importância do desenvolvimento e otimização dos processos de extração, que visam especialmente à recuperação máxima dos fármacos sob estudo e remoção de interferentes do plasma.

Desse modo, o presente trabalho tem por objetivos desenvolver, otimizar e validar procedimentos para avaliação da identidade, pureza e quantificação de ezetimiba no produto acabado e em plasma humano, através de: a) cromatografia líquida em fase reversa, b)



extração líquido-líquido, c) cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas. Nesse contexto, objetiva estabelecer procedimentos que possam contribuir para o domínio tecnológico e científico, aprimorando os estudos de biodisponibilidade e a área de controle da qualidade, garantindo a segurança e eficácia terapêutica dos produtos farmacêuticos.

## **REVISÃO DA LITERATURA**

---

## 2 REVISÃO DA LITERATURA

---

Recentemente foi desenvolvida a ezetimiba, que representa o primeiro composto da nova classe de medicamentos, as 2-azetidionas, e é denominado quimicamente 1-(4-fluorofenil)-3(R)-[3-(4-fluorofenil)-3(S)-hidroxipropil]-4(S)-(4-hidroxifenil)-2-azetidiona. É um pó branco, cristalino, muito solúvel em etanol, metanol e acetona e, praticamente insolúvel em água. Tem ponto de fusão de, aproximadamente, 163 °C e é estável à temperatura ambiente. Possui massa molecular de 409,4 Daltons, fórmula molecular  $C_{24}H_{21}F_2NO_3$ , com a estrutura química mostrada na Figura 1 (BURNETT et al., 1994; ROSENBLUM et al., 1998; XU et al., 2007).

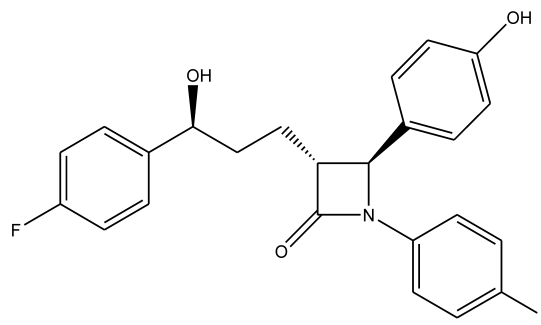


Figura 1 – Estrutura química da ezetimiba

A ezetimiba é ativa por via oral, sendo comercializada na forma de comprimidos de 10 mg sob o nome de Ezetrol<sup>®</sup>, e em associação com 10, 20 ou 40 mg de sinvastatina, como Vytorin<sup>®</sup>. Apresenta atividade hipocolesterolemizante e é indicada para o tratamento de hipercolesterolemia primária, hipercolesterolemia familiar homozigótica e fitosterolemia (CATAPANO, 2001; CLADER, 2004; SUDHOP et al., 2005).

O colesterol tem papel crítico na síntese e estrutura de muitas membranas e como precursor dos hormônios esteróides e dos ácidos biliares. Porém, presente em altos níveis plasmáticos, pode contribuir para a incidência de doenças do sistema cardiovascular, sendo a maior causa de desenvolvimento e progressão da aterosclerose. O colesterol é proveniente de duas vias, exógena através da alimentação e endógena através da síntese de acetil-CoA. A ezetimiba exerce atividade hipolipidêmica reduzindo a absorção do colesterol oriundo da

dieta, através da inibição de enzimas específicas que atuam no transporte de colesterol do intestino.

A biossíntese do colesterol a partir do acetil-CoA tem quatro estágios. No primeiro, três unidades de acetato se condensam para formar um intermediário com seis carbonos, o mevalonato. Nessa etapa, a redução irreversível do composto intermediário 3-hidroxi-3-metilglutaril-CoA (HMG-CoA) pela enzima HMG-CoA redutase é a principal via de regulação da biossíntese do colesterol, e no qual se fundamenta o mecanismo de ação das estatinas. No seguinte passo, há a conversão do mevalonato em unidades de isopreno ativado. O terceiro estágio consiste na polimerização das seis unidades de isopreno para formar a estrutura linear do esqualeno. Na última fase, a ciclização do esqualeno origina o núcleo esteróide, e subsequente série de mudanças (oxidações, remoção ou migração de grupos metila) levam ao produto final, o colesterol (NELSON & COX, 2002; TOBERT, 2003).

O colesterol e seus ésteres, como os triacilgliceróis e fosfolípidios, são essencialmente insolúveis em água e precisam ser transportados para outros tecidos pelo plasma sanguíneo na forma de lipoproteínas plasmáticas. Essas são complexos moleculares de lipídios e proteínas transportadoras específicas chamadas de apolipoproteínas. Diferentes combinações de lipídios e proteínas produzem partículas com densidades diferentes, como quilomícrons, lipoproteínas de densidade muito baixa (VLDL), baixa (LDL), intermediária (IDL) e alta (HDL). Cada classe de lipoproteína tem função específica determinada por sua síntese, composição lipídica e conteúdo de apolipoproteína (MAHLEY & BERSOT, 2006).

No homem a síntese do colesterol ocorre essencialmente no fígado. Pequena fração é incorporada nas membranas dos hepatócitos, mas a maior parte é transportada sob as formas de: colesterol biliar, ácidos biliares e ésteres do colesterol. Os ácidos biliares e seus sais são relativamente hidrofílicos e ajudam na digestão dos lipídios. Os ésteres do colesterol são armazenados no fígado ou transportados inseridos em partículas lipoprotéicas para outros tecidos que usam colesterol. Aproximadamente metade do colesterol livre na bile e 97% dos ácidos biliares são reabsorvidos ao longo do intestino e voltam para a circulação, completando o ciclo chamado de recirculação entero-hepática. O colesterol reabsorvido e os ácidos biliares auxiliam na regulação de sua biossíntese através de mecanismos nos receptores de LDL (NORATA & CATAPANO, 2004; HUI & HOWLES, 2005).

O colesterol da dieta é esterificado pela acilcoenzima A:colesterol aciltransferase (ACAT), proteína de membrana localizada no retículo endoplasmático, que catalisa a transferência de um ácido graxo da coenzima A para o grupo hidroxila do colesterol, convertendo-o em substância mais hidrofóbica. Existem duas formas em mamíferos: ACAT-1

e ACAT-2 (CHANG et al., 2000). A ACAT-2 é encontrada no intestino e no fígado. No fígado, o colesterol livre celular é esterificado antes da montagem das lipoproteínas ricas em triglicerídios (quilomícrons e VLDL). No intestino, regula a absorção do colesterol dietético e, portanto, pode constituir um alvo farmacológico potencial para redução de seus níveis no sangue. A outra enzima, ACAT-1, é expressa nos macrófagos, incluindo células espumosas, células adrenocorticais e glândulas sebáceas da pele. Embora esterifique o colesterol e promova o desenvolvimento de células espumosas, observou-se que camundongos sem sua expressão não apresentaram redução da suscetibilidade à aterosclerose (BUHMAN et al., 2001).

Nos casos em que a dieta contenha mais ácidos graxos e/ou carboidratos do que a quantidade necessária, esses são convertidos em triacilgliceróis no fígado e unidos com apolipoproteínas específicas para formar as VLDL. Essas lipoproteínas são transportadas do fígado para os músculos e para o tecido adiposo, onde são catabolizadas pela lipoproteína lipase (LPL) nos leitos capilares, liberando ácidos graxos livres. Os adipócitos captam esses ácidos graxos, ressintetizam os triacilgliceróis e armazenam os produtos em gotículas lipídicas intracelulares, e por sua vez, os miócitos empregam esses ácidos graxos na produção de energia por oxidação. Quando a hidrólise dos triacilgliceróis está quase completa, os remanescentes de VLDL, habitualmente denominados IDL, são liberados do endotélio capilar e penetram novamente na circulação. Possuem dois destinos potenciais: retorno ao fígado (40 a 60%) com remoção pelos receptores de LDL ou metabolização em LDL. As LDL são muito ricas em colesterol e em ésteres do colesterol e atuam transportando estas substâncias para tecidos periféricos. Praticamente todas as partículas de LDL no plasma derivam das VLDL (MAHLEY & BERSOT, 2006).

A apolipoproteína E (apoE) desempenha importante função no metabolismo das lipoproteínas ricas em triglicerídios (quilomícrons, remanescentes de quilomícrons, VLDL e IDL), bem como na ligação e captação de lipoproteínas plasmáticas, e na redistribuição dos lipídios localmente entre as células (MAHLEY & HUANG, 1999; MAHLEY & RALL, 2000). A apoE controla o catabolismo das lipoproteínas ao mediar sua ligação a proteoglicanos de sulfato de heparan na superfície da célula (particularmente no fígado) e a receptores de LDL (MAHLEY & JI, 1999). Cerca de 75% da apoE no plasma são sintetizados pelo fígado e o restante por outros tecidos. O cérebro é o segundo órgão com maior abundância na síntese de RNAm da apoE, que ocorre tanto nos astrócitos quanto nos neurônios (MAHLEY & HUANG, 1999).

Modelos animais que não expressam a apoE estão sendo muito utilizados, pois desenvolvem espontaneamente hipercolesterolemia e consequente aterosclerose, possibilitando estudar os fatores que influenciam sua formação. A patogênese das lesões ateroscleróticas nesses animais mimetiza a de humanos. Revisão recente cita mais de 645 publicações utilizando esses modelos (DAVIGNON et al., 1999; MEIR & LEITERSDORF, 2004; COLEMAN et al., 2006).

Múltiplos fatores genéticos e ambientais interagem no desenvolvimento da Doença de Alzheimer. Entre eles destacam-se dois relacionados ao aparecimento tardio da doença: o polimorfismo da apoE e a hipercolesterolemia. Recentes estudos epidemiológicos em pessoas, cultura de células e tecidos sugerem forte ligação entre altos níveis de colesterol plasmáticos e a Doença de Alzheimer, indicando que o uso de fármacos hipocolesterolemizantes, especialmente as estatinas, diminuiria significativamente o risco do seu desenvolvimento (NAIDU et al., 2002; PUGLIELLI et al., 2003; CASSERLY & TOPOL, 2004; SHOBAB et al., 2005).

As HDL são lipoproteínas protetoras, que diminuem o risco de coronariopatia, sendo desejável sua presença em níveis elevados. Esse efeito pode resultar da participação das HDL no transporte reverso do colesterol, processo pelo qual o colesterol em excesso é captado e transferido para o fígado para ser excretado (ASSMANN & NOFER, 2003). Além disso, as HDL também podem proteger por mecanismos baseados nas supostas atividades antiinflamatórias, antioxidativas, antiagregantes de plaquetas, anticoagulantes e pró-fibrinolíticas (NOFER et al., 2002).

Para pessoas com colesterol acima do valor ideal, foi demonstrado que a terapia hipolipidêmica não só diminuía a taxa de mortalidade por coronariopatia em 42% durante um período de 6 anos, como também era responsável por redução de 30% na taxa de mortalidade geral e nos eventos cerebrovasculares (SCANDINAVIAN SIMVASTATIN SURVIVAL STUDY GROUP, 1994).

As lipoproteínas podem ser modificadas *in vivo*, por oxidação, glicosilação, desialilação. Essas modificações parecem ser responsáveis pelo desencadeamento do processo aterogênico. A aterosclerose é um processo dinâmico, evolutivo, a partir de dano endotelial de origem multifatorial, com características de reparação tecidual. Apesar das numerosas evidências implicando a oxidação das LDL como etapa necessária durante a aterogênese, estudos clínicos controlados não conseguiram demonstrar qualquer eficácia das vitaminas antioxidantes na prevenção da doença vascular (YUSUF, 2002; BROWN et al., 2002).

As lesões ateroscleróticas (ateromas) são espessamentos focais assimétricos da camada íntima. No centro de um ateroma, células espumosas e gotas de lipídios extracelulares formam região central que é circundada por capa de células de músculo liso e matriz rica em colágeno. Células inflamatórias e imunes do sangue, como células T, macrófagos e mastócitos são abundantes na região onde o ateroma cresce. O infarto do miocárdio ocorre quando a placa aterosclerótica é rompida e a consequente trombose impede o fluxo sanguíneo através da artéria coronária (HANSSON, 2005). A redução agressiva dos lipídios parece alterar e estabilizar a arquitetura das placas, resultando em menos lipídios, menor número de macrófagos e maior capuz fibroso rico em colágeno e em células musculares lisas (BROW et al., 1993; LIBBY, 2002; CORTI et al., 2003).

Apesar dos avanços no tratamento das anormalidades lipídicas, um estudo de gerenciamento dos fatores de risco da doença arterial coronariana revelou que apenas metade dos pacientes que receberam terapia hipolipemiante alcançou os níveis estabelecidos. Adicionalmente a estes dados, a tolerância e segurança são considerados desafios terapêuticos em pacientes submetidos a altas doses desses medicamentos, além do que, dosagens elevadas não são garantia de eficácia terapêutica em indivíduos hiperlipidêmicos mais graves (EUROASPIRE II STUDY GROUP, 2001).

A ezetimiba foi desenvolvida por químicos farmacêuticos ao estudarem a inibição da ACAT intestinal, quando descobriram, também, vários compostos que inibem a absorção intestinal do colesterol (BURNETT et al., 1994; VAN HEEK et al., 1997).

Dados recentes indicam que a ezetimiba inibe processo de transporte específico do colesterol e dos esteróis vegetais mediado pela proteína semelhante a Niemann-Pick C1 1 (NPC1L1) nos enterócitos jejunais, sem interferir na absorção de vitaminas lipossolúveis (ALTMANN et al., 2004; DAVIS et al., 2004). Os níveis plasmáticos dos esteróis vegetais campesterol e sitosterol foram reduzidos em 48 e 42%, respectivamente (DAVIS et al. 2004; SUDHOP et al., 2005). Em camundongos normais, a ezetimiba inibiu a absorção do colesterol em cerca de 70%; em camundongos sem a expressão da NPC1L1, a absorção do colesterol é 86% menor e a ezetimiba não exerce efeito algum sobre sua absorção (ALTMANN et al., 2004). Também observou-se que a ezetimiba poderia atuar clivando o complexo Annexin 2-caveolin 1, que também é responsável pelo transporte do colesterol exógeno do intestino para o retículo endoplasmático, mas esse mecanismo só seria eficaz quando a hiperlipidemia fosse causada pela dieta ou mutação no receptor de LDL (UITTENBOGAARD et al., 2002; SMART et al., 2004).

Em decorrência da inibição da absorção intestinal de colesterol há redução da sua incorporação nos quilomícrons, diminuindo em seguida a liberação de colesterol no fígado pelos remanescentes de quilomícrons, reduzindo diretamente a aterogênese. Em modelos animais de dislipidemia por remanescentes, a ezetimiba diminuiu acentuadamente a aterosclerose induzida pela dieta (DAVIS et al., 2001).

A redução do aporte de colesterol intestinal para o fígado pelos remanescentes de quilomícrons estimula a expressão de genes hepáticos que regulam a expressão do receptor de LDL e a biossíntese de colesterol. A maior expressão dos receptores hepáticos de LDL aumenta sua depuração plasmática. A ezetimiba reduz os níveis de LDL em 15 a 20% (GAGNÉ et al., 2002; KNOPP et al., 2003). Os níveis de triglicérides em jejum diminuem cerca de 5%, enquanto os de HDL aumentam cerca de 1 a 2% (DUJOVNE et al., 2002).

Nos seres humanos, a ezetimiba reduziu a absorção de colesterol em 54%, resultando em aumento compensatório na sua biossíntese, que por sua vez, pode ser inibida por estatina (SUDHOP et al., 2002; MIETTINEN & GYLLING, 2003). Esse aumento da síntese endógena é resultado da tentativa do organismo em manter o equilíbrio do colesterol, porém a mudança de um fator não é compensada totalmente por outro, o que garante a eficácia terapêutica dos medicamentos (SANTOSA et al., 2007). A terapia com a associação das duas classes de agentes impede o aumento compensatório da biossíntese de colesterol induzida pela ezetimiba e o aumento compensatório da absorção induzido pelas estatinas, combinação que permite maior redução dos níveis de LDL (BALLANTYNE et al., 2003; MELANI et al., 2003; BALLANTYNE et al., 2004; BALLANTYNE et al., 2007). Esses dados sustentam a aprovação de medicamento contendo 10 mg de ezetimiba e diferentes dosagens de sinvastatina (10, 20, 40 e 80 mg, esta última não disponível no Brasil). A associação de ezetimiba com a dose mais alta de sinvastatina gerou redução média nos níveis de LDL de 60%, ou seja, superior à produzida por estatinas utilizadas como monoterapia (FELDMAN et al., 2004).

Após administração oral, a ezetimiba é rapidamente absorvida pelas células intestinais e extensivamente conjugada formando glicuronídeo farmacologicamente ativo (reação de fase II). Após absorção, atinge concentração plasmática máxima em cerca de 1 hora, retornando ao fígado e em seguida à luz intestinal, onde permanece na borda vilosa dos enterócitos, bloqueando a captação dos esteróis. O reconhecimento de picos plasmáticos sucessivos do fármaco sugere a recirculação enteroepática, o que dificulta determinação precisa da sua meia-vida efetiva. Observou-se também metabolismo oxidativo mínimo, reação de fase I, em todas as espécies avaliadas (VAN HEEK et al., 2000; PATRICK et al., 2002).



A ezetimiba e seu glicuronídeo são os principais derivados do fármaco detectados no plasma, constituindo aproximadamente 10 a 20% e 80 a 90% do total, respectivamente. A ezetimiba total é definida como a soma da ezetimiba livre (não conjugada) e de seu metabólito, que é quantificado no plasma após tratamento com  $\beta$ -glicuronidase. Ensaio farmacológicos mostram que o metabólito é, pelo menos, tão ativo quanto o fármaco original (VAN HEEK et al., 2000).

O maior mecanismo de metabolização da ezetimiba consiste na glicuronidação do grupo 4-hidroxifenil. Menos de 1% da dose administrada é eliminada na forma de glicuronídeo benzílico de ezetimiba. Outros metabólitos (4,1%) consistem numa cetona e seu glicuronídeo (GHOSAL et al., 2004), como demonstrado na figura 2.

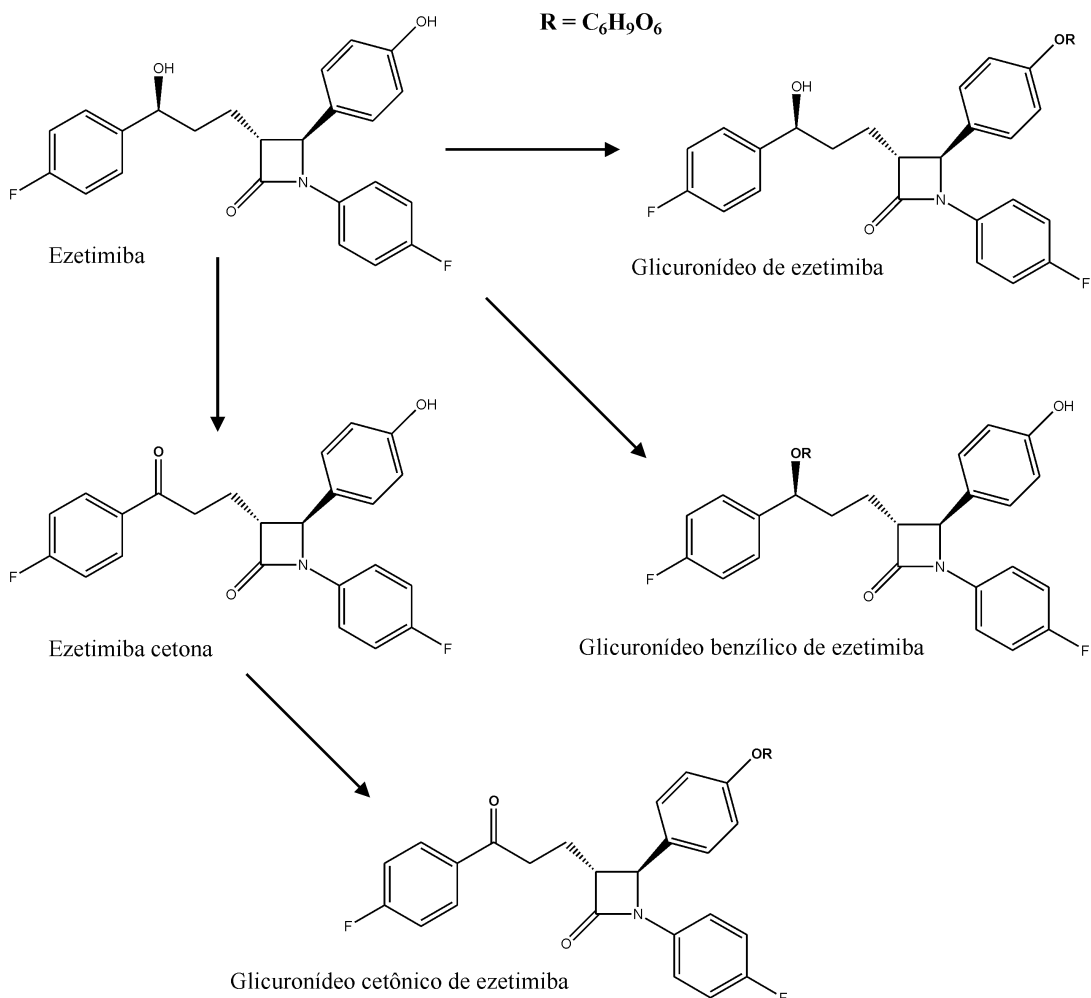


Figura 2 – Mecanismos de metabolização da ezetimiba – Adaptado de Kosoglou et al., 2005.

A absorção, o metabolismo e a excreção da ezetimiba foram determinados em 8 voluntários sadios do sexo masculino administrando-se de dose única de 20 mg de [ $^{14}C$ ]-

ezetimiba e coletando-se amostras de sangue, urina e fezes por período de 10 dias. A ezetimiba foi rapidamente absorvida e conjugada após administração oral, com concentração plasmática máxima ( $C_{max}$ ) de 5,21 e 61,2 ng/mL após 9,88 e 2,31 horas ( $t_{max}$ ), com área sob a curva da concentração plasmática vs tempo (ASC) de 86,4 e 636 ng.h/mL para a ezetimiba e seu metabólito, respectivamente. As principais vias de eliminação são a fecal, representando aproximadamente 77% da dose administrada, e a urinária, por aproximadamente 11% (PATRICK et al., 2002).

O perfil farmacocinético e de segurança da ezetimiba foi estudado em voluntários sadios do sexo masculino que receberam 10, 20 ou 50 mg diariamente, por 14 dias. A ezetimiba foi rapidamente absorvida e lentamente eliminada, com meia-vida terminal ( $t_{1/2\beta}$ ) estimada de 16 a 31 horas, o que permite administração única diária. A ezetimiba e seu metabólito atingiram o estado de equilíbrio após, aproximadamente, 10 dias, com boa tolerância e sem incidência de efeitos colaterais ou de toxicidade na dose de 50 mg. A biodisponibilidade absoluta da ezetimiba não foi determinada, pois ela é altamente insolúvel no meio aquoso (KOSOGLOU et al., 2005).

A ezetimiba não induz nem inibe as enzimas do citocromo P-450, não havendo interações farmacocinéticas clinicamente relevantes com drogas metabolizadas por esta via, tais como: varfarina, digoxina, cimetidina, glipizida e contraceptivos orais. A administração concomitante de ezetimiba com gemfibrozil e fenofibrato aumentou em 1,7 e 1,5 vezes a biodisponibilidade da ezetimiba, mas não foi considerado clinicamente relevante. A colestiramina não deve ser administrada juntamente com a ezetimiba, pois inibe sua absorção com redução da ASC em aproximadamente 55% (JEU & CHENG, 2003; NUTESCU & SHAPIRO, 2003). A administração da associação de ezetimiba/sinvastatina com fenofibrato reduziu o nível plasmático de LDL em 46% e aumentou o de HDL de 19%, com perfil de segurança semelhante à administração separada dos fármacos (FARNIER et al., 2007).

A influência da alimentação na biodisponibilidade oral da ezetimiba foi estudada em 18 voluntários sadios de ambos os sexos, que receberam o fármaco em condições de jejum e com alimentos. A administração concomitante com alimentos não alterou a biodisponibilidade, entretanto a ingestão de refeição rica em gordura aumentou o  $C_{max}$  em aproximadamente 44% e diminuiu o  $t_{max}$ , porém sem efeito sobre a ASC. Concluíram que a ezetimiba pode ser administrada com alimentos (COURTNEY et al., 2002).

Ezzet et al. (2001) desenvolveram modelo farmacocinético para avaliar a influência da recirculação enteroepática no perfil da ezetimiba possibilitando análise formal da quantidade e da frequência da recirculação e sua influência sobre a biodisponibilidade. A quantidade de

ezetimiba que recircula representa 17 a 20% da dose total administrada. O C<sub>max</sub> e o t<sub>max</sub> observados após administração de dose única de ezetimiba 10 mg, em 54 voluntários, foi de 85 ng/mL e 1 h, respectivamente. Após administração de dose múltipla a 36 voluntários, o C<sub>max</sub> e o t<sub>max</sub> observados foram de 122 ng/mL e 1 h. Estes valores estão de acordo com os calculados pelo modelo farmacocinético proposto pelos autores, de 74 ng/mL e 131 ng/mL para o C<sub>max</sub> e de 1,3 e 1,4 horas para o t<sub>max</sub>, após administração de doses única e múltiplas, respectivamente.

Li et al. (2006) desenvolveram e validaram método por cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas com ionização por electrospray no modo negativo para a determinação da ezetimiba e de seu metabólito glicuronidado, em plasma humano, utilizando ezetimiba radioativa como padrão interno. As amostras foram extraídas utilizando sistema líquido-líquido e terc-butil metil éter como solvente de extração, com recuperação média de 78,6% para a ezetimiba e de 48,3% para a ezetimiba total. A fase móvel constituída de acetonitrila e acetato de amônio foi eluída na forma de gradiente com vazão de 0,25 mL/min e tempo total da corrida analítica de 5 minutos. As transições de 408,5>270,8 e 414,5>276,8 foram utilizadas para monitorar a ezetimiba e o PI, respectivamente. O método foi linear na faixa de 0,02-20 ng/mL para a ezetimiba e de 0,25-250 ng/mL para a ezetimiba total. A metodologia foi utilizada para a quantificação de ezetimiba e seu metabólito em um estudo farmacocinético em 20 voluntários sadios.

Oswald et al. (2006) desenvolveram e validaram metodologia para determinação da ezetimiba livre e total em soro, urina e fezes humanos por cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas com ionização química a pressão atmosférica no modo negativo, monitorando as transições de 408>271 e 223>117 para a ezetimiba e PI (4-hidroxicalcona), respectivamente. Utilizaram sistema de extração líquido-líquido com terc-butil metil éter. Na separação cromatográfica, foi utilizada coluna C<sub>18</sub> (100 mm x 2,1 mm, tamanho de partícula de 3,5 µm) e fase móvel composta de acetonitrila:água (60:40) eluída isocraticamente com vazão de 0,2 mL/min. Os autores aplicaram a metodologia para a determinação da concentração sérica e excretada da ezetimiba e seu metabólito.

Migoya et al. (2006) realizaram estudo para avaliar a bioequivalência entre comprimidos contendo a associação de ezetimiba e sinvastatina e a administração destes fármacos individualmente. Os autores determinaram o nível plasmático da ezetimiba livre e total, bem como, da sinvastatina e da sua forma ácida, seu metabólito mais abundante. Concluíram que os produtos apresentam a mesma biodisponibilidade, podendo ser administrados a pacientes de maneira intercambiável, sem prejuízo da eficácia terapêutica.

Sankar et al. (2005) desenvolveram método espectrofotométrico para análise de etoricoxibe e ezetimiba em produtos farmacêuticos, utilizando para detecção os comprimentos de onda de 235 e 230 nm, respectivamente. Outro método espectrofotométrico foi desenvolvido e validado por Imran et al. (2006) para avaliação da estabilidade da ezetimiba e carvedilol, dois fármacos praticamente insolúveis em água. O método mostrou-se linear na faixa de 2-50 e 2-20  $\mu\text{g/mL}$  com detecção em 232 e 238 nm para a ezetimiba e o carvedilol, respectivamente. O método foi aplicado para quantificação dos fármacos após degradação forçada e para análise de produtos comerciais.

Sistla et al. (2005) desenvolveram e validaram metodologia por cromatografia líquida em fase reversa para realizar análise de ezetimiba em produtos comerciais. Os autores utilizaram acetonitrila:água (70:30) como fase móvel, e para resolver problemas de assimetria do pico adicionaram reagente de pareamento iônico, ácido 1-heptano sulfônico. A metodologia foi otimizada com coluna  $\text{C}_{18}$  (250 mm x 4 mm, 5  $\mu\text{m}$ ), vazão de 0,5 mL/min e apresentou linearidade na faixa de 0,5-50  $\mu\text{g/mL}$ . A especificidade foi determinada pelo estudo da degradação da substância química de referência da ezetimiba, que foi submetida a condições de hidrólise ácida e básica, fotólise, oxidação e redução química.

Singh et al. (2006) estudaram condições de degradação forçada e desenvolveram metodologia por cromatografia líquida para estudos de estabilidade de ezetimiba. Condições de hidrólise alcalinas (NaOH 0,1 M), ácidas (HCl 0,1 M) e neutras foram testadas em diferentes temperaturas. Os autores analisaram também o efeito de condições de oxidação, redução e de fotólise. Adicionalmente, testaram a estabilidade da matéria prima frente ao calor seco. Para a separação cromatográfica foi utilizada coluna  $\text{C}_8$  (250 mm x 4 mm, 5  $\mu\text{m}$ ) com eluição gradiente (tampão acetato, pH 7,0 e acetonitrila, 30-100% de acetonitrila), com vazão de 1 mL/min e tempo total de corrida de 80 minutos. O método demonstrou-se adequado para estudos de estabilidade, porém, principalmente devido ao longo tempo de corrida, não seria adequado para o controle de qualidade de rotina deste fármaco.

O desenvolvimento de técnicas de ionização, tais como a ionização química a pressão atmosférica (APCI) e por electrospray (ES), possibilitou o acoplamento de duas poderosas técnicas analíticas, a espectrometria de massas (EM) com a cromatografia líquida (CL), originando método (CL-EM/EM) robusto e aplicável a grande variedade de matrizes. Dessa forma, o espectrômetro de massas é considerado o detector ideal, pois apresenta alta sensibilidade, seletividade e resposta a diferentes classes de compostos com capacidade de detecção de misturas complexas, com análises rápidas e quantitativas. Nesse sentido, a CL-EM/EM tem sido amplamente utilizada para a determinação de fármacos em estudos clínicos

e atualmente vem sendo usada de modo crescente para análise de produtos farmacêuticos (LEE, 2005; PEREIRA et al., 2005). A espectrometria de massas, comparada à CL-UV, apresenta vantagem em relação ao tempo de análise, sensibilidade e seletividade; entretanto, até o momento, não é preconizada oficialmente como método analítico para quantificação de produtos farmacêuticos.

Uma das etapas limitantes do processo de análise de misturas em matrizes biológicas é a extração dos analitos de interesse. Essa pode ser executada em fase sólida (EFS) ou líquido-líquido (ELL). A ELL, baseada na solubilidade dos analitos presentes na amostra em dois solventes imiscíveis, pode ser demorada, necessitar grandes volumes de solventes orgânicos, e apresentar baixa reprodutibilidade em decorrência das várias etapas do processo. Por sua vez, a EFS foi desenvolvida para aumentar a reprodutibilidade e diminuir o volume de solventes orgânicos usados. Porém, em geral, requer volumes significativos de plasma e de solventes orgânicos, que necessitam de evaporação e posterior ressuspensão da amostra (LANÇAS, 2004; GONÇALVES et al., 2005). Recentemente foram desenvolvidos os métodos de EFS automatizados que fornecem elevada precisão e sensibilidade, diminuindo o tempo total para preparação de amostras em relação aos métodos tradicionais (SCHELLEN et al., 2003; ALNOUTI et al., 2005).

Procedimento importante nos processos de extração de fármacos de matrizes biológicas consiste na adição de concentração conhecida de padrão interno (PI). Determina-se a relação entre as áreas fornecidas pela amostra e PI, eliminando desse modo, erros decorrentes da extração. O PI deve possuir propriedades químicas similares ao composto sob análise, estar presente em concentrações similares, apresentar tempo de retenção semelhante e não interferir na análise (CAUSON, 1997).

O estudo do metabolismo dos fármacos é um passo importante e essencial no desenvolvimento de novos produtos, principalmente quando há a suspeita de formação de metabólitos farmacologicamente ativos ou até tóxicos. Desde a introdução dos modos de ionização ES e APCI, a CL-EM/EM tem sido amplamente utilizada para estudos de metabolismo, devido a sua alta especificidade, sensibilidade e eficiência. Normalmente as análises de metabólitos são realizadas em espectrômetros do tipo triplo quadrupolo, onde os espectros dos íons precursores são úteis para identificação de metabólitos, enquanto que os espectros dos íons filhos são utilizados para confirmação da identidade e elucidação estrutural dos compostos (KOSTIAINEN et al., 2003; ANARI & BAILLIE, 2005).

A validação de métodos analíticos e bioanalíticos é um processo dinâmico e constante que inicia nas fases de seleção, desenvolvimento e otimização das metodologias, qualificação

dos instrumentos, materiais e pessoal. Um processo de validação bem definido e documentado fornece evidências objetivas de que o sistema e o método atendem às exigências das aplicações analíticas, sendo adequado para o uso pretendido. Os parâmetros fundamentais avaliados na validação de um método são: especificidade, linearidade, precisão, exatidão, robustez, teste de adequabilidade do sistema, limite de detecção e limite de quantificação. No caso de métodos bioanalíticos, devem-se incluir também parâmetros de efeitos de matriz, recuperação e estabilidade do fármaco na matriz biológica (ICH, 1996; CAUSON, 1997; SHAH et al., 2000; FDA, 2001; ANVISA, 2002; ANVISA, 2003). A capacidade de um método analítico de separar, detectar e quantificar impurezas ou produtos de degradação também é parâmetro que deverá ser avaliado durante a validação (RAO & NAGARAJU, 2003; ICH, 2006).

É conveniente observar que a ezetimiba não está descrita em nenhuma farmacopéia e, até o momento, encontram-se na literatura relativamente poucos métodos validados para a análise quantitativa em produtos farmacêuticos. Além disso, há publicações, conforme já destacado, relativas à determinação em matrizes biológicas. Porém, o desenvolvimento e validação de novas metodologias, que aprimorem o controle da qualidade, e que possam ser utilizadas para avaliações em estudos clínicos e farmacocinéticos, representam contribuição significativa para a área de medicamentos.

As duas publicações científicas efetuadas no contexto da dissertação estão anexadas a seguir, observando-se que os materiais e métodos utilizados, bem como os resultados obtidos, encontram-se descritos nas mesmas.

## **PUBLICAÇÕES CIENTÍFICAS**

---

### 3 Publicações científicas

---

3.1 – OLIVEIRA, P. R.; BARTH, T.; TODESCHINI, V.; DALMORA, S. L. Simultaneous liquid chromatographic determination of ezetimibe and simvastatin in pharmaceutical products. **Journal of AOAC International**, in press.



**Simultaneous liquid chromatographic determination of ezetimibe and  
simvastatin in pharmaceutical products**

Paulo Renato Oliveira, Thiago Barth, Vitor Todeschini, Sérgio Luiz Dalmora\*

*Department of Industrial Pharmacy*

*Health Science Centre*

*Federal University of Santa Maria*

*97.105-900 – Santa Maria-RS, Brazil*

\*Corresponding author. Phone/fax: + 55 (55) 3220 8805.

*E-mail address:* [sdalmora@ccs.ufsm.br](mailto:sdalmora@ccs.ufsm.br)

**Abstract**

A reversed-phase liquid chromatography (LC) method was developed and validated for the simultaneous determination of ezetimibe and simvastatin in pharmaceutical dosage forms. The LC method was carried out on a Synergi fusion C<sub>18</sub> column (150 mm x 4.6 mm I.D.), maintained at 45 °C. The mobile phase consisted of phosphate buffer 0.03 M, pH 4.5/acetonitrile (35:65, v/v), run at a flow rate of 0.6 mL/min and using a photodiode array (PDA) detection at 234 nm. The chromatographic separation was obtained within 15.0 min and it was linear in the concentration range of 0.5-200 µg/mL. Validation parameters such as the specificity, linearity, precision, accuracy, and robustness were evaluated, giving results within the acceptable range for both compounds. Moreover, the proposed method was successfully applied for the routine quality control analysis of pharmaceutical products.

**Keywords:** Ezetimibe, Simvastatin, Liquid chromatography, Validation.

## 1. Introduction

Ezetimibe (Figure 1) is the first of a new class of compounds, the 2-azetidinones, that selectively and potently inhibits the absorption of biliary and dietary cholesterol and related plant sterols from the small intestine by blocking the recently described Niemann-Pick C1 like 1 protein cholesterol transporter, without affecting the absorption of fat-soluble vitamins, triglycerides or bile acids (1-3). Simvastatin (Figure 1) is an inhibitor of 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A (HMG-CoA) reductase, which inhibits the synthesis of mevalonate, a rate-limiting step in the endogenous cholesterol biosynthesis, resulting in a reduction in the plasma low density lipoprotein cholesterol (LDL-C) level (4-5). The association of these drugs with complementary mechanisms of action is an important therapeutic option for the cardiovascular risk reduction in high- and very high-risk patients. Ezetimibe\simvastatin (Vytorin<sup>®</sup>) has been shown to be more effective in the reduction of LDL-C than simvastatin or atorvastatin monotherapy (6-7).

### FIGURE 1

Liquid chromatography methods were developed and validated for the determination of ezetimibe in pharmaceutical dosage forms and for the stability studies (8-9). Liquid chromatography-tandem mass spectrometry methods have been described for the analysis of ezetimibe in pharmaceutical formulations, human plasma, serum, urine and feces (10-12). Analytical methods for the quantitative determination of HMG-CoA reductase inhibitors, including simvastatin, in biological samples have been reviewed (13). The determination of simvastatin in pharmaceutical dosage forms was published applying LC (14-15), capillary electrophoresis (16) and second-derivative UV spectrometry (17).

At the moment, there is no published method validated for the simultaneous quantitative analysis of ezetimibe\simvastatin in pharmaceutical formulations. As liquid chromatography with UV detection has been used for quality control of most of the pharmaceuticals due to its simplicity, high resolution and significant precision and accuracy, the aim of the present work was to develop and validate a LC method for the simultaneous determination of ezetimibe and simvastatin in solid pharmaceutical dosage forms.

## **2. Experimental**

### **2.1. Chemical and reagents**

Ezetimibe was purchased from Sequoia Research Products (Oxford, UK) and simvastatin reference standard was from United States Pharmacopoeia. A total of six batches of Vytorin<sup>®</sup> (Merck Sharp & Dohme, Haar, Germany) tablets containing 10 mg of ezetimibe associated with 10, 20 or 40 mg of simvastatin were obtained from commercial sources within their shelf life period and were identified by Arabic numbers from 1 to 6. HPLC-grade acetonitrile was obtained from Tedia (Fairfield, USA). All chemicals used were of pharmaceutical or special analytical grade. For all the analyses, ultrapure water (Labconco, Kansas City, USA) filtered through a 0.22 µm membrane filter was used.

### **2.2. Apparatus and analytical conditions**

A Shimadzu LC system (Shimadzu, Kyoto, Japan) was used equipped with a SCL-10A<sub>VP</sub> system controller, LC-10 AD<sub>VP</sub> pump, DGU-14A degasser, CTO-10A<sub>VP</sub> column oven, SIL-10AD<sub>VP</sub> autosampler and a SPD-M10A<sub>VP</sub> photodiode array (PDA) detector. The detector was set at 234 nm and peak areas were integrated automatically by computer using a

Shimadzu Class VP<sup>®</sup> V 6.12 software program. The experiments were carried out on a reversed-phase Phenomenex (Torrance, USA) Synergi fusion C<sub>18</sub> column (150 mm x 4.6 mm I.D., with a particle size of 4 μm and pore size of 80 Å). A security guard holder (4.0 mm x 3.0 mm I.D.) was used to protect the analytical column. The LC system was operated isocratically at 45 °C using a mobile phase of potassium phosphate buffer 0.03 M, pH 4.5/acetonitrile (35:65, v/v). This was filtered through a 0.45 μm membrane filter (Millipore, Bedford, MA, USA) and run at a flow rate of 0.6 mL/min. The injection volume was 20 μL for both standard and samples. Columns tested: Shimadzu shim-pack CLC-ODS C<sub>18</sub> (M) (150 mm x 4.6 mm I.D., 5 μm, 100 Å); Advanced Chromatography Technologies (Aberdeen, Scotland) Ace 5 C<sub>18</sub> (150 mm x 4.6 mm I.D., 5 μm, 100 Å); Waters (Dublin, Ireland) XTerra MS C<sub>18</sub> (150 mm x 3.9 mm I.D., 5 μm, 132 Å); Phenomenex Gemini C<sub>18</sub> (150 mm x 4.6 mm I.D., 5 μm, 110 Å).

## **2.3. Procedure**

### **2.3.1. Preparation of reference solutions**

The stock solutions of ezetimibe and simvastatin were prepared by weighing, respectively, 10 mg of each reference standard, transferred to individual 10 mL volumetric flasks and diluted to volume with acetonitrile, obtaining a concentration of 1 mg/mL. The stock solutions were stored at 2-8 °C protected from light. Working standard solutions were prepared daily by diluting the stock solutions to an appropriate concentration in mobile phase.

### **2.3.2. Preparation of sample solutions**

To prepare the sample stock solution, tablets containing 10 mg of ezetimibe and 10 mg of simvastatin were accurately weighed and crushed to a fine powder. An appropriated

amount was transferred into an individual 50 mL volumetric flask, diluted to volume with acetonitrile, and sonicated for 15 min, obtaining the final concentration of 1mg/mL of the active pharmaceutical ingredient. This solution was stored at 2-8 °C protected from light. Working sample solutions were prepared daily by diluting the stock solution to an appropriate concentration in mobile phase.

## **2.4. Validation of the method**

The method was validated in samples of pharmaceutical formulations with the label claim of 10 mg for both drugs by the determination of the following parameters: specificity, linearity, range, precision, accuracy, limit of detection (LOD), limit of quantitation (LOQ) and robustness, following the ICH guidelines (18).

### **2.4.1. Specificity**

The specificity of the method was determined by subjecting a sample solution (100 µg/mL) to accelerated degradation by acidic, basic, oxidative, and photolytic conditions to evaluate the interference in the quantitation of ezetimibe and simvastatin. After the procedures, the samples were diluted in mobile phase to a final concentration of 50 µg/mL. A sample solution in 0.1 M hydrochloric acid was used for the acidic hydrolysis, and maintained at ambient temperature for 2h for simvastatin and refluxed at 100 °C for 2h for ezetimibe. A sample solution in 0.1 M sodium hydroxide for the basic hydrolysis evaluation was maintained at ambient temperature for 2h for both compounds. The oxidative degradation was induced by storing the samples solutions in 5% hydrogen peroxide, at ambient temperature for 2h, protected from light. Photodegradation was induced by exposing the samples to 200 watt hours/square meter of near ultraviolet light. Then, the specificity of the method was

established by determining the peak purity of ezetimibe and of simvastatin in degraded samples using a PDA detector.

#### **2.4.2. Linearity and range**

Linearity was determined by constructing three calibration curves. For the construction of each calibration curve seven standard concentrations of ezetimibe and of simvastatin, including the LOQ, in the range of 0.5–200 µg/mL were prepared in mobile phase. Before injection of the solutions, the column was equilibrated for at least 20 min with the mobile phase flowing through the system. Three replicates of 20 µL injections were made for the standard solution to verify the repeatability of the detector response at each concentration. The peak areas of the chromatograms were plotted against the concentrations of ezetimibe or simvastatin to obtain the calibration curve. The seven concentrations of the standard solutions were subjected to regression analysis by the least squares method to calculate calibration equation and correlation coefficient.

#### **2.4.3. Precision and accuracy**

The precision of the method was determined by repeatability and intermediate precision. Repeatability was examined by twelve evaluations of the same concentration sample of ezetimibe and simvastatin, on the same day, under the same experimental conditions. The intermediate precision of the method was assessed by carrying out the analysis on three different days (inter-days) and also by other analysts performing the analysis in the same laboratory (between-analysts). The accuracy was evaluated applying the proposed method to the analysis of the in-house mixture of the tablet excipients with known amounts of the each drug, to obtain solutions at concentrations of 40, 50, and 60 µg/mL, equivalent to 80,

100, and 120%, respectively. The accuracy was calculated as the percentage of the drug recovered from the formulation matrix.

#### **2.4.4. Limit of quantitation and limit of detection**

The limit of quantitation (LOQ) was taken as the lowest concentration of analyte in a sample that can be determined with acceptable precision and accuracy, and the limit of detection (LOD), was taken as the lowest absolute concentration of analyte in a sample that can be detected but not necessarily quantified. The LOD and LOQ were calculated from the slope and the standard deviation of the intercept of the mean of three calibration curves, determined by a linear regression model, as defined by ICH. The LOQ was also evaluated in an experimental assay.

#### **2.4.5. Robustness**

The robustness was determined by analyzing the same samples under a variety of conditions of the method parameters, such as: flow rate, column temperature, injection volume, stability of the analytical solution in the autosampler, changing the mobile phase composition, variations in the mobile phase pH, and different columns.

### **2.5. Analysis of pharmaceutical tablet dosage forms**

For the quantitation of ezetimibe\simvastatin in the dosage forms, twenty tablets of each pharmaceutical sample containing 10 mg of ezetimibe and respectively, 10, 20 or 40 mg of simvastatin were separated, accurately weighed and crushed to a fine powder. An appropriate amount of each tablet dosage form was transferred into an individual 50 mL volumetric flask, diluted to volume with acetonitrile and sonicated for 15 min, obtaining the final concentrations of 1 mg/mL of ezetimibe and 1, 2 or 4 mg/mL of simvastatin (stock



solutions). For the analysis, the stock solutions were daily diluted to appropriate concentrations with mobile phase. An aliquot of 20  $\mu\text{L}$  was injected for the analysis and the amount of each drug per tablet calculated against the respective reference standard.

### 3. Results and discussion

The experimental conditions were selected and the LC method validated for the simultaneous analysis of ezetimibe and simvastatin in pharmaceutical dosage forms. A typical chromatogram obtained by the proposed LC method is shown in Figure 2.

#### FIGURE 2

The specificity of the analytical method for ezetimibe was indicated in Figure 3, where the acidic and basic conditions generated additional peaks. Under the oxidative condition, the content exhibited significant decrease without any additional peak. This may indicate that the degradation products were not detected by UV. Under the photolytic condition there was no change in the area and no additional peak was detected.

The specificity of the analytical method for simvastatin was indicated in Figure 4, where the oxidative condition resulted in significant decrease of the area without any additional peak. This may indicate that the degradation products were not detected by UV. Under the basic condition the retention time changed to about 6.6 min, which could be explained by the conversion of the lactone form of simvastatin to the corresponding hydroxy acid form in alkaline media (19). The acidic condition generated one additional peak. Under the photolytic condition there was no change in the area and no additional peak was detected.

The studies with the PDA detector showed that the ezetimibe and simvastatin peaks were free from any coeluting peak, with values of peak purity index higher than 0.9999, thus demonstrating that the proposed method is specific.

### FIGURE 3

### FIGURE 4

The calibration curves constructed for ezetimibe and simvastatin were found to be linear in the 0.5–200 µg/mL range. The value of the determination coefficient calculated ( $r^2=0.9999$ ,  $y=67826.8 \pm 623.4x + 309.8 \pm 1196.4$ ; and  $r^2=0.9999$ ,  $y=93819.4 \pm 1058.3x + 9786.8 \pm 2180.3$  for ezetimibe and simvastatin, respectively, where, x is concentration and y is the peak absolute area) indicated the linearity of the calibration curve for the method.

The precision evaluated as the repeatability of the method was studied by calculating the relative standard deviation (RSD) for twelve determinations of the concentration of 50 µg/mL performed on the same day and under the same experimental conditions. The RSD value obtained was 0.71% and 0.50% for ezetimibe and simvastatin, respectively.

The intermediate precision was assessed by analyzing two samples of the pharmaceutical formulation on three different days (inter-day, Table 1); the RSD values obtained were 0.85% and 0.71% for ezetimibe and 0.76% and 0.06% for simvastatin. Between-analysts precision was determined by calculating the RSD for the analysis of two samples of the pharmaceutical formulation by three analysts; the values were found to be 0.49% and 0.44% for ezetimibe and 0.98% and 0.42% for simvastatin (Table 2).

### TABLE 1

**TABLE 2**

The accuracy was assessed from three replicate determinations of three different solutions containing 40, 50 and 60  $\mu\text{g/mL}$ . The absolute means obtained for ezetimibe were 99.79, 101.13 and 99.91% respectively, with a mean value of 100.28% and RSD of 0.74%. The corresponding values obtained for simvastatin were 98.72, 101.16 and 99.03%, respectively, with a mean value of 99.64% and RSD of 1.33% as shown in Table 3, and it is evident that the method is accurate within the desired range.

**TABLE 3**

For the calculation of the LOD and LOQ, the calibration equations for ezetimibe and simvastatin were generated by using the mean values of the three independent calibration curves. The mean of the slope and the standard deviation of the intercept of the independent curves were 67826.8 and 1196.4 for ezetimibe and 93819.3 and 2180.3 for simvastatin, respectively. The values calculated for the LOD and LOQ were 0.05 and 0.18  $\mu\text{g/mL}$  for ezetimibe, and 0.07 and 0.23  $\mu\text{g/mL}$  for simvastatin, respectively. The LOQ evaluated experimentally for each compound, with the precision lower than 5% and accuracy within  $\pm 5\%$ , was found to be for both drugs, 0.5  $\mu\text{g/mL}$ .

The results and the experimental range of the selected variables evaluated in the robustness assessment are given in Table 4, together with the optimized values. The analysis performed testing different columns resulted in changes in the retention time without effect on the determination of the drugs in the pharmaceutical formulations.

**TABLE 4**

The system suitability test was also carried out to evaluate the resolution and reproducibility of the system for the analysis to be performed, using five replicates injections of a standard solution containing 50 µg/mL of ezetimibe and simvastatin. The results given in Table 5, show that the parameters are within the suitable range.

#### **TABLE 5**

The LC method validated in this paper was applied for the determination of ezetimibe and simvastatin in tablet dosage forms, without prior separation of the excipients of the formulation, as shown in Table 6.

#### **TABLE 6**

### **4. Conclusion**

The results of the validation studies show that the LC method is specific, accurate and possesses significant linearity and precision characteristics without any interference from the excipients. Therefore, the proposed method was successfully applied for the simultaneous quantitative analysis of ezetimibe and simvastatin in pharmaceutical dosage forms, contributing to improve the quality control and to assure the therapeutic efficacy of this medicine.

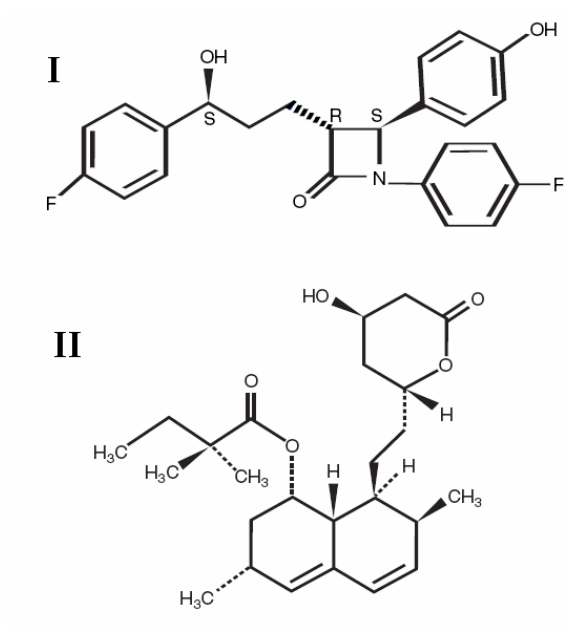
### **Acknowledgments**

The authors wish to thank FAPERGS (Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul) and CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico) for the support.

## References

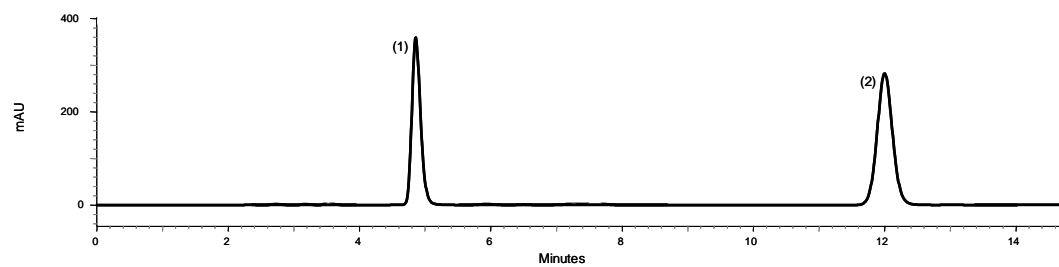
- (1) Catapano, A.L. (2001) *Eur. Heart J. Supplements* **3(Suppl E)**, E6-E10
- (2) Clader, J.W. (2004) *J. Med. Chem.* **47**, 1-9
- (3) Altmann, S.W., Davis Jr, H.R., Zhu, L., Yao, X., Hoos, L.M., Tetzloff, G., Iyer, S.P.N., Maguire, M., Golovko, A., Zeng, M., Wang, L., Murgolo, N., & Graziano, M.P. (2004) *Science* **303**, 1201-1204
- (4) Tobert, J.A. (2003) *Nature Rev. Drug Disc.* **2**, 517-526
- (5) Shitara, Y., & Sugiyama, Y. (2006) *Pharmacol. Ther.* **112**, 71-105
- (6) Kastelein, J.J.P., Sager, P.T., de Groot, E., & Veltri, E. (2005) *Am. Heart J.* **149**, 234-239
- (7) Ballantyne, C.M., Abate, N., Yuan, Z., King, T.R., & Palmisano, J. (2005) *Am. Heart J.* **149**, 464-473
- (8) Sistla, R., Tata, V.S.S.K., Kashyap, Y.V., Chandrasekar, D., & Diwan, P.V. (2005) *J. Pharm. Biomed. Anal.* **39**, 517-522
- (9) Singh, S., Singh, B. Bahuguna, R., Wadhwa, L., & Saxena, R. (2006) *J. Pharm. Biomed. Anal.*, **41**, 1037-1040
- (10) Li, S., Liu, G., Jia, J. Li, X., & Yu, C. (2006) *J. Pharm. Biomed. Anal.* **40**, 987-992

- (11) Oliveira, P.R., Brum Junior, L., Fronza, M., Bernardi, L.S., Masiero, S.M.K., & Dalmora, S.L. (2006) *Chromatographia*, **63**, 315-320
- (12) Oswald, S., Scheuch, E., Cascorbi, I., & Siegmund, W. (2006) *J. Chromatogr. B*, **830**, 143-150
- (13) Ertürk, S., Önal, A., & Çetin, S.M. (2003) *J. Chromatogr. B*, **793**, 193-205
- (14) Álvarez-Lueje, A., Valenzuela, C., Squella, J.A., & Núñez-Vergara, L.J. (2005) *J. AOAC Int.*, **88**, 1631-1636
- (15) Abu-Nameh, E., Shawabkeh, R., & Azzam, A. (2006) *J. Anal. Chem.*, **61**, 63-66
- (16) Srinivasu, M.K., Narasa Raju, A., & Om Reddy, G. (2002) *J. Pharm. Biomed. Anal.* **29**, 715-721
- (17) Wang, L., & Asgharnejad, M. (2000) *J. Pharm. Biomed. Anal.* **21**, 1243-1248
- (18) Validation of Analytical Procedures: Methodology (1996), International Conference on Harmonisation (ICH) of Technical Requirements for the Registration of Pharmaceutical for Human Use
- (19) Yang, D., & Hwang, L.S. (2006) *J. Chromatogr. A*, **1119**, 277-284

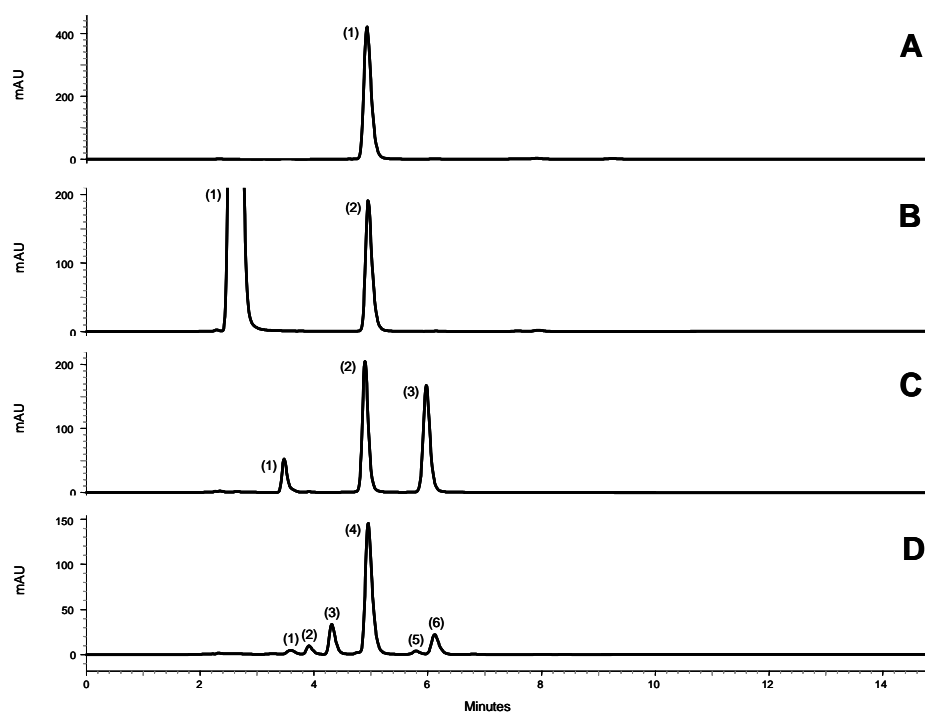


**Figure 1.** Chemical structures of ezetimibe (I) and simvastatin (II).

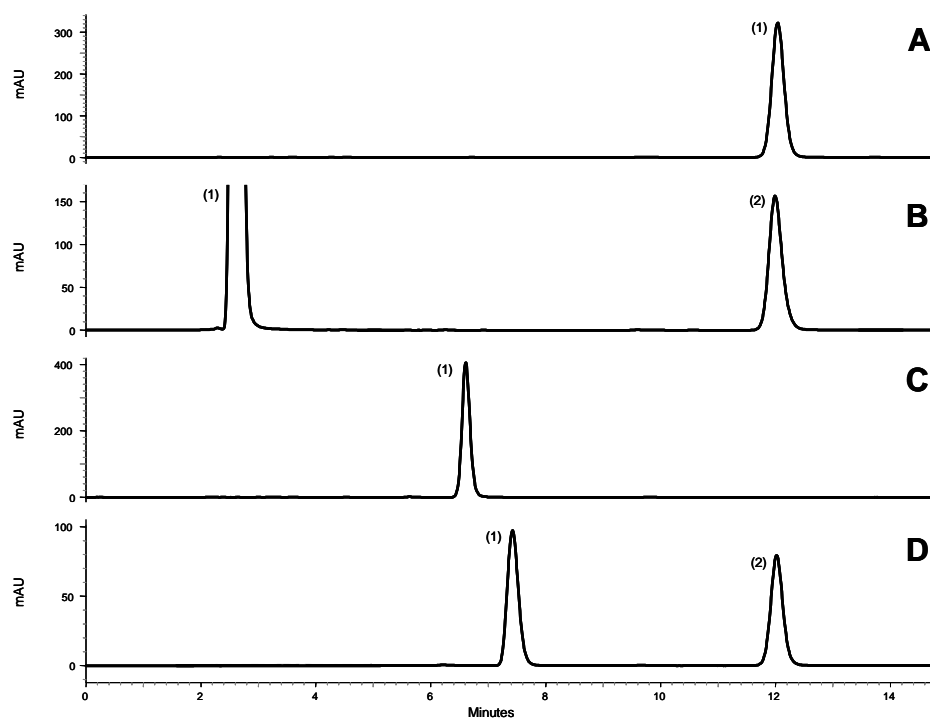




**Figure 2.** Representative LC chromatogram of ezetimibe (1) and simvastatin (2) pharmaceutical formulation (50  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ).



**Figure 3.** LC chromatograms of ezetimibe. (A) Ezetimibe pharmaceutical formulation (50  $\mu\text{g/mL}$ ): peak 1 - ezetimibe. (B) After oxidation: peak 1 - hydrogen peroxide, peak 2 - ezetimibe. (C) After basic hydrolysis: peaks 1 and 3 – degraded forms, peak 2 – ezetimibe. (D) After acidic hydrolysis: peaks 1, 2, 3, 5 and 6 – degraded forms, peak 4 - ezetimibe.



**Figure 4.** LC chromatograms of simvastatin. (A) Simvastatin pharmaceutical formulation (50  $\mu\text{g/mL}$ ): peak 1 - simvastatin. (B) After oxidation: peak 1 - hydrogen peroxide, peak 2 - simvastatin. (C) After basic hydrolysis: peak 1 – degraded form. (D) After acidic hydrolysis: peak 1 – degraded form, peak 2 - simvastatin.

**Table 1.** Inter-day precision data of LC for ezetimibe and simvastatin in samples of pharmaceutical formulation.

Sample	Drug	Day	Recovery <sup>a</sup> (%)	Mean <sup>b</sup>	RSD <sup>c</sup> (%)
1	Ezetimibe	1	101.19	101.31	0.85
		2	102.22		
		3	100.52		
	Simvastatin	1	99.72	100.21	0.76
		2	101.08		
		3	99.82		
2	Ezetimibe	1	99.86	99.07	0.71
		2	98.84		
		3	98.51		
	Simvastatin	1	99.02	99.09	0.06
		2	99.09		
		3	99.15		

<sup>a</sup> Mean of three replicates

<sup>b</sup> Mean of three days

<sup>c</sup> RSD = Relative standard deviation

**Table 2.** Between-analysts precision data of LC for ezetimibe and simvastatin in samples of pharmaceutical formulation.

Sample	Drug	Analyst	Recovery <sup>a</sup> (%)	Mean <sup>b</sup>	RSD <sup>c</sup> (%)
1	Ezetimibe	A	101.31	101.06	0.49
		B	100.48		
		C	101.38		
	Simvastatin	A	100.56	100.12	0.98
		B	99.00		
		C	100.81		
2	Ezetimibe	A	100.23	100.39	0.44
		B	100.89		
		C	100.05		
	Simvastatin	A	99.46	99.75	0.42
		B	100.23		
		C	99.57		

<sup>a</sup> Mean of three replicates

<sup>b</sup> Mean of three analysts

<sup>c</sup> RSD = Relative standard deviation

**Table 3.** Accuracy of LC for ezetimibe and simvastatin in samples of pharmaceutical formulation.

Drug	Nominal Concentration ( $\mu\text{g/mL}$ )	Mean concentration found <sup>a</sup> ( $\mu\text{g/mL}$ )	RSD <sup>b</sup> (%)	Accuracy (%)
Ezetimibe	40	39.92	0.12	99.79
	50	50.56	0.32	101.13
	60	59.95	0.09	99.91
Simvastatin	40	39.49	0.41	98.72
	50	50.58	0.03	101.16
	60	59.42	0.05	99.03

<sup>a</sup> Mean of three replicates

<sup>b</sup> RSD = Relative standard deviation

**Table 4.** Chromatographic conditions and range investigated during robustness testing.

Variable	Range investigated	Ezetimibe <sup>a</sup> %	Simvastatin <sup>a</sup> %	Optimized value
Flow rate (mL/min)	0.5	101.65	99.25	0.6
	0.6	100.75	99.48	
	0.8	101.43	99.04	
Column temperature (°C)	40	100.73	98.54	45
	45	100.42	98.62	
	50	100.67	98.06	
Injection volume (µL)	10	99.05	100.85	20
	20	99.30	100.19	
	30	99.19	100.48	
Solution stability	Autosampler 24h	99.81	99.20	---
Percent acetonitrile	60	101.50	98.85	65
	65	100.75	98.95	
	70	101.03	98.36	
Mobile phase pH	4.2	101.04	99.38	4.5
	4.5	100.72	99.98	
	4.8	101.18	100.37	

<sup>a</sup>Mean of three replicates

**Table 5.** Results of the system suitability test.

Parameter	Ezetimibe <sup>a</sup>				Simvastatin <sup>a</sup>			
	Minimum	Maximum	RSD (%)	Status	Minimum	Maximum	RSD (%)	Status
Asymmetry	1.10	1.13	0.38	Passed	1.03	1.04	0.25	Passed
Theoretical plates	6174	6355	1.11	Passed	11671	11843	0.56	Passed
Retention time	4.823	4.828	0.05	Passed	11.892	11.909	0.06	Passed
Area	678957	683443	0.24	Passed	905432	907749	0.10	Passed

<sup>a</sup> Values from five replicates



**Table 6.** Determination of ezetimibe and simvastatin in pharmaceutical dosage forms by the LC method.

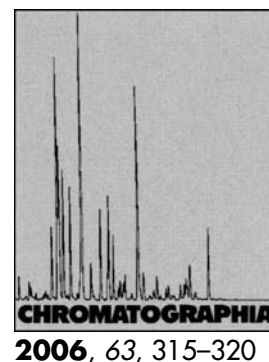
Sample	Theoretical amount		Experimental amount					
	Ezetimibe mg per tablet	Simvastatin mg per tablet	Ezetimibe <sup>a</sup> mg	Ezetimibe <sup>a</sup> %		Simvastatin <sup>a</sup> mg		Simvastatin <sup>a</sup> %
					RSD <sup>b</sup> (%)			RSD <sup>b</sup> (%)
1	10	10	10.08	100.84	0.22	9.85	98.53	0.19
2	10	10	10.26	102.64	0.09	9.77	97.69	0.10
3	10	20	10.49	104.86	0.28	20.04	100.18	0.44
4	10	20	10.15	101.51	0.12	19.22	96.08	0.16
5	10	40	10.32	103.18	0.15	39.43	98.58	0.06
6	10	40	10.44	104.41	0.06	39.89	99.72	0.19

<sup>a</sup> Mean of three replicates

<sup>b</sup> RSD = Relative standard deviation

3.2 – OLIVEIRA, P. R.; BRUM JUNIOR, L.; FRONZA, M.; BERNARDI, L. S.; MASIERO, S. M. K.; DALMORA, S. L. Development and validation of a liquid chromatography-tandem mass spectrometry method for the determination of ezetimibe in human plasma and pharmaceutical formulations. **Chromatographia**, v. 63, p. 315-320, 2006.

# Development and Validation of a Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry Method for the Determination of Ezetimibe in Human Plasma and Pharmaceutical Formulations



P. R. Oliveira<sup>2</sup>, L. Brum Junior<sup>2</sup>, M. Fronza<sup>2</sup>, L. S. Bernardi<sup>1</sup>, S. M. K. Masiero<sup>2</sup>, S. L. Dalmora<sup>1</sup>✉

<sup>1</sup> Department of Industrial Pharmacy, Federal University of Santa Maria, 97.105-900, Santa Maria-RS, Brazil; E-Mail: sdalmora@ccs.ufsm.br

<sup>2</sup> Postgraduate Program in Pharmaceutical Sciences, Health Science Centre, Federal University of Santa Maria, 97.105-900, Santa Maria-RS, Brazil

Received: 23 September 2005 / Revised: 4 January and 3 February 2006 / Accepted: 14 February 2006  
Online publication: 23 March 2006

## Abstract

An analytical method based on liquid chromatography-tandem mass spectrometry (LC-MS-MS) was developed and validated for the determination of ezetimibe in human plasma. Ezetimibe and etoricoxib (internal standard) were extracted from the plasma by liquid-liquid extraction and separated on a C<sub>18</sub> analytical column (50 × 3.0 mm I.D.) with acetonitrile:water (85:15, v/v) as mobile phase. Detection was carried out by positive electrospray ionization (ESI+) in multiple reaction monitoring (MRM) mode. The chromatographic separation was obtained within 2.0 min and was linear in the concentration range of 0.25–20 ng mL<sup>-1</sup> for free ezetimibe and of 1–300 ng mL<sup>-1</sup> for total ezetimibe. The mean extraction recoveries for free and total ezetimibe from plasma were 96.14 and 64.11%, respectively. Method validation investigated parameters such as linearity, precision, accuracy, specificity and stability, giving results within the acceptable range. The proposed method was successfully applied to the quantitation of ezetimibe and its glucuronide in human plasma to support clinical and pharmacokinetic studies. Moreover, the method was used for the quality control analysis of pharmaceutical dosage forms.

## Keywords

Column liquid chromatography-mass spectrometry – MS  
Liquid-liquid extraction  
Ezetimibe in human plasma  
Method validation

## Introduction

Ezetimibe, (1-(4-fluorophenyl)-(3*R*)-[3-(4-fluorophenyl)-(3*S*)-hydroxypropyl]-(4*S*)-(4-hydroxyphenyl)-2-azetidinone), is the first of a new class of compounds, the 2-azetidinones, that selectively and potently inhibits the absorption of biliary and dietary cholesterol and related plant sterols from the small intestine without affecting the absorption of fat-soluble vitamins, triglycerides or bile acids. Ezetimibe is an

effective option for treating patients with primary hypercholesterolemia, reducing the risk of coronary heart disease [1, 2].

After oral administration, ezetimibe is rapidly absorbed and extensively metabolized to an active glucuronidated metabolite in the intestine and has a half-life ( $t_{1/2}$ ) of approximately 22 h. Following single-dose and multiple-dose administration the medium maximum concentration ( $C_{max}$ ) were 85 and 122 ng mL<sup>-1</sup>, respectively, reached 1 h after dosing ( $t_{max}$ ). Ezetimibe

and its glucuronide undergo enterohepatic recirculation, resulting in multiple peaks in the plasma concentration-time profile [3, 4].

An RP-HPLC method was developed and validated over the concentration range of 0.5–50 µg mL<sup>-1</sup> and applied for the quantitation of ezetimibe in pharmaceutical dosage forms [5]. The LC coupled to MS detection has been published for both the identification and quantification of drugs at low concentrations in raw materials, in various pharmaceutical formulations and biological fluids [6, 7]. There is no validated method published for the evaluation of ezetimibe in human plasma. Therefore, the aim of the present work was to develop and validate a simple, fast, precise and accurate LC-MS-MS method, using a liquid-liquid extraction, for the analysis of free and total ezetimibe in human plasma, supporting pharmacokinetic and clinical studies and demonstrating the applicability of the method for the potency assessment of ezetimibe in pharmaceutical dosage forms.

## Experimental

### Chemical and Reagents

Ezetimibe was purchased from Sequoia Research Products (Oxford, UK). Etoricoxib (internal standard, IS) was generously supplied by Merck Research Laboratories (Rahway, USA). A total of three batches of Ezetrol® (Merck Sharp

& Dohme, Haar, Germany) tablets containing 10 mg of ezetimibe were obtained from commercial sources within their shelf life period.  $\beta$ -glucuronidase was purchased from Sigma-Aldrich (Germany). HPLC-grade acetonitrile and tert-butyl methyl ether were obtained from Tedia (Fairfield, USA). All chemicals used were of pharmaceutical or special analytical grade. For all the analyses, ultrapure water (Labconco, Kansas City, USA) filtered through a 0.22  $\mu\text{m}$  membrane filter was used.

## Apparatus and Chromatographic Conditions

The LC-MS-MS method was performed on a Shimadzu LC system (Shimadzu, Kyoto, Japan) equipped with a SCL-10A<sub>VP</sub> system controller, LC-10 AD<sub>VP</sub> pump, DGU-14A degasser, CTO-10 AD<sub>VP</sub> column oven and SPD-M10A<sub>VP</sub> photodiode array (PDA) detector. A triathlon autosampler (Spark, Emmen, The Netherlands) was used. The experiments were carried out on a reversed phase Phenomenex (Torrance, USA) Luna C<sub>18</sub> column (50 mm  $\times$  3.0 mm I.D., with a particle size of 3  $\mu\text{m}$  and pore size of 100  $\text{\AA}$ ). The LC system was operated isocratically using a mobile phase of acetonitrile:water (85:15, *v/v*). This was filtered through a 0.45  $\mu\text{m}$  membrane filter (Millipore, Bedford, MA, USA) and run at a flow-rate of 0.4 mL min<sup>-1</sup>. The injection volume was 50  $\mu\text{L}$  for both standard and samples. The triple quadrupole mass spectrometer (Waters, Milford, MA, USA), model Quattro LC, equipped with an electrospray source using a crossflow counter electrode run in positive mode (ESI+), was set up in multiple reaction monitoring (MRM) mode, monitoring the transitions 392 > 161 and 359.3 > 280, for ezetimibe and IS, respectively. For the mass spectrometer conditions optimization, a mixed standard solution (1000 ng mL<sup>-1</sup>) containing ezetimibe and IS was directly introduced and the following parameters were selected: nebuliser gas (nitrogen), cone gas and desolvation gas set at 80, 50 and 480 L h<sup>-1</sup>, respectively. Capillary voltage, extractor voltage, RF lens voltage and source temperature were 3.0 kV, 4 V, 0.3 V and 120 °C, respectively. The dwell time was set at 0.5 seconds, the collision gas pressure (argon) was 2.3 $\times$ 10<sup>-3</sup> mbar. The collision energy was

25 and 30 eV for ezetimibe and IS, respectively, and the cone voltage was 30 V. Data acquisition and analysis were performed using the software Masslynx (v 3.5) running under Windows 2000 on a workstation Compaq PC.

The LC method applied for the analysis of ezetimibe in pharmaceutical dosage forms was carried out on a reversed phase Phenomenex Synergi fusion C<sub>18</sub> column (150 mm  $\times$  4.6 mm I.D., with a particle size of 4  $\mu\text{m}$  and pore size of 80  $\text{\AA}$ ). A security guard holder (4.0 mm  $\times$  3.0 mm I.D.) was used to protect the analytical column. The Shimadzu HPLC system was operated isocratically at 40 °C using a mobile phase of 0.02 M phosphate buffer (pH 7.0)/acetonitrile/methanol (40:55:5, *v/v/v*), run at a flow-rate of 1.0 mL min<sup>-1</sup> using photodiode array (PDA) detection at 232 nm. The injection volume was 20  $\mu\text{L}$  of a solution containing 50  $\mu\text{g mL}^{-1}$  for both standard and samples.

## Standard Solutions and Calibration Curves

The stock solution of ezetimibe was prepared by weighing 10 mg of reference material into a 10 mL volumetric flask and diluting to volume with acetonitrile, obtaining a concentration of 1 mg mL<sup>-1</sup>. Etoricoxib stock solution was also made at a final concentration of 1 mg mL<sup>-1</sup> using acetonitrile. The prepared stock solutions were stored at 2–8 °C protected from light. An appropriate aliquot of ezetimibe stock solution was diluted with acetonitrile to obtain the calibration standards solutions with the concentrations of 1000, 100, 10 and 1 ng mL<sup>-1</sup>. The corresponding volume taken of the standard solutions were evaporated under nitrogen stream while immersed in a 40 °C water bath and the residues were reconstituted in 0.5 and 0.2 mL of blank plasma for free and total ezetimibe, respectively, to prepare the calibration standards containing from 1 to 300 ng mL<sup>-1</sup> (1, 10, 20, 50, 100, 200, and 300 ng mL<sup>-1</sup>) for total ezetimibe and from 0.25 to 20 ng mL<sup>-1</sup> (0.25, 0.5, 1, 2, 5, 10 and 20 ng mL<sup>-1</sup>) for free ezetimibe. The quality control (QC) samples were prepared in pooled plasma, with the concentrations of 5 (low), 150 (medium) and 250 ng mL<sup>-1</sup> (high) for total ezetimibe and of 0.75 (low), 7 (medium) and 16 ng mL<sup>-1</sup> (high) for free ezetimibe,

and then divided in aliquots that were stored at -80 °C until analysis.

## Plasma Extraction

For the analysis of free ezetimibe, a total of 500  $\mu\text{L}$  of the spiked plasma was transferred to a 15 mL glass tube, followed by addition of 50  $\mu\text{L}$  of IS solution (200 ng mL<sup>-1</sup> of etoricoxib in acetonitrile). All samples were mixed by vortex agitation for 30 s. Then, a 4 mL aliquot of extraction solvent, tert-butyl methyl ether, was added using Dispensette Organic (Brand GmbH, Wertheim, Germany) and vortex-mixed for 90 s. For the analysis of total ezetimibe (free ezetimibe and its glucuronide metabolite after hydrolysis), 200  $\mu\text{L}$  of plasma sample and 20  $\mu\text{L}$  of internal standard were transferred to a 15 mL tube. Then 500  $\mu\text{L}$  of sodium acetate buffer (0.5 M, pH 5.0) and 50  $\mu\text{L}$  of  $\beta$ -glucuronidase (100,000 units mL<sup>-1</sup>) were added into the tube. After vortexing for 30 s, the tube was incubated at 50 °C for 60 min and 500  $\mu\text{L}$  of sodium borate solution (0.1 M) was added. Then, the mixture was extracted with 3 mL of tert-butyl methyl ether for 90 s by vortex agitation. From this step on, the samples for free and total ezetimibe analyses were prepared under the same conditions. The tubes were centrifuged for 10 min at 3000 rpm and the organic layer was filtered through a Millex GV 0.45  $\mu\text{m}$  filter unit (Millipore, Bedford, MA, USA) into 15 mL conical tubes and evaporated under nitrogen stream while immersed in a 40 °C water bath. The samples for free and total ezetimibe were reconstituted with 500  $\mu\text{L}$  and 200  $\mu\text{L}$ , respectively, with acetonitrile:water (80:20, *v/v*). The samples were transferred to autosampler vials and 50  $\mu\text{L}$  was injected into the LC-MS-MS system.

## Validation of the Bioanalytical Method

The method was validated by the determination of the following parameters: specificity, linearity, range, recovery, accuracy, precision, lower limit of quantitation (LLOQ) and stability studies. To evaluate the matrix effects three replicates of low, medium and high quality control samples were spiked, each one, with six samples of blank human plasma from

different sources. The mean peak areas of each quality control were compared to the mean peak areas of the neat standard (ezetimibe and IS dried and reconstituted in acetonitrile:water, 80:20, v/v) at the same concentrations.

Specificity was assessed using six blank human plasma samples, randomly selected, from different sources (including haemolysed and lipemic plasma), that were subjected to the extraction procedure and chromatographed to determine the extent to which endogenous plasma components could interfere in the analysis of ezetimibe or the internal standard. The results were compared to a solution containing 1 ng mL<sup>-1</sup> of ezetimibe.

The calibration curves were constructed from a blank sample (plasma sample processed without IS), a zero sample (plasma processed with IS) and seven concentrations of ezetimibe, including the LLOQ, ranging from 1 to 300 ng mL<sup>-1</sup> for total ezetimibe and from 0.25 to 20 ng mL<sup>-1</sup> for free ezetimibe. The peak area ratio of the drug to the IS against the respective standard concentrations was used for plotting the graph and the linearity evaluated by a weighed (1/x) least square regression analysis. The acceptance criteria for each calculated standard concentration was not more than 15% deviation from the nominal value, except for the LLOQ which was set at 20%.

The recovery was evaluated by the mean of the response of three concentrations of ezetimibe (5, 150 and 250 ng mL<sup>-1</sup> for free and 0.75, 7 and 16 ng mL<sup>-1</sup> for total), each one added of 20 ng mL<sup>-1</sup> of the IS, dividing the mean of the extracted sample by the mean of the unextracted sample (spiked with the extracted blank plasma residues) at the same concentration level. To eliminate the matrix effects, a comparison of the extracted to the unextracted sample was performed, giving the true recovery.

To evaluate the inter-day precision and accuracy, QC samples were analysed together with one independent calibration standard curve for 3 days, while intra-day precision and accuracy were evaluated through analysis of the QC samples in six replicates in the same day. Inter- and intra-day precision were expressed as relative standard deviation (RSD).

The evaluation of precision and accuracy was based on the criteria [8] that the RSD of each concentration level should be within  $\pm 15\%$  of the nominal

concentration, except for the LLOQ, for which it should be within  $\pm 20\%$ .

The lowest standard concentration on the calibration curve should be accepted as the limit of quantification if the following conditions are met: the analyte response at the LLOQ should be at least five times the response compared to blank response and analyte peak (response) should be identifiable, discrete and reproducible with a precision of 20% and accuracy of 80–120%. The limit of detection (LOD) was defined by the concentration with a signal-to-noise ratio of 3.

The stability of total and free ezetimibe in human plasma was evaluated after each storage period and related to the initial concentration as zero cycle (samples that were freshly prepared and processed immediately). The samples were considered stable if the deviation (expressed as percentage bias) from the zero cycle was within  $\pm 15\%$ . The freeze-thaw stability of ezetimibe was determined at low, medium and high QC samples ( $n=3$ ) over three freeze-thaw cycles within 3 days. In each cycle, the frozen plasma samples were thawed at room temperature for 2 h and refrozen for 24 h. After completion of each cycle the samples were analyzed and the results compared with that of zero cycle. The short-term stability was evaluated using three aliquots each of the low, medium and high unprocessed QC samples kept at room temperature ( $25 \pm 5$  °C) for 6 h, and then analysed. For the processed sample stability, three aliquots each one of the low, medium and high QC samples were processed and placed into the autosampler at room temperature and analysed after 24 h. For the long-term stability analysis of total ezetimibe, three aliquots of each QC samples were frozen at  $-80$  °C for 40 days and then analysed.

The variability of the glucuronide hydrolysis process was assessed carrying out six independent analyses of real plasma samples containing low, medium and high ezetimibe-glucuronide concentration. The precision data were expressed as relative standard deviation (RSD).

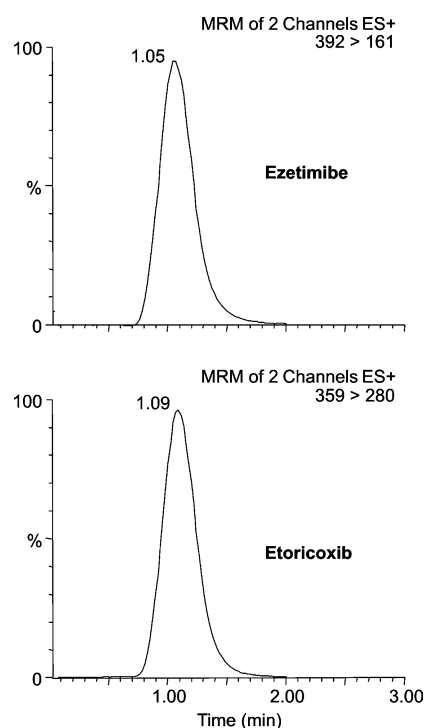
### Analysis of Pharmaceutical Tablet Dosage Forms

To construct the calibration curve, calibration standards were added with

50  $\mu$ L of IS (200 ng mL<sup>-1</sup> of etoricoxib in acetonitrile) and the volume made up 0.5 mL with acetonitrile:water (80:20, v/v) to get the linearity range of 1 to 300 ng mL<sup>-1</sup>. An aliquot of 50  $\mu$ L of these solutions was injected for the analysis and the peak area ratio of the drug to the IS was considered for plotting the linearity graph. For the quantitation in the dosage forms, twenty tablets of each sample containing 10 mg of ezetimibe were separated, accurately weighed and crushed to a fine powder. An appropriate amount of each concentration was transferred into an individual 50 mL volumetric flask, diluted to volume with acetonitrile and sonicated for 20 min, obtaining the concentration of 1 mg mL<sup>-1</sup> (stock solution). Working sample solutions were prepared daily and were added 50  $\mu$ L of IS and the volume made up 0.5 mL with acetonitrile:water (80:20, v/v) to get 150 ng mL<sup>-1</sup> of ezetimibe. An aliquot of 50  $\mu$ L was injected for the analysis and the amount of ezetimibe per tablet calculated from the linear regression equation.

## Results and Discussion

To obtain the best chromatographic conditions different columns and mobile phases consisting of acetonitrile-water or methanol-water were tested to provide sufficient selectivity and sensitivity in a short separation time. Modifiers such as formic acid, acetic acid and ammonium acetate were tested. The best signal was achieved using acetonitrile:water (85:15, v/v) with a flow rate of 0.4 mL min<sup>-1</sup> in a C<sub>18</sub> analytical column. The low flow-rate and the short run time resulted, comparatively, in lower consume of the mobile phase solvents with a better cost-effective relation. The protonated molecular ions [M + H]<sup>+</sup> of ezetimibe and IS observed on the full scan mass spectra were  $m/z$  392 and 359.3, respectively. Moreover, the collision energy in Q2 produced significant fragments, such as 133, 145 and 161 for ezetimibe. The MS-MS transition 392 > 161 and 359.3 > 280 were selected since the ion scan product with  $m/z$  161 and 280 presented a higher abundance and stability for ezetimibe and IS, respectively. The coupling of LC with MS-MS detection in the MRM mode showed high specificity because only the ions



**Fig. 1.** Representative LC-MS-MS chromatogram of low QC plasma sample containing ezetimibe (5 ng mL<sup>-1</sup>) and IS (20 ng mL<sup>-1</sup>)

derived from the analytes of interest were monitored.

Matrix effects and the possible ionization suppression or enhancement of ezetimibe and internal standard were examined. The relative standard deviation of the mean peak areas of free and

total ezetimibe and IS were <5.50%, indicating low difference in ionization efficiency using different plasma samples. The results for both free and total ezetimibe, and IS were higher than 93.26%, suggesting that the ion suppression by endogenous components was not interfering in the repeatability of the method.

Linearity was evaluated by six determinations of seven concentrations in the range of 1–300 ng mL<sup>-1</sup> for total ezetimibe and of 0.25 to 20 ng mL<sup>-1</sup> for free ezetimibe. The values of the determination coefficient ( $r^2=0.9946$ ,  $y=0.007175 + 0.007075x$ ) and ( $r^2=0.9949$ ,  $y=0.071740 + 0.004388x$ ) for free and total ezetimibe, respectively, indicated significant linearity of the calibration curves for the method. The LLOQ was evaluated in an experimental assay and was found to be 1 and 0.25 ng mL<sup>-1</sup> with precision of 7.81 and 8.43% and accuracy of 104.91 and 107.67% for total and free ezetimibe, respectively, and the LOD was found to be 0.1 ng mL<sup>-1</sup>. Comparison of the blank and spiked human plasma (1 ng mL<sup>-1</sup>) chromatograms indicated that no significant interferences were detected from endogenous substances. A typical chromatogram obtained by the proposed LC-MS-MS method is shown in Fig. 1. The low retention times of 1.05 and 1.09 min allow rapid determination of the drug, which is an important advantage.

Free ezetimibe in human plasma was directly extracted with tert-butyl methyl ether by liquid-liquid extraction, whereas total ezetimibe was hydrolyzed by  $\beta$ -glucuronidase before extraction, due to the ezetimibe-glucuronide conjugation. The mean extraction recoveries for the three concentration levels of the QC samples were 96.14% for free ezetimibe and 93.97% for IS. The corresponding values obtained for the total ezetimibe and IS were 64.11 and 83.96%, respectively, showing the method suitability (Table 1).

For the extraction, different organic solvents and mixtures were also evaluated, including ethyl acetate, diethyl ether and dichloromethane and tested different pH values, adjusted by the addition of formic acid or sodium hydroxide or buffer phosphate, but the recoveries obtained were lower than 81.32% for free ezetimibe and 50.25% for total ezetimibe.

The intra-day accuracy of the method was within 97.63 and 104.24% with a precision of 1.49–7.22% for free ezetimibe and within 97.00 and 102.85% with a precision of 6.04–9.15% for total ezetimibe (Table 2). The inter-day accuracy was within 99.29 and 104.00% with RSD of 3.30–6.32% for free ezetimibe and within 97.53 and 100.88% with RSD of 5.03–7.56% for total ezetimibe (Table 3). The data show that the method possesses adequate repeatability and reproducibility.

As shown in Table 4, total and free ezetimibe were stable in neat plasma for up to 6 h at room temperature (short-term) and also after three freeze-thaw cycles, demonstrating that human plasma samples could be thawed and refrozen without compromising the integrity of the samples. Plasma samples of total ezetimibe were stable for at least 40 days at –80 °C (long-term). The results demonstrated that extracted samples could be analysed after keeping in the autosampler for at least 24 h with acceptable precision and accuracy.

The glucuronide hydrolysis efficiency was investigated by the analysis of six replicates of plasma samples containing known concentrations (1.28, 33.35 and 70.62 ng mL<sup>-1</sup>) of total ezetimibe. The RSDs of samples in the hydrolysis step were 1.26, 3.02 and 4.38% for the low, medium and high concentrations, respectively. The results indicated that the hydrolysis with  $\beta$ -glucuronidase was reproducible.

**Table 1.** Recovery of ezetimibe and etoricoxib from human plasma after the extraction procedures

Ezetimibe	Nominal concentration (ng mL <sup>-1</sup> )	% Recovery (mean $\pm$ RSD%)	
		Ezetimibe <sup>a</sup>	Etoricoxib <sup>a</sup>
Free	0.75	96.79 $\pm$ 8.17	93.87 $\pm$ 8.36
	7	97.07 $\pm$ 5.54	93.31 $\pm$ 6.42
	16	94.57 $\pm$ 6.45	94.73 $\pm$ 2.15
	5	65.35 $\pm$ 6.72	82.75 $\pm$ 6.47
Total	150	64.85 $\pm$ 5.67	85.54 $\pm$ 4.42
	250	62.13 $\pm$ 3.76	83.59 $\pm$ 7.68

<sup>a</sup> Mean of six replicates

**Table 2.** Intra-day precision and accuracy for the determination of ezetimibe in human plasma

Ezetimibe	Nominal concentration (ng mL <sup>-1</sup> )	Mean concentration found (ng mL <sup>-1</sup> ) <sup>a</sup>	RSD (%)	Accuracy (%)
Free	0.75	0.78	7.22	104.24
	7	6.83	4.61	97.63
	16	16.38	1.49	102.40
	5	4.85	6.04	97.00
Total	150	154.28	7.73	102.85
	250	253.41	9.15	101.36

<sup>a</sup> Mean of six replicates

## Method Application

The method was successfully applied for the determination of free and total ezetimibe in human plasma for 5 half lives, after a single oral dosing of ezetimibe (10 mg) to 6 healthy human male volunteers and the plasma concentration-time profile is shown in Fig. 2.  $C_{max}$  of free and total ezetimibe was found to be 7.04 and 70.20 ng mL<sup>-1</sup>, respectively.  $T_{max}$  of both compounds was reached 1 h after oral administration. The multiple peaks exhibited in the plasma concentration-time profile are related to the enterohepatic recirculation of ezetimibe and its glucuronide metabolite.

The LC-MS-MS method validated in this paper was also used for the potency evaluation of ezetimibe in tablet dosage forms as shown in Table 5, together with the results obtained from the analysis of the pharmaceutical formulations carried out by the LC method, previously validated in the laboratory (data not shown). The experimental values obtained from the two methods were compared statistically by the Student's *t*-test showing non-significant difference ( $P > 0.05$ ). The proposed method can be used for the determination of ezetimibe without prior separation of the excipients of the formulation, representing also an improvement for the quality control of pharmaceuticals as the technique is highly selective and sensitive.

## Conclusion

A simple, fast and accurate LC-MS-MS method, with a single step liquid-liquid extraction procedure, has been developed and validated for the determination of ezetimibe in human plasma and pharmaceutical formulations. The short run time and the relatively low flow-rate allows the analysis of a large number of samples with less mobile phase consume, proving the method to be cost-effective. The results of the validation studies show that the optimized LC-MS-MS method possesses specificity, linearity, precision and accuracy over the entire range of significant therapeutic plasma concentrations. The proposed method was successfully applied to a pharmacokinetic study in healthy human volunteers and for the quantitative analysis of ezetimibe in pharmaceutical dosage forms.

**Table 3.** Inter-day precision and accuracy for the determination of ezetimibe in human plasma

Ezetimibe	Nominal concentration (ng mL <sup>-1</sup> )	Day	Mean concentration found (ng mL <sup>-1</sup> ) <sup>a</sup>	Mean <sup>b</sup>	RSD (%)	Accuracy (%)
Free	0.75	1	0.77	0.78	6.32	104.00
		2	0.76			
		3	0.82			
	7	1	6.89	6.95	3.98	99.29
		2	7.03			
		3	6.93			
	16	1	16.38	16.15	3.30	100.94
		2	15.57			
		3	16.51			
5	1	4.74	4.88	7.56	97.60	
	2	4.83				
	3	5.06				
Total	150	1	151.69	151.32	5.03	100.88
		2	153.91			
		3	148.36			
	250	1	235.72	243.95	7.11	97.58
		2	252.96			
		3	243.17			

<sup>a</sup> Mean of five replicates

<sup>b</sup> Mean of three days

**Table 4.** Summary of stability of ezetimibe in human plasma

Stability	Zero cycle concentration (ng mL <sup>-1</sup> ) <sup>a</sup>	Concentration found after storage (ng mL <sup>-1</sup> ) <sup>a</sup>	RSD (%)	Bias <sup>b</sup> (%)
<b>Total Ezetimibe</b>				
Long term	4.97	5.05	5.52	1.61
	154.83	151.73	8.41	-2.00
	249.87	245.16	6.19	-1.88
Short term	4.97	5.34	2.76	7.44
	154.83	146.71	5.11	-5.24
	249.87	258.03	7.15	3.27
Autosampler 24 h	4.97	5.07	9.76	2.01
	154.83	147.60	5.09	-4.67
	249.87	242.22	4.37	-3.06
Three freeze-thaw cycles	4.97	5.32	6.08	7.04
	154.83	137.22	3.29	-11.37
	249.87	233.68	7.51	-6.48
<b>Free Ezetimibe</b>				
Short term	0.78	0.82	8.12	5.13
	6.82	7.05	4.22	3.37
	16.42	15.91	5.01	-3.11
Autosampler 24 h	0.78	0.84	7.87	7.69
	6.82	6.43	3.16	-5.72
	16.42	17.47	4.66	6.39
Three freeze-thaw cycles	0.78	0.72	9.08	-7.69
	6.82	6.97	5.11	2.20
	16.42	15.03	2.32	-8.47

<sup>a</sup> Mean of three replicates

<sup>b</sup> Bias = (measured concentration - nominal concentration / nominal concentration) × 100

**Table 5.** Determination of ezetimibe in pharmaceutical dosage forms by the LC and LC-MS-MS methods

Theoretical amount	mg per tablet	Experimental amount <sup>a</sup>					
		LC <sup>b</sup>			LC-MS-MS <sup>b</sup>		
Sample	mg per tablet	mg	%	RSD (%)	mg	%	RSD (%)
1	10	10.12	101.23	0.19	10.22	102.17	0.56
2	10	10.33	103.33	0.25	10.39	103.91	0.94
3	10	9.95	99.46	0.40	10.08	100.83	0.76

<sup>a</sup> Non-significant ( $P > 0.05$ )

<sup>b</sup> Mean of three determinations

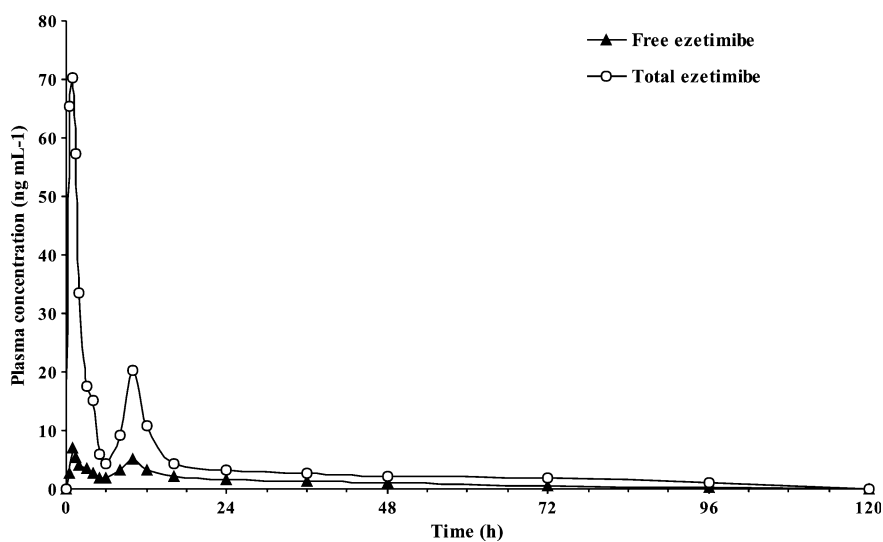


Fig. 2. Mean plasma concentrations after a single 10 mg oral dose administration of ezetimibe to six healthy human volunteers

## Acknowledgments

The authors wish to thank CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento

Científico e Tecnológico) and CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior) for the support.

## References

1. Catapano AL (2001) *Eur Heart J Supplements* 3(Suppl E):E6–E10
2. Clader JW (2004) *J Med Chem* 47:1–9
3. Ezzet F, Krishna G, Wexler DB, Statkevich P, Kosoglou T, Batra VK (2001) *Clin Ther* 23:871–885
4. Davis HR (2004) *International Congress Series* 1262:243–246
5. Sistla R, Tata VSSK, Kashyap YV, Chandrasekar D, Diwan PV (2005) *J Pharm Biomed Anal* 39:517–522
6. Lee H (2005) *J Liq Chrom Rel Tech* 28:1161–1202
7. Trivedi RK, Kallem RR, Mullangi R, Srinivas NR (2005) *J Pharm Biomed Anal* 39:661–669
8. *Guidance for Industry: Bioanalytical Method Validation*, US Department of Health and Human Services, Food and Drug Administration, Center for Drug Evaluation and Research, Rockville, MD, 2001



## **DISCUSSÃO**

---

## 4 DISCUSSÃO

---

Os métodos analíticos são fundamentais para a identificação, quantificação, estudos de dissolução e análises de amostras em matrizes biológicas. Nesse contexto, observa-se que a ezetimiba é um produto farmacêutico de lançamento relativamente recente no mercado mundial, e encontram-se poucas publicações sobre métodos para sua análise quantitativa em amostras biológicas e em formulações farmacêuticas.

Observa-se que a discussão apresentada a seguir baseia-se nos dois artigos já publicados, referenciados adequadamente, no texto correspondente.

A cromatografia líquida possibilita a separação e quantificação de diferentes componentes de uma formulação farmacêutica através da escolha adequada dos parâmetros do sistema como colunas, fase móvel e método de detecção. Desenvolveu-se e validou-se procedimento para a determinação simultânea de ezetimiba e sinvastatina em formulações farmacêuticas, conforme demonstrado no **ARTIGO 3.1**. Na avaliação da especificidade obtiveram-se cromatogramas nos quais os picos dos produtos de degradação encontraram-se resolvidos em relação aos picos dos padrões (figuras 3 e 4). Além disso, utilizando o detector de arranjo de diodos, verificou-se que as substâncias químicas de referência permaneceram com elevada pureza em todas as determinações, demonstrando a especificidade e que o procedimento também pode ser usado para avaliação da estabilidade. O método apresentou-se linear na faixa de 0,5-200 µg/mL ( $r^2 = 0,9999$ ) para ambos os compostos. Os dados obtidos para a repetibilidade e precisão intermediária apresentaram coeficientes de variação inferiores a 0,98% (tabelas 1 e 2), o que mostra a precisão do método proposto, destacando-se que a literatura preconiza coeficiente de variação menor ou igual a 2%. O valor médio experimental do teste de exatidão foi de 100,28%, conforme tabela 3, demonstrando exatidão significativa, pois o valor percentual sugerido é de  $100 \pm 2\%$  em relação ao declarado (SHABIR, 2003). Na avaliação da robustez, observou-se que as variações na proporção de acetonitrila, na vazão da fase móvel e na temperatura da coluna alteraram os tempos de retenção, o que não ocorreu utilizando diferentes valores de pH. Os resultados obtidos na verificação da performance do sistema cromatográfico mostraram que o equipamento e condições da metodologia são adequados para assegurar a confiabilidade, exatidão e precisão dos dados analíticos (tabela 5). Demonstrando-se, portanto, que o método proposto cumpre os requisitos preconizados pela literatura, podendo ser empregado para análise simultânea de ezetimiba e sinvastatina. A determinação quantitativa dos comprimidos selecionados para esse estudo forneceu resultados

médios entre 100,84 e 104,86% e 96,08 e 100,18% para a ezetimiba e sinvastatina, respectivamente, conforme a tabela 6, estando de acordo com os parâmetros de qualidade preconizados entre 95 e 105% (USP, 2005; ICH, 1996; SHABIR, 2003).

A cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas apresenta alta especificidade, pois somente os íons dos analitos são monitorados, maior sensibilidade e menor tempo de corrida analítica, tornando-se adequada para análise de biodisponibilidade e farmacocinética de medicamentos, onde grande número de amostras deve ser analisado. Para determinação de ezetimiba e de seu metabólito glicuronidado em plasma humano, desenvolveu-se e validou-se método por cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas com ionização por electrospray no modo positivo, utilizando etoricoxibe como padrão interno, conforme demonstrado no **ARTIGO 3.2**. Dados da literatura indicam que o modo de ionização por APCI é menos suscetível a problemas de supressão iônica (MALLET et al., 2004; ZHONG et al., 2005). Porém, no desenvolvimento do método, verificou-se a necessidade de alta temperatura e voltagem para obtenção de resultados satisfatórios. Desse modo, selecionou-se a ionização por ES no modo positivo, que além de possibilitar o uso de menor volume de fase móvel, apresentou melhor eficiência na ionização da ezetimiba e do PI. Após a otimização e seleção dos parâmetros do equipamento, determinou-se o espectro de massas, observando-se os íons moleculares da ezetimiba e do etoricoxibe (PI) de 392,0 e 359,3 Daltons, respectivamente. O sinal obtido na relação massa/carga de 392 para a ezetimiba é diferente de sua massa molecular (409,4 Daltons) devido à perda de uma molécula de água. Além disso, a energia de colisão no quadrupolo 2, aplicada ao íon molecular da ezetimiba, produziu fragmentos significantes de 133, 145 e 161 Daltons. Os íons produto de 161 (ezetimiba) e 280 (PI) Daltons foram selecionados porque apresentaram maior abundância e estabilidade para as finalidades analíticas. As amostras foram extraídas utilizando sistema líquido-líquido com terc-butil metil éter como solvente de extração. Para análise da ezetimiba total (ezetimiba mais seu metabólito após hidrólise enzimática), as amostras de plasma foram tratadas com  $\beta$ -glicuronidase e posteriormente extraídas. O método apresentou recuperação de 96,14 e 64,11% para a ezetimiba e a ezetimiba total, respectivamente (tabela 1). As transições de 392>161 e 359,3>280 foram monitoradas para a ezetimiba e etoricoxibe, respectivamente. O método cromatográfico isocrático foi executado utilizando fase móvel com vazão de 0,4 mL/min e tempo total de corrida de 2 minutos, o que resultou em menor consumo de solvente orgânico, com conseqüente melhor custo-benefício. O método foi validado nas faixas de concentração de 0,25-20 ng/mL (ezetimiba) e 1-300 ng/mL (ezetimiba total). Como mostra a tabela 4, em todos os testes realizados para avaliação

da estabilidade da ezetimiba em plasma foram encontrados desvios entre -11,37 e 7,69%, resultados de acordo com os limites especificados de  $\pm 15\%$ , indicando que as condições de manuseio e análise das amostras são adequadas, podendo ser sugeridas para a realização de estudos clínicos e de biodisponibilidade. Além disso, os resultados do estudo de validação demonstraram que a metodologia otimizada apresenta especificidade, sensibilidade, linearidade, precisão e exatidão, cumprindo os requisitos descritos para métodos bioanalíticos (CAUSON, 1997; SHAH et al., 2000; FDA, 2001; ANVISA, 2002; ANVISA, 2003). A metodologia foi utilizada para a determinação da concentração plasmática após administração de dose única de ezetimiba (10 mg) em seis voluntários humanos, observando-se  $C_{max}$  de 7,04 e 70,20 ng/mL para a ezetimiba livre e total, respectivamente, atingidas após 1 h ( $t_{max}$ ) (figura 2). Os picos múltiplos apresentados estão relacionados à recirculação enterohepática do fármaco e de seu metabólito. O método também foi adotado para a determinação da potência de amostras comerciais de ezetimiba e comparado estatisticamente através do teste *t* de Student com metodologia validada por CL, observando-se diferenças não-significativas ( $P > 0,05$ ) (tabela 5).

## **CONCLUSÕES**

---

## 5 CONCLUSÕES

---

- ✓ Desenvolveu-se e validou-se método específico, preciso, exato, sensível e robusto por cromatografia líquida em fase reversa para análise simultânea de ezetimiba e sinvastatina em produtos farmacêuticos, sugerindo sua aplicação para a área de controle da qualidade.
- ✓ Desenvolveu-se e padronizou-se procedimento de extração líquido-líquido que proporcionou alta percentagem de recuperação da ezetimiba e do padrão interno nas amostras de plasma, com significativa reprodutibilidade. A recuperação obtida para o glicuronídeo de ezetimiba é superior à descrita na literatura.
- ✓ Desenvolveu-se e otimizou-se método por cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas para determinação de ezetimiba em plasma humano que foi validado, cumprindo os parâmetros de linearidade, precisão, exatidão, recuperação e estabilidade preconizados para métodos bioanalíticos. Realizou-se estudo piloto, demonstrando-se a aplicação para estudos clínicos e de biodisponibilidade.
- ✓ Utilizou-se também o método por cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas para a determinação da ezetimiba em produtos farmacêuticos e realizou-se a análise comparativa com a cromatografia líquida em fase reversa. Os resultados foram comparados pelo teste *t* de Student demonstrando correlação estatisticamente significativa ( $P > 0,05$ ).
- ✓ Os métodos desenvolvidos e validados no presente trabalho contribuem para estabelecer bases para progressivos trabalhos científicos na área e procedimentos importantes para aprimorar o controle da qualidade, estudos de farmacocinética e biodisponibilidade, garantindo a segurança e eficácia terapêutica dos produtos farmacêuticos disponíveis no País.

## **REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

---

## 6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

---

ABU-NAMEH, E. S. M.; SHAWABKEH, R. A.; AZZAM, A. High-performance liquid chromatographic determination of simvastatin in medical drugs. **Journal of Analytical Chemistry**, v. 61, p. 63-66, 2006.

ALNOUTI, Y. et al. Development and application of a new on-line SPE system combined with LC-MS/MS detection for high throughput direct analysis of pharmaceutical compounds in plasma. **Journal of Chromatography A**, v. 1080, p. 99-106, 2005.

ALTMANN, S. W. et al. Niemann- Pick C1 like 1 protein is critical for intestinal cholesterol absorption. **Science**, v. 303, p. 1201-1204, 2004.

ÁLVAREZ-LUEJE, A. et al. Stability study of simvastatin under hydrolytic conditions assessed by liquid chromatography. **Journal of AOAC International**, v. 88, p. 1631-1636, 2005.

ANARI, M. R.; BAILLIE, T. A. Bridging cheminformatic metabolite prediction and tandem mass spectrometry. **Drug Discovery Today**, v. 10, p. 711-717, 2005.

ANVISA - Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Manual de boas práticas em biodisponibilidade e bioequivalência**, v. 1, Brasília, 2002.

ANVISA - Agência Nacional de Vigilância Sanitária. RE nº 899, de 29 de maio de 2003. **Guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos**. Brasília, Diário Oficial da União, 2003.

ASSMANN, G.; NOFER, J. R. Atheroprotective effects of high-density lipoproteins. **Annual Review of Medicine**, v. 54, p. 321-341, 2003.

BALLANTYNE, C. M. et al. Effect of ezetimibe coadministered with atorvastatin in 28 patients with primary hypercholesterolemia: A prospective, randomized, double-blind trial. **Circulation**, v. 107, p. 2409-2415, 2003.

BALLANTYNE, C. M. et al. Efficacy and safety of ezetimibe co-administered with Simvastatin compared with atorvastatin in adults with hypercholesterolemia. **The American Journal of Cardiology**, v. 93, p. 1487-1494, 2004.



BALLANTYNE, C. M. et al. Dose-comparison study of the combination of ezetimibe and simvastatin (Vytorin) versus atorvastatin in patients with hypercholesterolemia: the Vytorin Versus Atorvastatin (VYVA) study. **American Heart Journal**, v. 149, p. 464-473, 2005.

BALLANTYNE, C. M. et al. Efficacy and safety of rosuvastatin 40 mg alone or in combination with ezetimibe in patients at high risk of cardiovascular disease (results from the EXPLORER study). **The American Journal of Cardiology**, v. 99, p. 673-680, 2007.

BROWN, B. G. et al. Lipid lowering and plaque regression. New insights into prevention of plaque disruption and clinical events in coronary disease. **Circulation**, v. 87, p. 1781-1791, 1993.

BROWN, B. G. et al. Antioxidants vitamins and lipid therapy: end of a long romance? **Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology**, v. 22, p. 1535-1546, 2002.

BUHMAN, K. K.; CHEN, H. C.; FARESE Jr, R. V. The enzymes of neutral lipid synthesis. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 276, p. 40369-40372, 2001.

BURNETT, D. A. et al. Azetidinones as inhibitors of cholesterol absorption. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 37, p. 1733-1736, 1994.

CASSERLY, I.; TOPOL, E. Convergence of atherosclerosis and Alzheimer's disease: inflammation, cholesterol, and misfolded proteins. **The Lancet**, v. 363, p. 1139-1146, 2004.

CATAPANO, A. L. Ezetimibe: a selective inhibitor of cholesterol absorption. **European Heart Journal Supplements**, v. 3, p. E6-E10, 2001.

CAUSON, R. Validation of chromatographic methods in biomedical analysis: viewpoint and discussion. **Journal of Chromatography B**, v. 689, p. 175-180, 1997.

CHANG, C. C. Y. et al. Immunological quantitation and localization of ACAT-1 and ACAT-2 in human liver and small intestine. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 275, p. 28083-28092, 2000.

CHOY, P. C. et al. Lipids and atherosclerosis. **Biochemistry and Cell Biology**, v. 82, p. 212-224, 2004.

CLADER, J. W. The discovery of ezetimibe: a view from outside the receptor. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 47, p. 1-9, 2004.

COLEMAN, R. et al. A mouse model for human atherosclerosis: long-term histopathological study of lesion development in the aortic arch of apolipoprotein E-deficient (E<sup>0</sup>) mice. **Acta Histochemica**, v. 108, p. 415-424, 2006.

CORTI, R.; FUSTER, V.; BADIMON, J. J. Pathogenic concepts of acute coronary syndromes. **Journal of the American College of Cardiology**, v. 41, p. 7S-14S, 2003.

COURTNEY, R. D. et al. Effect of food on the oral bioavailability of ezetimibe. **Clinical Pharmacology & Therapeutics**, v.71, p. P80, 2002.

DAVIGNON, J. et al. Apolipoprotein E and atherosclerosis: insight from animal and human studies. **Clinica Chimica Acta**, v. 286, p. 115-143, 1999.

DAVIS Jr, H. R. Ezetimibe: first in a new class of cholesterol absorption inhibitors. **International Congress Series**, v. 1262, p. 243-246, 2004.

DAVIS Jr, H. R., et al. Ezetimibe, a potent cholesterol absorption inhibitor, inhibits the development of atherosclerosis in ApoE knockout mice. **Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology**, v. 21, p. 2032-2038, 2001.

DAVIS Jr, H. R., et al. Niemann-Pick C1 Like 1 (NPC1L1) is the intestinal phytosterol and cholesterol transporter and a key modulator of whole-body cholesterol homeostasis. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 279, p. 33586-33592, 2004.

DUJOVNE, C. A. et al. Efficacy and safety of a potent new selective cholesterol absorption inhibitor, ezetimibe, in patients with primary hypercholesterolemia. **The American Journal of Cardiology**, v. 90, p. 1092-1097, 2002.

ERTÜRK, S.; ÖNAL, A.; ÇETIN, S. M. Analytical methods for the quantitative determination of 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase inhibitors in biological samples. **Journal of Chromatography B**, v. 793, p. 193-205, 2003.

EUROASPIRE II STUDY GROUP. Lifestyle and risk factor management and use of drug therapies in coronary patients from 15 countries. **European Heart Journal**, v. 22, p. 554-572, 2001.

EZZET, F. et al. A population pharmacokinetic model that describes multiple peaks due to enterohepatic recirculation of ezetimibe. **Clinical Therapeutics**, v. 23, p. 871-885, 2001.

FARNIER, M. et al. Efficacy and safety of the coadministration of ezetimibe/simvastatin with fenofibrate in patients with mixed hyperlipidemia. **American Heart Journal**, v. 153, p. 335.e1-335.e8, 2007.

FDA - Food and Drug Administration, Center for Drug Evaluation and Research, **Guidance for Industry: Bioanalytical Method Validation**, May 2001.

FELDMAN, T. et al. Treatment of high-risk patients with ezetimibe plus Simvastatin coadministration versus Simvastatin alone to attain National Cholesterol Education Program Adult Treatment Panel II low-density lipoprotein cholesterol goals. **The American Journal of Cardiology**, v. 93, p. 1481-1486, 2004.

GAGNÉ, C. et al. Efficacy and safety of ezetimibe added to ongoing statin therapy for treatment of patients with primary hypercholesterolemia. **The American Journal of Cardiology**, v. 90, p. 1084-1091, 2002.

GHOSAL, A. et al. Identification of human UDP-glucuronosyltransferase enzyme(s) responsible for the glucuronidation of ezetimibe (ZETIA). **Drug, Metabolism and Disposition**, v. 32, p. 314-320, 2004.

GONÇALVES, J. C. S. et al. On-line solid-phase extraction coupled with high-performance liquid chromatography and tandem mass spectrometry (SPE-HPLC-MS-MS) for quantification of bromazepam in human plasma. **Therapeutic Drug Monitoring**, v. 27, p. 601-607, 2005.

GRUNDY, S. M. Low-density lipoprotein, non-high-density lipoprotein, and apolipoprotein B as targets of lipid-lowering therapy. **Circulation**, v. 106, p. 2526-2529, 2002.

HANSSON, G. K. Mechanisms of disease: inflammation, atherosclerosis, and coronary artery disease. **The New England Journal of Medicine**, v. 352, p. 1685-1695, 2005.

HUI, D. Y.; HOWLES, P. N. Molecular mechanisms of cholesterol absorption and transport in the intestine. **Seminars in Cell & Developmental Biology**, v. 16, p. 183-192, 2005.

ICH - **International Conference on Harmonisation of technical requirements for registration of pharmaceuticals for human use: Guideline on impurities in new drug substances**, 2006.

ICH - **International Conference on Harmonisation of technical requirements for registration of pharmaceuticals for human use**: Guideline on specifications: test procedures and acceptance criteria for biotechnological/biological products, 1999.

ICH - **International Conference on Harmonisation of technical requirements for registration of pharmaceuticals for human use**: Guideline on validation of analytical procedure: Text and Methodology, 1996.

IGLESIAS, P.; DÍEZ, J.J. New drugs for the treatment of hypercholesterolaemia. **Expert Opinion on Investigational Drugs**, v. 12, p.1777-1789, 2003.

IMRAN, M.; SINGH, R. S. P.; CHANDRAN, S. Stability indicating ultraviolet spectroscopic method for the estimations of ezetimibe and carvedilol. **Pharmazie**, v. 61, p. 766-769, 2006.

JEU, L.; CHENG, J. W. M. Pharmacology and therapeutics of ezetimibe (SCH58235), a cholesterol-absorption inhibitor. **Clinical Therapeutics**, v. 25, p. 2352-2387, 2003.

KASTELEIN, J. J. P. et al. Comparison of ezetimibe plus simvastatin versus simvastatin monotherapy on atherosclerosis progression in familial hypercholesterolemia. Design and rationale of the Ezetimibe and Simvastatin in Hypercholesterolemia Enhances Atherosclerosis Regression (ENHANCE) trial. **American Heart Journal**, v. 149, p. 234-239, 2005.

KNOPP, R. H. et al. Evaluation of the efficacy, safety, and tolerability of ezetimibe in primary hypercholesterolaemia: a pooled analysis from two controlled phase III clinical studies. **International Journal of Clinical Practice**, v. 57, p. 363-368, 2003.

KORFMACHER, W. A. Principles and applications of LC-MS in new drug discovery. **Drug Discovery Today**, v. 10, p. 1357-1367, 2005.

KOSOGLOU, T. et al. Pharmacodynamic interaction between the new selective cholesterol absorption inhibitor ezetimibe and simvastatin. **British Journal of Clinical Pharmacology**, v. 54, p. 309-319, 2002.

KOSOGLOU, T. et al. Ezetimibe: a review of its metabolism, pharmacokinetics and drug interactions. **Clinical Pharmacokinetics**, v. 44, p. 467-494, 2005.

KOSTIAINEN, R. et al. Liquid chromatography/atmospheric pressure ionization-mass spectrometry in drug metabolism studies. **Journal of Mass Spectrometry**, v. 38, p. 357-372, 2003.

LANÇAS, F. Extração em fase sólida (SPE). São Paulo: Editora Rima, 2004. 93p.

LEE, H. Pharmaceutical applications of liquid chromatography coupled with mass spectrometry (LC/MS). **Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies**, v. 2, p. 1161-1202, 2005.

LI, S. et al. Liquid chromatography-negative ion electrospray tandem mass spectrometry method for the quantification of ezetimibe in human plasma. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 40, p. 987-992, 2006.

LIBBY, P. Inflammation in atherosclerosis. **Nature**, v. 420, p. 868-874, 2002.

MAHLEY, R. W.; BERSOT, T. P. Terapia farmacológica para a hipercolesterolemia e a dislipidemia. In: BRUNTON, L. L.; LAZO, J. S.; PARKER, L. L. **Goodman & Gilman: as bases farmacológicas da terapêutica**. Rio de Janeiro: Editora McGraw-Hill, 2006. p. 837-868.

MAHLEY, R. W.; HUANG, Y. Apolipoprotein E: from atherosclerosis to Alzheimer's disease and beyond. **Current Opinion in Lipidology**, v. 10, p. 207-217, 1999.

MAHLEY, R. W.; JI, Z. S. Remnant lipoprotein metabolism: key pathways involving cell-surface heparan proteoglycans and apolipoprotein E. **Journal of Lipid Research**, v. 40, p. 1-16, 1999.

MAHLEY, R.W.; RALL Jr, S. C. Apolipoprotein E: far more than a lipid transport protein. **Annual Review of Genomics and Human Genetics**, v. 1, p. 207-217, 2000.

MALLET, C. R.; LU, Z.; MAZZEO, J. R. A study of ion suppression effects in electrospray ionization from mobile phase additives and solid-phase extracts. **Rapid Communications in Mass Spectrometry**, v. 18, p. 49-58, 2004.

MEIR, K. S.; LEITERSDORF, E. Atherosclerosis in the apolipoprotein E-deficient mouse A decade of progress. **Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology**, v. 24, p. 1006-1014, 2004.

MELANI, L. et al. Efficacy and safety of ezetimibe coadministered with pravastatin in patients with primary hypercholesterolemia: a prospective, randomized, double-blind trial. **European Heart Journal**, v. 24, p. 717-728, 2003.

MIETTINEN, T. A.; GYLLING, H. Synthesis and absorption markers of cholesterol in serum and lipoproteins during a large dose of statin treatment. **European Journal of Clinical Investigation**, v. 33, p. 976-982, 2003.

MIGOYA, E. M. et al. Bioequivalence of an ezetimibe/simvastatin combination tablet and coadministration of ezetimibe and Simvastatin as separate tablets in healthy subjects. **International Journal of Clinical Pharmacology and Therapeutics**, v. 44, p. 83-92, 2006.

NAIDU, A.; XU, Q.; CATALANO, R.; CORDELL, B. Secretion of apolipoprotein E by glia requires protein prenylation and is suppressed by statins. **Brain Research**, v. 958, p. 100-111, 2002.

NELSON, D. L.; COX, M. M. Lehninger: princípios de bioquímica. São Paulo: Editora Sarvier, 2002. 975p.

NIESSEN, W. M. A. Progress in liquid chromatography-mass spectrometry instrumentation and its impact on high-throughput screening. **Journal of Chromatography A**, v. 1000, p. 413-436, 2003.

NOFER, J. R. et al. HDL and arteriosclerosis: beyond reverse cholesterol transport. **Atherosclerosis**, v. 161, p. 1-16, 2002.

NORATA, G. D.; CATAPANO, A. L. Lipid lowering activity of drugs affecting cholesterol absorption. **Nutrition, Metabolism, and Cardiovascular Diseases**, v. 13, p. 42-51, 2004.

NUTESCU, E. A.; SHAPIRO, N. L. Ezetimibe: a selective cholesterol absorption inhibitor. **Pharmacotherapy**, v. 23, p.1463-1474, 2003.

OLIVEIRA, P. R. et al. Development and validation of a liquid chromatography-tandem mass spectrometry method for the determination of ezetimibe in human plasma and pharmaceutical formulations. **Chromatographia**, v. 63, p. 315-320, 2006.

OSWALD, S. et al. A LC-MS/MS method to quantify the novel cholesterol lowering drug ezetimibe in human serum, urine and feces in healthy subjects genotyped for SLCOB1, **Journal of Chromatography B**, v. 830, p. 143-150, 2006.

PATER, C. The current status of primary prevention in coronary heart disease. **Current Controlled Trials in Cardiovascular Medicine**, v. 2, p. 24-37, 2001.

PATRICK, J. E. et al. Disposition of the selective cholesterol absorption inhibitor ezetimibe in healthy male subjects. **Drug, Metabolism and Disposition**, v. 30, p. 430-437, 2002.

PEREIRA, A. S. et al. Desafios da química analítica frente às necessidades da indústria farmacêutica. **Química Nova**, v. 28, p. 107-111, 2005.

PUGLIELLI, L.; TANZI, R. E.; KOVACS, D. M. Alzheimer's disease : the cholesterol connection. **Nature Neuroscience**, v. 6, p. 345-351, 2003.

RAO, R. N.; NAGARAJU, V. An overview of the recent trends in development of HPLC methods for determination of impurities in drugs. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 33, p. 335-1040, 2003.

ROSENBLUM, S. B. et al. Discovery of 1-(4-Fluorophenyl)-(3R)-[3-(4fluorophenyl)-(3S)-hydroxypropyl]-(4S)-(4-hydroxyphenyl)-2azetidinone (SCH 58235): A designed, potent, orally active inhibitor of cholesterol absorption. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 41, p. 973-980, 1998.

RUSSEL, J. C.; PROCTOR, S. Small animal models of cardiovascular disease: tools for the study of the roles of metabolic syndrome, dyslipidemia, and atherosclerosis. **Cardiovascular Pathology**, v. 15, p. 318-330, 2006.

SANKAR, D. G. et al. UV spectrophotometric determination of etoricoxib and ezetimibe. **Asian Journal of Chemistry**, v. 17, p. 2812-2814, 2005.

SANTOS, R. D. (Coord.) III Diretrizes brasileiras sobre dislipidemias e diretriz de prevenção da aterosclerose do departamento de aterosclerose da sociedade brasileira de cardiologia. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**, v.77, p. 1-48, 2001.

SANTOSA, S. et al. Physiological and therapeutic factors affecting cholesterol metabolism: Does a reciprocal relationship between cholesterol absorption and synthesis exist? **Life Sciences**, v. 80, p. 505-514, 2007.

SCANDINAVIAN SIMVASTATIN SURVIVAL STUDY GROUP. Randomised trial of cholesterol lowering in 4444 patients with coronary heart disease: the Scandinavian Simvastatin Survival Study (4S). **The Lancet**, v. 344, p. 1383-1389, 1994.

SCHAEFER, E. J. Lipoproteins, nutrition and heart disease. **American Journal of Clinical Nutrition**, v. 75, p. 191-212, 2002.

SCHELLEN, A. et al. Generic solid phase extraction-liquid chromatography-tandem mass spectrometry method for fast determination of drugs in biological fluids. **Journal of Chromatography B**, v. 788, p. 251-259, 2003.

SHABIR, G. A. Validation of high-performance liquid chromatography methods for pharmaceutical analysis, understanding the differences and similarities between validation requirements of the US Food and Drug Administration, the US Pharmacopeia and the International Conference on Harmonization. **Journal of Chromatography A**, v. 987, p. 57-66, 2003.

SHAH, V. P. et al. Bionalytical method validation – A revisit with a decade of progress. **Pharmaceutical Research**, v. 17, p. 1551-1557, 2000.

SHITARA, Y., SUGIYAMA, Y. Pharmacokinetic and pharmacodynamic alterations of 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A (HMG-CoA) reductase inhibitors: drug-drug interactions and interindividual differences in transporter and metabolic enzyme functions. **Pharmacology & Therapeutics**, v. 112, p. 71-105, 2006.

SHOBAB, L. A.; HSIUNG, G. R.; FELDMAN, H. H. Cholesterol in Alzheimer's disease. **The Lancet Neurology**, v. 4, p. 841-852, 2005.

SINGH, S. et al. Stress degradation studies on ezetimibe and development of a validated stability-indicating HPLC assay. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 41, p. 1037-1040, 2006.

SISTLA, R. et al. Development and validation of a reversed-phase HPLC method for the determination of ezetimibe in pharmaceutical dosage forms. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 39, p. 517-522, 2005.

SMART, E. J.; DE ROSE, R. A.; FARBER, S. A. Annexin 2-caveolin 1 complex is a target of ezetimibe and regulates intestinal cholesterol transport. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 101, p. 3450-3455, 2004.

SRINIVASU, M. K.; RAJU, A. N.; REDDY, O. G. Determination of lovastatin and simvastatin in pharmaceutical dosage forms by MEKC. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 29, p. 715-721, 2002.

SUDHOP, T. et al. Inhibition of intestinal cholesterol absorption by ezetimibe in humans. **Circulation**, v. 106, p. 1943-1948, 2002.



SUDHOP, T.; LÜTJOHANN, D.; von BERGMANN, K. Sterol transporters: targets of natural sterols and new lipid lowering drugs. **Pharmacology & Therapeutics**, v. 105, p. 333-341, 2005.

TOBERT, J. A. Lovastatin and beyond: the history of the HMG-CoA reductase inhibitors. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 2, p. 517-526, 2003.

TRIVEDI, R. K. et al. Simultaneous determination of rosuvastatin and fenofibric acid in human plasma by LC-MS/MS with electrospray ionization: assay development, validation and application to a clinical study. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 39, p. 661-669, 2005.

UITTENBOGAARD, A. et al. Cholesteryl ester is transported from caveolae to internal membranes as part of a caveolin-annexin II lipid-protein complex. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 277, p. 4925-4931, 2002.

UNITED STATES PHARMACOPEIA, The (USP) 28 ed. Rockville, United States Convention, 2005.

VAN HEEK, M. et al. In vivo metabolism-based discovery of a potent cholesterol absorption inhibitor, SCH58235, in the rat and rhesus monkey through the identification of the active metabolites of SCH48461. **The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 283, p. 157-163, 1997.

VAN HEEK, M. et al. Comparison of the activity and disposition of the novel cholesterol absorption inhibitor, SCH58235, and its glucuronide, SCH60663. **British Journal of Pharmacology**, v. 129, p. 1748-1754, 2000.

WANG, L.; ASGHARNEJAD, M. Second-derivative UV spectrometric determination of simvastatin in its tablet dosage form. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 21, p. 1243-1248, 2000.

XU, X. et al. Ezetimibe analogs with a reorganized azetidinone ring: design, synthesis and evaluation of cholesterol absorption inhibitions. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 17, p. 101-104, 2007.

YANG, D.; HWANG, L. S. Study on the conversion of three natural statins from lactone forms to their corresponding hydroxy acid forms and their determination in Pu-Erh tea. **Journal of Chromatography A**, v. 1119, p. 277-284, 2006.

YUSUF, S. Two decades of progress in preventing vascular disease. **The Lancet**, v. 360, p. 2-3, 2002.

ZHONG, G. P. et al. Simultaneous determination of metformin and gliclazide in human plasma by liquid chromatography-tandem mass spectrometry: application to a bioequivalence study of two formulations in healthy volunteers. **Journal of Mass Spectrometry**, v. 40, p. 1462-1471, 2005.