

ОПТИМІЗАЦІЯ ВЕРХ МЕТОДИКИ ВИЗНАЧЕННЯ АМЛОДИПІНУ В ТАБЛЕТКАХ З ВИКОРИСТАННЯМ ПІДХОДУ «ЯКІСТЬ ШЛЯХОМ РОЗРОБКИ» (QUALITY BY DESIGN)

Вступ. Для забезпечення безпечності та ефективності лікарських засобів (ЛЗ) потрібні надійні, експресні та прості методики кількісного визначення активних фармацевтичних інгредієнтів у препаратах. Блокатори кальцієвих каналів (БКК) часто застосовують у протоколах лікування артеріальної гіпертензії, як у монопрепаратах, так і у складі комбінованих ЛЗ. До представників БКК належить амлодипін (АМЛ). Наведені в фармакопеях методики кількісного визначення амлодипіну мають деякі недоліки, тому потребують оптимізації з використанням сучасних підходів.

Метою роботи була розробка експресної, простої та «зеленої» ВЕРХ методики визначення амлодипіну бесилату в лікарських засобах з використанням підходів Quality by Design (QbD).

Методи дослідження. Для виконання дослідження використовували рідинний хроматограф Shimadzu LC-2050 C з діодноматричним детектором, для отримання хроматограм та інтегрування результатів – програмне забезпечення LabSolutions. Хроматографічні колонки: Luna C8 (100 x 4.6 мм 3 мкм), Luna C18 (100 x 4.6 мм 3 мкм), InertClone ODS (150 x 4.6 мм 3.5 мкм), Zorbax SB C8 (150 x 4.6 мм 3.5 мкм) та Zorbax SB Phenyl (150 x 4.6 мм 3.5 мкм). ФСЗ амлодипіну бесилату (АМЛ) (чистота $\geq 98\%$) закуплено в Sigma-Aldrich Chemicals Co. (St. Louis, MO, USA), таблетки амлодипіну бесилату «Амлодипін» 10 мг АТ «Фармак» придбано в місцевій аптеці.

Результати й обговорення. Проведено оптимізацію розробки методики за допомогою QbD з використанням трирівневого факторного дизайну, враховуючи основні фактори методу (співвідношення метанолу (MeOH), триетиламіну (TEA) та значення pH), що впливають на хроматографічний відгук (число теоретичних тарілок (NTP), площа піку (A), час утримування (Rt) та коефіцієнт асиметрії (Tf)). Запропоновані хроматографічні умови базувались на ізократичному елююванні амлодипіну бесилату рухомою фазою в складі: ацетонітрил (AcN) – MeOH – 0.7 % TEA з доведенням до pH 2.81 за допомогою 88 % фосфорної кислоти у співвідношеннях 30–35–35. Оптиміальні умови хроматографування: температура колонки – 30 °C, швидкість потоку – 1 мл/хв, довжина хвилі детектування – 237 нм, час утримування – до 3 хв. Описані умови були апробовані на різних колонках: Luna C8 (100 x 4.6 мм 3 мкм), Luna C18 (100 x 4.6 мм 3 мкм), InertClone ODS (150 x 4.6 мм 3.5 мкм), Zorbax SB C8 (150 x 4.6 мм 3.5 мкм). Запропонований підхід визначення амлодипіну бесилату є універсальним, адже під час апробації різного типу колонок методика залишається експресною та задовольняє параметрам придатності хроматографічної системи. Одержані результати розширюють можливості використання розробленої методики для лабораторій з невеликим арсеналом хроматографічних колонок, оскільки в роботі показані і різні за ціною політикою колонки (Phenomenex – дешевші, Agilent – дорожчі). Валідацію ВЕРХ методики здійснювали за такими параметрами: лінійність, робастність, правильність та прецизійність відповідно до вимог Міжнародної конференції з гармонізації (ICH). Межа визначення (МВ) та межа кількісного визначення (МКВ) методики становлять 1.39 мкг/мл та 4.21 мкг/мл відповідно. Діапазон застосування знаходився в межах від 10 до 50 мкг/мл. Результати вивчення правильності (99.88–101.35 %) та прецизійності (RSD < 2.0 %) розробленої ВЕРХ методики відповідають критеріям прийнятності. Принципи «зеленої» хімії успішно імплементовано в розроблену ВЕРХ методику, що підтверджено результатами вивчення екологічності інструментами AGREE (0.78) та MOGAPI (79).

Висновки. Розроблено просту, експресну та «зелену» ВЕРХ методику визначення амлодипіну для проведення контролю якості готових лікарських форм, вивчення стабільності готових лікарських форм, вивчення впливу змін на готові лікарські форми у разі запровадження нових виробників допоміжних речовин, у разі зміни технології виготовлення, зміни складу препаратів та інших процесів життєвого циклу готових лікарських форм амлодипіну.

КЛЮЧОВІ СЛОВА: амлодипіну бесилат; кількісне визначення; ВЕРХ; Quality by Design; таблетки.

ВСТУП. Кожен лікарський засіб (ЛЗ) має свій життєвий цикл, і методики контролю якості можуть переглядатись на відповідність

сучасним вимогам. Це передбачає адаптацію до науково-технологічного прогресу, змін у запитих користувачів, а також до нових регуляторних вимог. Гіпертонічна хвороба

© М. М. Горин, 2025

(ГХ) – хронічне, неінфекційне захворювання серцево-судинної системи. Згідно з даними ВООЗ, чисельність захворювання значно зростає з кожним роком, що пов'язано з умовами життя та супутніми захворюваннями. Низький показник ефективності контролю артеріального тиску може привести до інвалідизації та часто супроводжується смертністю серед осіб працездатного віку. Таким чином, для забезпечення безпечності та ефективності ЛЗ потрібні надійні, експресні та прості методики кількісного визначення активних фармацевтичних інгредієнтів у препаратах. Блокатори кальцієвих каналів (БКК) часто застосовують у протоколах лікування ГХ, як у монопрепаратах, так і у складі комбінованих ЛЗ. До представників БКК належить амлодипін (АМЛ). За хімічною структурою амлодипін належить до похідних 1,4-дигідропіридину, рKa та Log P становлять 8.6–9.1 та 3 відповідно [1–2]. У Європейській та Американській фармакопеях наведені монографії на субстанцію амлодипіну бесилату та його комбінації [3–4]. Також в Американській фармакопеї представлена монографія на таблетки амлодипіну бесилату. Запропонований підхід кількісного визначення амлодипіну методом ВЕРХ базується на ізократичному елююванні рухомою фазою в складі: метанол (MeOH) – ацетонітрил (ACN) – буферний розчин (7.00 мл ТЕА в 900 мл. води, доведеною до рН 3.0 фосфорною кислотою та до об'єму 1 л. водою) у співвідношенні 35–15–50. Об'єм інжекції – 50 мкл, швидкість потоку – 1.0 мл/хв, детектування за довжини хвилі 237 нм. Станційна фаза – хроматографічна колонка L1 (3.9 мм x 15 см, 5 мкм).

Представлена хроматографічна методика визначення амлодипіну бесилату має деякі недоліки: використання великих об'ємів реагентів, що робить методику неекологічною, та значна частка буфера в складі рухомої фази, що негативно впливає на навантаження колонки. Під час аналізу джерел літератури вивчено основні хроматографічні підходи, що представлені в наукових статтях у вигляді розроблених ВЕРХ методик визначення амлодипіну бесилату в моно препаратах та комбінованих ЛЗ [5–18]. Проте натеper підходи до розробки хроматографічних методик дещо змінились: виробниками впроваджено нові хроматографічні колонки, використовуються інші підходи до компонентів рухомих фаз та умов хроматографування, а також змінилися підходи до дизайну дослідження.

Метою роботи була розробка експресної, простої та «зеленої» ВЕРХ методики визначення амлодипіну бесилату в лікарських засобах з використанням підходів Quality by Design (QbD).

МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ. Для виконання дослідження використовували рідинний хроматограф Shimadzu LC-2050 C з діодноматричним детектором, для отримання хроматограм та інтегрування результатів – програмне забезпечення LabSolutions. Також у роботі використовували: ваги аналітичні електронні лабораторні “RAD WAG AS 200/C”; ультразвукову баню (Elmasonic Easy 40 H, Germany), рН метр (Mettler-Toledo, model LE438, Switherland). Хроматографічні колонки: Luna C8 (100 x 4.6 мм 3 мкм), Luna C18 (100 x 4.6 мм 3 мкм), InertClone ODS (150 x 4.6 мм 3.5 мкм), Zorbax SB C8 (150 x 4.6 мм 3.5 мкм) та Zorbax SB Phenyl (150 x 4.6 мм 3.5 мкм). Для QbD використано програмне забезпечення MiniTab.

ФСЗ амлодипіну бесилату (АМЛ) (чистота $\geq 98\%$) закуплено в Sigma-Aldrich Chemicals Co. (St. Louis, MO, USA), таблетки амлодипіну бесилату «Амлодипін» 10 мг. АТ «Фармак» придбано в місцевій аптеці.

MeOH, ACN та вода ($\geq 99.9\%$ чистоти) отримано від Honeywell, Riedel-de Haen (Німеччина). Фосфорна кислота 88 % (для корегування рН) закуплена в Honeywell Fluka. Триетиламін (ТЕА), калію дигідроген фосфат та трифтороцтова кислота (TFA) придбано в Scharlab S.L. (Spain). Для фільтрування аналізованих розчинів використовували фільтри RS Membrane (розміром 0.45 мкм, Phenex, Німеччина).

Приготування випробовуваного розчину таблеток амлодипіну бесилату: точну наважку порошку розтертих таблеток еквівалентну 25 мг амлодипіну бесилату поміщають у мірну колбу на 25.00 мл, розчиняють у 15.00 мл MeOH та доводять до мітки тим же розчинником та фільтрують. Після цього 2.50 мл фільтрату поміщають у колбу на 25.00 мл та доводять MeOH до мітки до одержання розчину таблеток амлодипіну бесилату з концентрацією 0.1 мг/мл.

Для дослідження лінійності брали аліквоти амлодипіну бесилату (0.1 мг/мл) від 1.0 до 5.0 мл у колби на 10 мл та доводили об'єм розчину MeOH до мітки для одержання калібрувальних зразків із концентраціями від 10 до 50 мкг/мл.

Детектування проводили за довжини хвилі 237 нм.

Приготування розчину порівняння амлодипіну бесилату: 25 мг ФСЗ амлодипіну бесилату вміщують до мірної колби місткістю 25.00 мл, розчиняють у МеОН та доводять до позначки тим же розчинником, перемішують. Тоді 2.50 мл розчину переносять до мірної колби на 25.00 мл та доводять МеОН до мітки.

РЕЗУЛЬТАТИ Й ОБГОВОРЕННЯ. У світі зростає інтерес до впровадження принципів QbD у різних галузях науки [19]. Принципи QbD широко застосовуються й для розробки аналітичних методик завдяки раціональному підбору взаємодії різних параметрів (факторів) методу, які впливають на хроматографічний відгук.

Проте перед використанням QbD потрібно було підібрати оптимальні хроматографічні умови. У процесі попередніх експериментальних досліджень апробовано колонку Luna C8 та різні підходи до компонентів

рухомих фаз. У таблиці 1 зображено підходи з використанням у складі рухомої фази трифтороцтової кислоти, буфера калію дигідрогенфосфату та ТЕА у різних співвідношеннях з органічними компонентами в рухомій фазі. За одержаними результатами ми зацікавились підходом з використанням ТЕА в складі рухомої фази.

Як видно з таблиці 1, підхід із використанням 0.5 % ТЕА у складі рухомої фази забезпечив ефективне розділення амлодипіну, проте з близьким часом утримування до «мертвого» об'єму та несиметричним піком. Тому прийнято рішення збільшити концентрацію до 0.7 % ТЕА у складі рухомої фази, завдяки чому одержали задовільне значення коефіцієнта симетрії (k').

Для отримання відмінних параметрів хроматографічної системи важливим також є співвідношення органічних компонентів у складі рухомої фази, а саме МеОН та АСН. Експериментальним шляхом встановлено

Таблиця 1 – Використання різних підходів до компонентів рухомих фаз визначення амлодипіну бесилату на колонці Luna C8

Підхід	Хроматограма	Висновок
Трифтороцтова кислота (TFA) 0.1 %		Великий час утримування амлодипіну та незадовільні параметри хроматографічної системи (несиметричний пік)
25 mM калію дигідроген фосфат (KH_2PO_4)		Незадовільні параметри хроматографічної системи (великі шуми)
ТЕА 0.5 %		Несиметричний пік із незадовільними параметрами хроматографічної системи (близько до «мертвого» об'єму)

оптимальну рухому фазу у складі ACN-МеОН – 0.7 % ТЕА рН 2.8 у співвідношеннях 30–35–35 (рис. 1).

Для оптимізації параметрів також вивчали швидкість потоку, температуру та рН, що представлено в таблиці 2.

Як видно з таблиці 2, оптимальними параметрами були: температура колонки – $30^{\circ} \pm 2^{\circ} \text{C}$, швидкість потоку – 1 мл/хв, рН – 2.91, рухома фаза у складі ACN-МеОН – 0.7 % ТЕА (30–35–35). Наступним етапом дослідження був вибір хроматографічної колонки. Апробовано колонки Luna C18, Zorbax C8, InertClone ODS та Zorbax Phenyl.

І ще одна колонка Luna C8 була базовою і описаною вище.

Згідно з таблицею 3 можна зробити висновок, що для розробленої ВЕРХ методики визначення амлодипіну бесилату в ЛЗ можна використовувати різні алкільні колонки в якості нерухомої фази. Використання фенільної колонки (Zorbax SB Phenyl) також можливе, проте за заданих умов параметри придатності хроматографічної системи дещо поступаються вищезгаданим колонкам. Розроблена методика визначення амлодипіну бесилату є універсальною, адже при апробації різного типу колонок методика залишається експресною та задовольняє параметрам придатності хроматографічної системи. Одержані результати розширюють можливості використання розробленої методики для лабораторій з невеликим арсеналом хроматографічних колонок, оскільки в роботі показані і різні за ціною політикою колонки (Phenomenex – дешевші, Agilent – дорожчі).

Оптимізація методики.

Для оптимізаційного дослідження обрано аналіз Vox Benken, який включав три фактори

та загалом 26 експериментів (таблиця 4). Основними факторами було співвідношення об'ємів МеОН, 0.7 % ТЕА в рухомій фазі та рН. Для вивчення й оптимізації найважливіших параметрів проаналізовано такі відгуки: число теоретичних тарілок (NTP), площу піку (A), коефіцієнт асиметрії (Tf) та час утримування (Rt).

Для статистичного аналізу використано безкоштовну пробну версію програмного забезпечення Minitab. Для оцінки значущості моделей, термінів та їх взаємодій – дисперсійний аналіз (ANOVA). Згідно з проведеним аналізом отримано рівняння регресії:

$$\text{NTP} = 4803 - 252.8 \text{ рН} - 156 \text{ ТЕА} + 6.08 \text{ ТЕА} \cdot \text{ТЕА}$$

$$\text{TF} = 6.90 + 0.0786 \text{ МеОН} - 2.100 \text{ рН} - 0.2394 \text{ ТЕА} - 0.001560 \text{ МеОН} \cdot \text{МеОН} + 0.3781 \text{ рН} \cdot \text{рН} + 0.003260 \text{ ТЕА} \cdot \text{ТЕА} + 0.000780 \text{ МеОН} \cdot \text{ТЕА}$$

$$\text{A} = 349196 + 5552 \text{ МеОН} - 18101 \text{ ТЕА} - 209.7 \text{ МеОН} \cdot \text{МеОН} + 160.0 \text{ ТЕА} \cdot \text{ТЕА} + 258.9 \text{ МеОН} \cdot \text{ТЕА}$$

$$\text{Rt} = 11.91 - 0.0808 \text{ МеОН} - 2.907 \text{ рН} - 0.3738 \text{ ТЕА} + 0.4500 \text{ рН} \cdot \text{рН} + 0.005080 \text{ ТЕА} \cdot \text{ТЕА} + 0.003540 \text{ МеОН} \cdot \text{ТЕА} + 0.01025 \text{ рН} \cdot \text{ТЕА}$$

Вплив змінних на кількість теоретичних тарілок (NTP)

Вплив факторів методу (МеОН, ТЕА та рН) на відгук число теоретичних тарілок представлено на рис. 2. Як видно з одержаних результатів, найбільший вплив на NTP має ТЕА, тоді як метанол та рН критично не впливають. Зі зростанням ТЕА зростає NTP.

Вплив змінних на коефіцієнт асиметрії (Tf)

Вплив факторів методу (МеОН, ТЕА та рН) на хроматографічний відгук коефіцієнт

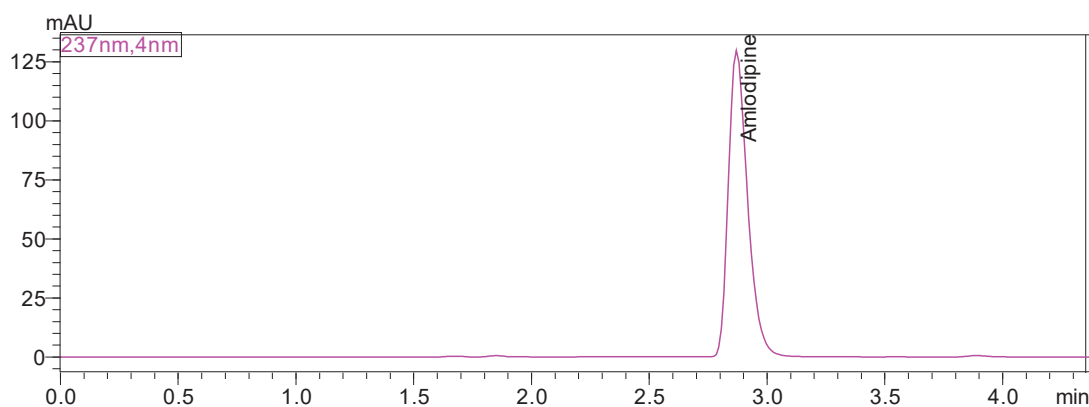
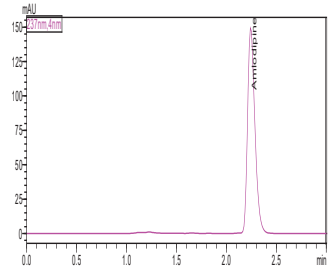
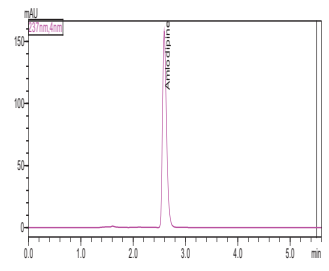
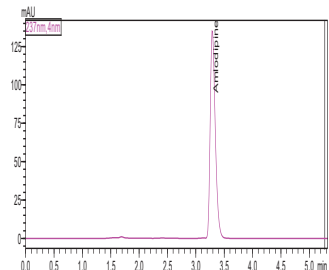
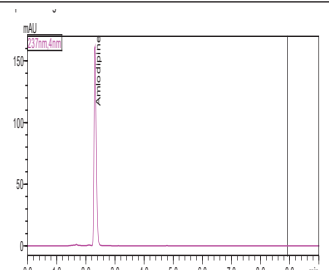


Рис. 1. Хроматограма амлодипіну бесилату (0.1 мг/мл) з рухомою фазою ACN-МеОН – 0.7 % ТЕА рН 2.8 (30–35–35) на колонці Luna C8

Таблиця 2 – Вивчення оптимальних хроматографічних умов

Хроматографічні умови	ACN- MeOH-0.7 % TEA pH 2.91 (35:35:30) T 30 °C, 1 мл/хв	ACN- MeOH-0.7 % TEA pH 2.91 (30:35:35) T 30 °C, 1 мл/хв	ACN- MeOH-0.7 % TEA pH 3.06 (30:35:35) T 28 °C, 1 мл/хв	ACN- MeOH-0.7 % TEA pH 3.06 (30:35:35) T 32° C, 1 мл/хв	ACN- MeOH-0.7 % TEA pH 3.06 (30:35:35) T 30 °C, 0.8 мл/хв	ACN- MeOH-0.7 % TEA pH 3.06 (30:35:35) T 30° C, 1.2 мл/хв	ACN- MeOH-0.7 % TEA pH 2.71 (30:35:35) T 32° C, 1.2 мл/хв	ACN- MeOH-0.7 % TEA pH 2.91 (30:35:35) T 32° C, 1.2 мл/хв	ACN- MeOH-0.7 % TEA pH 3.06 (30:35:35) T 32° C, 1.2 мл/хв	Критерій
Параметри										
Коефіцієнт асиметрії (Tf)	1.37	1.38	1.24	1.35	1.39	1.37	1.41	1.35	1.43	0.8-1.5
Коефіцієнт симетрії (K') («мертвий» об'єм 1.278)	0.87	1.15	0.12	1.41	1.27	1.85	0.89	0.89	0.88	1-10
Час утримування (Rt)	2.40	2.93	1.43	2.99	2.90	3.64	2.42	2.41	2.40	-
Число теоретичних тарілок (NTP)	4849	5936	553	6034	6073	6673	5365	5280	5290	>2000

Таблиця 3 – Апробація різних хроматографічних колонок

Хроматографічна колонка	Характеристики колонки	Хроматограма	Результати
Luna C18 Виробник Phenomenex	Оберненофазовий режим розділення. Розмір: 100 мм x 4.6 мм 3 мкм. Виготовлена з високоочищеного кремнезему з низьким вмістом металу. рН діапазон: 1.5–8.0		Симетричний пік із задовільними параметрами хроматографічної системи (час утримування до 2.5 хв)
Zorbax SB C8 Виробник Agilent Technologies	Оберненофазовий режим розділення. Розмір: 150 мм x 4.6 мм 3.5 мкм. Stable Bond (захищена) рН діапазон 1.0–8.0		Симетричний пік із задовільними параметрами хроматографічної системи (час утримування до 3.0 хв)
InertClone ODS Виробник Phenomenex	Оберненофазовий режим розділення. Розмір: 150 мм x 4.6 мм 3.5 мкм Вуглецеве навантаження – 15.0 %. рН діапазон 2.0–7.5		Симетричний пік із задовільними параметрами хроматографічної системи (час утримування до 3.5 хв)
Zorbax SB Phenyl Виробник Agilent Technologies	Оберненофазовий режим розділення. Розмір: 150 мм x 4.6 мм 3.5 мкм. Stable Bond (захищена) Вуглецеве навантаження – 5.50 %. рН діапазон 1.0–8.0		Несиметричний та вузький пік із незадовільними параметрами хроматографічної системи (час утримування до 2.5 хв)

Таблиця 4 – Матриця експерименту

StdOrder	RunOrder	PtType	Blocks	MeOH	pH	TEA	NTP	A	Tf	Rt
1	1	2	1	30	2.7	32.5	5499	161539	1.37	2.5
2	2	2	1	35	2.7	32.5	5417	161884	1.375	2.659
3	3	2	1	30	3.1	32.5	5305	160211	1.398	2.502
4	4	2	1	35	3.1	32.5	5335	162394	1.412	2.668
5	5	2	1	30	2.9	30	4845	160049	1.396	2.276
6	6	2	1	35	2.9	30	4881	159782	1.4	2.41
7	7	2	1	30	2.9	35	6045	159755	1.369	2.739
8	8	2	1	35	2.9	35	6076	165748	1.399	2.961
9	9	2	1	32.5	2.7	30	4888	162441	1.415	2.352

10	10	2	1	32.5	3.1	30	4911	160117	1.432	2.365
11	11	2	1	32.5	2.7	35	6071	167394	1.393	2.851
12	12	2	1	32.5	3.1	35	6120	166265	1.438	2.888
13	13	0	1	32.5	2.9	32.5	5569	160150	1.382	2.559
14	14	2	1	30	2.7	32.5	5505	161977	1.368	2.496
15	15	2	1	35	2.7	32.5	5535	161681	1.379	2.66
16	16	2	1	30	3.1	32.5	5297	160485	1.403	2.501
17	17	2	1	35	3.1	32.5	5394	161168	1.41	2.667
18	18	2	1	30	2.9	30	4828	160931	1.402	2.276
19	19	2	1	35	2.9	30	4898	159905	1.411	2.411
20	20	2	1	30	2.9	35	6044	160016	1.379	2.733
21	21	2	1	35	2.9	35	6113	165673	1.401	2.957
22	22	2	1	32.5	2.7	30	4934	161679	1.391	2.35
23	23	2	1	32.5	3.1	30	4794	161675	1.452	2.363
24	24	2	1	32.5	2.7	35	6101	164710	1.395	2.845
25	25	2	1	32.5	3.1	35	5985	165546	1.44	2.875
26	26	0	1	32.5	2.9	32.5	5473	160631	1.386	2.557

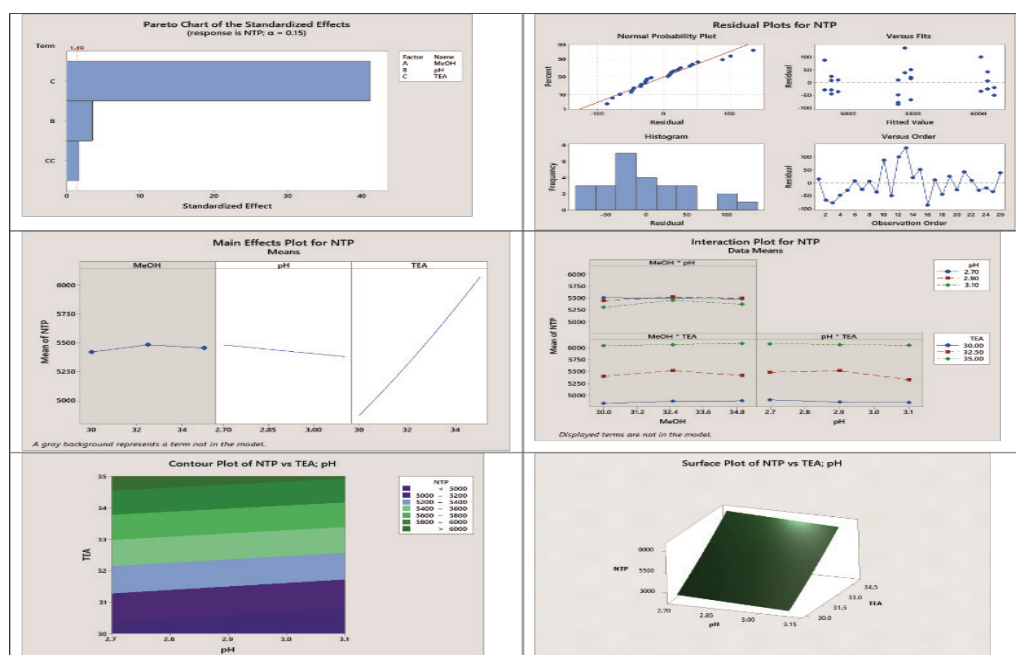


Рис. 2. Результати вивчення хроматографічного відгуку NTP

асиметрії представлено на рис. 3. Як видно з одержаних результатів, найбільший вплив на T_f має рН. Зі зростанням значення рН збільшується T_f .

Вплив змінних на площу піку (A)

Вплив факторів методу (MeOH, TEA та рН) на хроматографічний відгук площа піку представлено на рис. 4. Як видно з одержаних результатів найбільший вплив на A має

TEA, MeOH та їх взаємодія. Зі зростанням TEA зростає A.

Вплив змінних на площу піку (R_t)

Вплив факторів методу (MeOH, TEA та рН) на хроматографічний відгук час утримування представлено на рис. 5. Як видно з одержаних результатів, найбільший вплив на R_t має TEA, MeOH. Зі зростанням TEA зростає R_t .

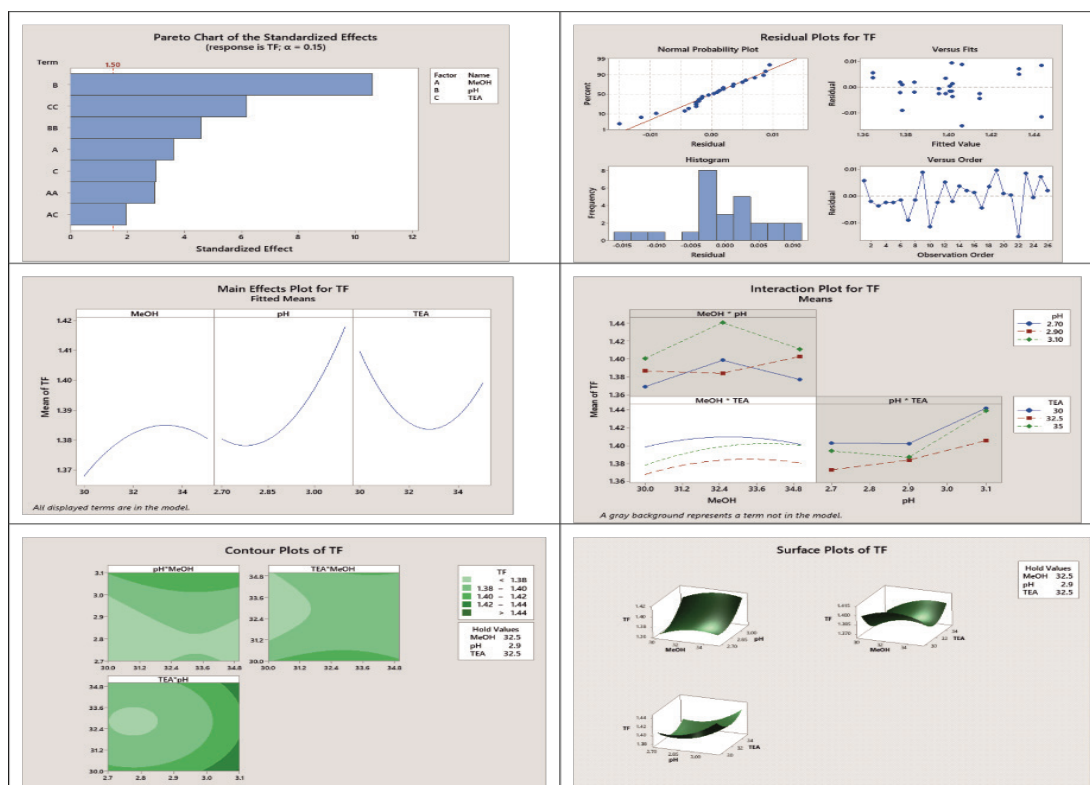


Рис. 3. Результати вивчення хроматографічного відгуку Tf

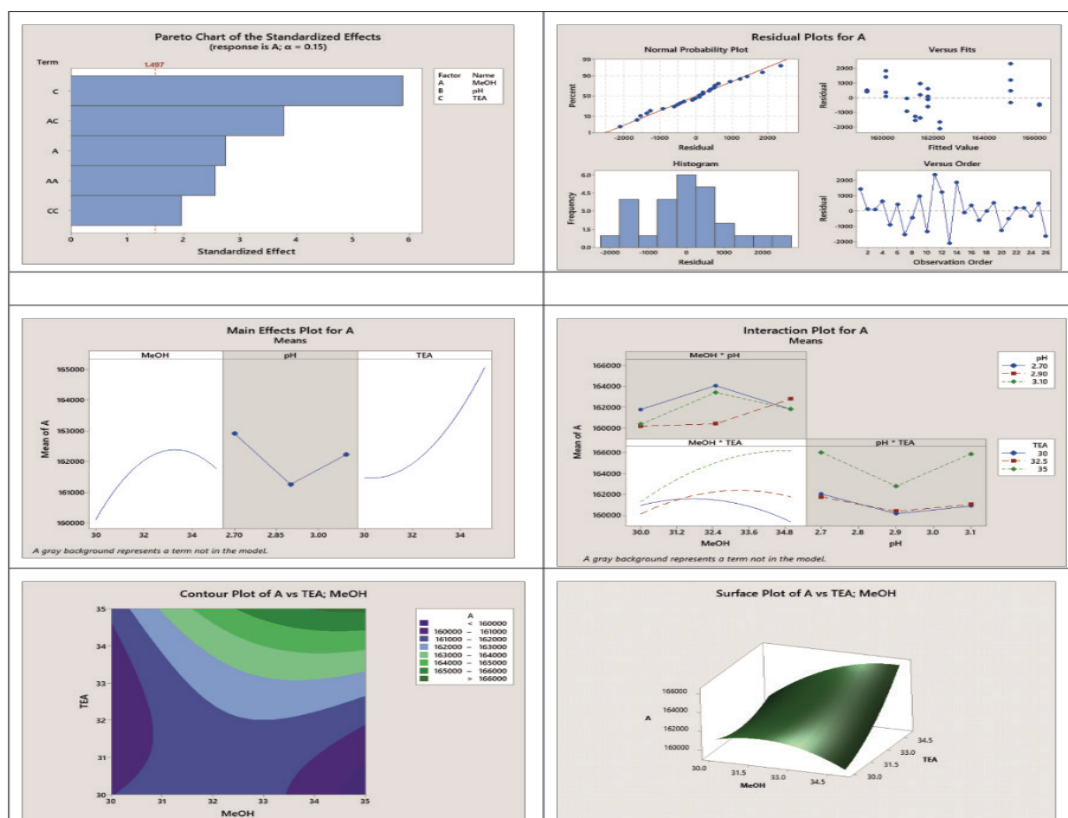


Рис. 4. Результати вивчення хроматографічного відгуку A

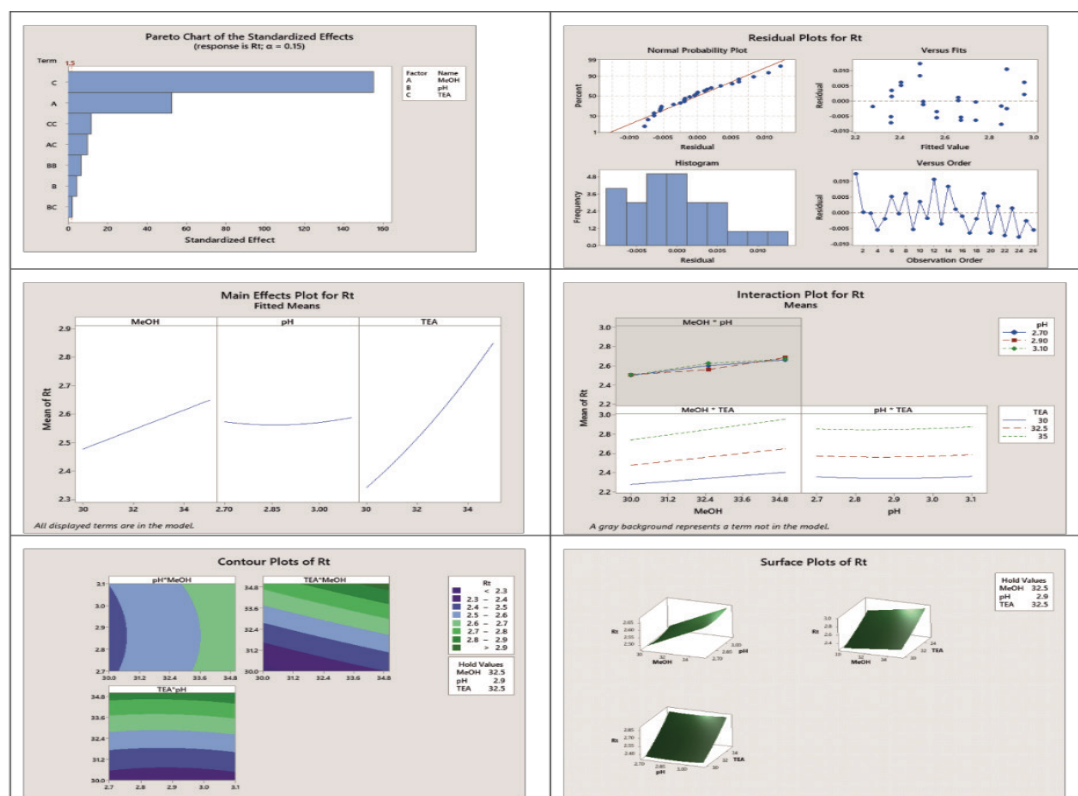


Рис. 5. Результати вивчення хроматографічного відгуку Rt

Оптимізація методу

Для оптимізації методу використовувались такі критерії: NTP, A, Rt – максимальне значення, Tf – значення від 1.0 до 1.5. Результати дослідження представлено на рис. 6. Як видно з рисунку, оптимальне значення pH – 2.8 та співвідношення MeOH та TEA – 35 %. Такі параметри як довжина хвилі детектування, температура та тип колонки були виключені, адже мали низький вплив на зазначені відгуки.

Валідація ВЕРХ методики визначення амлодипіну бесилату в ЛЗ

Для підтвердження надійності результатів розроблену хроматографічну методику валідовано за такими параметрами, як: лінійність, робасність, правильність та прецизійність, відповідно до вимог Міжнародної конференції з гармонізації (ICH) [20].

Лінійність, діапазон застосування

Результати вивчення основних параметрів лінійної залежності та регресійного аналізу представлено в таблиці 5. Калібрувальний графік зображено на рисунку 7.

Отримані значення відповідають критеріям прийнятності. МВ та МКВ методики становлять 1.39 мкг/мл та 4.21 мкг/мл відповідно. Діапазон застосування знаходився в межах від 10 до 50 мкг/мл.

Правильність та прецизійність

Для вивчення правильності готували модельні суміші з точно відомими концентраціями в межах 80–120 %. Результати вивчення правильності та прецизійності зображено в таблицях 6–7. Отримані значення відповідають критеріям прийнятності, адже не перевищують критично допустимих меж.

Застосування розробленої ВЕРХ методики для кількісного визначення амлодипіну в таблетках

Розроблену ВЕРХ методику було апробовано на таблетках промислового виробництва «Амлодипін» 10 мг АТ Фармак. Отримані результати свідчать про можливість застосування розробленої ВЕРХ методики для аналізу ЛЗ на основі амлодипіну бесилату (табл. 8).

Робасність

Для вивчення робасності вивчали зміни коефіцієнта асиметрії та часу утримування залежно від варіації температури (28–32 °C) та швидкості потоку (0.8–1.2 мл/хв).

Отримані результати, зображені в таблиці 9, свідчать про те, що розроблена методика є робасною, адже невеликі зміни температури (± 2 °C) та швидкості потоку (± 0.2 мл/хв) не мають суттєвого впливу.

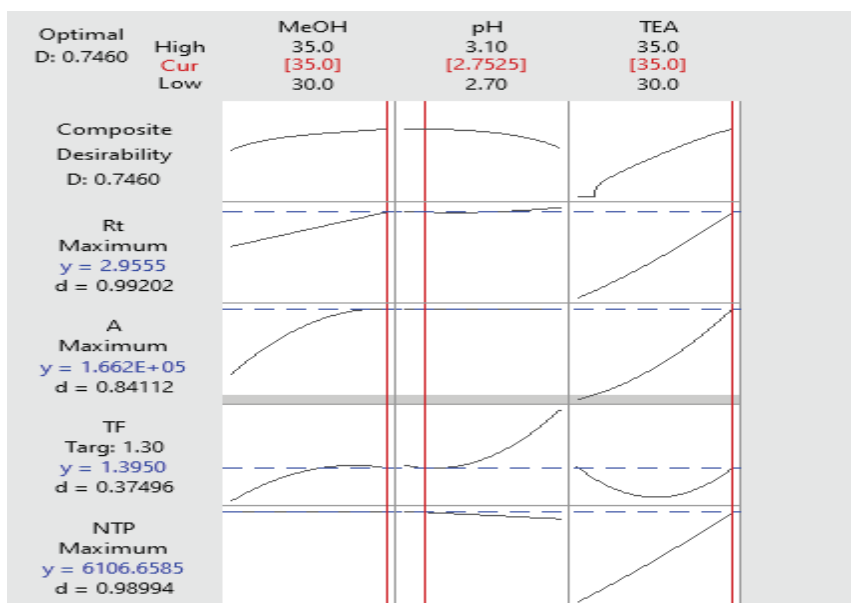


Рис. 6. Результати оптимізації BPRX методики визначення амлодипіну на колонці Luna C8 з оптимальною рухомою фазою в складі ACN – MeOH – 0.7 % TEA pH 2.8 у співвідношеннях 30–35–35

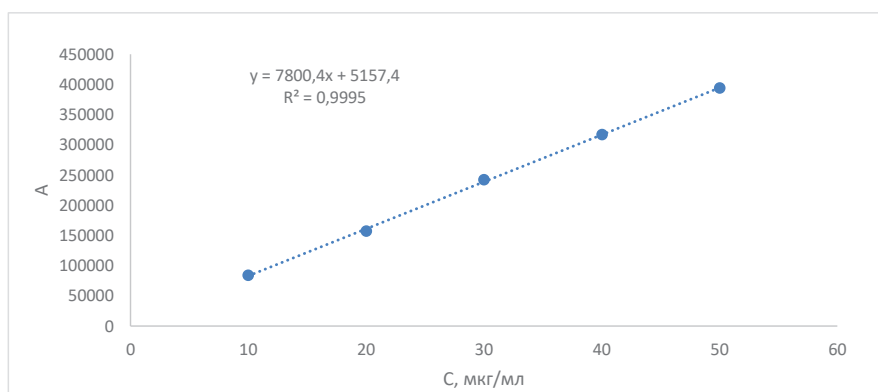


Рис. 7. Калібрувальний графік

Таблиця 5 – Результати вивчення лінійності

Параметр	Значення	Критерій	Висновок
$b \pm (S_b)$	$7800.40 \pm (99.11)$	-	Відповідає
$a \pm (S_a)$	$5158.82 \pm (3287.24)$	$ a \leq \Delta a = 9126.84$	Відповідає
Δa	9126.84	-	Відповідає
Δb	275.19	-	Відповідає
R^2	0.9995	> 0.9980	Відповідає
MB, мкг/мл = $3.3 S_a/b$	1.3907	-	Відповідає
МКВ, мкг/мл = $10 S_a/b$	4.214	-	Відповідає
Діапазон концентрацій, мкг/мл	10.00-50.00	-	Відповідає

Таблиця 6 – Результати вивчення валідаційного параметру правильність

Модельні розчини	Вміст амлодипіну, %		Відношення знайденого до введеного, $Z_i = (Y_i/X_i) \cdot 100\%$
	Введено, $X_i = (C_i/C_{rs}) \cdot 100\%$	Знайдено, $Y_i = (A_i/A_{rs}) \cdot 100\%$	
M ₁	79.01	80.08	101.35
M ₂	80.09	80.05	99.95

M ₃	80.09	79.99	99.88
M ₄	100.03	100.01	99.98
M ₅	99.98	100.04	100.06
M ₆	100.30	100.23	99.93
M ₇	120.03	119.98	99.96
M ₈	120.00	120.07	100.06
M ₉	120.13	119.95	99.78
Середнє значення, Z, %			100.10
Стандартне відхилення, S _z , %			0.53
Відносний довірчий інтервал $\Delta z = t(95\%, 8) \cdot S_z = 2.3060 S_z$, %			1.22
Критичне значення для збіжності результатів $\Delta z \leq \max \Delta_{\Delta z} = 2.4\%$			Виконується (1.22 < 2.4)
Систематична похибка $\delta = Z - 100 $, %			0.10
Критерій невизначеності систематичної похибки $\delta \leq \max \delta\%$			Виконується (0.10 < 0.51)
			Загальний висновок про методику

Таблиця 7 – Результати вивчення валідаційного параметру прецизійність

№ розчину	Величина Z _i , %		
	1 дослід	2 дослід	3 дослід
1	100.15	99.99	100.13
2	99.98	100.02	99.94
3	99.88	100.11	100.00
4	100.20	100.20	100.07
5	100.13	99.96	100.06
6	100.05	99.91	99.99
Середнє Z (%)	100.07	100.03	100.03
RSD _z , %	0.12	0.10	0.07
Відносне стандартне відхилення, RSD _z (%)	0.10		
Відносний довірчий інтервал, Δ_z	0.10 ≤ 2.4		
Критичне значення збіжності результатів $\Delta_{\Delta z}$, %	2.4		

Таблиця 8 – Результати кількісного визначення амлодипіну бесилату в таблетках

Лікарський засіб	Знайдено, г	Метрологічні характеристики
Таблетки «Амлодипін» 10 мг, АТ Фармак	0.0102 0.0101 0.0098 0.0099 0.0100 0.0103	$\bar{m} = 0.010$ г $S = 9.31 \times 10^{-5}$ $t = 2.57$ $\Delta x = 2.39 \times 10^{-4}$ RDS = 2.07 $\varepsilon = 2.39\%$

Таблиця 9 – Результати вивчення валідаційного параметру робастність

Параметри		Коефіцієнт асиметрії (Tf)	Час утримування (Rt)
Швидкість потоку, мл/хв	0.8	1.37	3.63
	1	1.38	2.93
	1.2	1.35	2.5
Температура, °C	28	1.35	2.99
	30	1.38	2.93
	32	1.39	2.90

Імплементація принципів «зеленої» хімії при розробці ВЕРХ методики визначення амлодипіну в лікарських засобах

Сучасні тенденції фармацевтичного аналізу передбачають імплементацію принципів екологічної безпеки під час розробки методик аналізу субстанцій та ЛЗ. Для вивчення

профілю екологічності розробленої ВЕРХ методики ми використовували інструменти Analytical GREENness (AGREE) та Modified GAPI (MOGAPI) [21–22].

Отримані результати (рис. 8) свідчать про відмінний зелений результат. Екологічний профіль розробленої ВЕРХ методики визначення

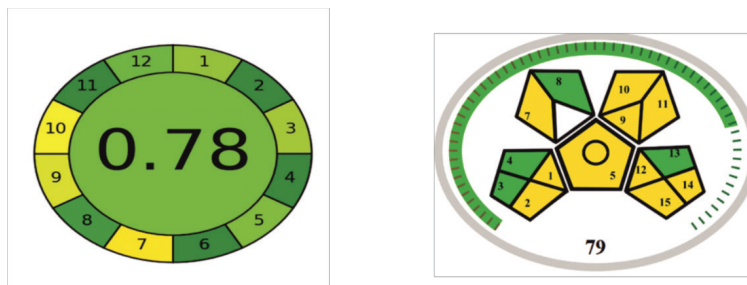


Рис. 8. Результати вивчення екологічності розробленої ВЕРХ методики інструментами AGREE та MOGAPI

амлодипіну в ЛЗ вдалося досягти шляхом зменшення використання токсичних реактивів, скорочення часу аналізу, ізократичним елююванням та мінімізацією пробопідготовки.

ВИСНОВКИ. Розроблено просту, експресну та «зелену» ВЕРХ методику визначення амлодипіну в таблетках, яка може застосовуватися для проведення контролю якості готових лікарських форм амлодипіну, вивчення стабільності, вивчення впливу змін на готові лікарські форми у разі запровадження нових виробників допоміжних

речовин, зміни технології виготовлення, зміни складу препаратів та інших процесів життєвого циклу готових лікарських форм амлодипіну. У роботі показано сучасні підходи до розробки методики з використанням QbD, окрім того, представлено апробацію різних хроматографічних колонок із різною ціною політикою. Проведено валідацію аналітичної методики. Діапазон застосування знаходився в межах від 10 до 50 мкг/мл. Інструментами AGREE (0.78) та MOGAPI (79) показано, що розроблена ВЕРХ методика є екологічно безпечною.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Gonchar A., Sholoiko N. Consumption analysis of two-component fixed combinations of medicines for arterial hypertension treatment in Ukraine as one of the stages for evaluation of their reimbursement prospects. *ScienceRise: Pharmaceutical Science*. 2022. Vol. 4, No. 38. P. 19–27. DOI: <https://doi.org/10.15587/2519-4852.2022.263733>
2. PubChem – National Library of Medicine. URL: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/> Accessed on 31 May 2024
3. European Pharmacopoeia. 11 ed. (2022). URL: <https://www.edqm.eu/en/european-pharmacopoeia-ph-eur.-11th-edition> (accessed on 22 March 2023)
4. The United States Pharmacopeia. The National Formulary. Rockville, Md.: United States Pharmacopeial Convention, Inc. URL: <https://www.uspnf.com> (accessed on 22 March 2023)
5. Jeelani S., Kouznetsova N. A new stability-indicating HPLC-UV method for determination

of amlodipine besylate and its impurities in drug substance. *Heliyon*. 2023. Vol. 9, No. 9. P. e19993.

6. Sharma M., Kothari C., Sherikar O., Mehta P. Concurrent estimation of amlodipine besylate, hydrochlorothiazide and valsartan by RP-HPLC, HPTLC and UV-spectrophotometry. *Journal of chromatographic science*. 2014. Vol. 52, № 1. P. 27–35.

7. Kavathia A., Misra M. Development and validation of RP-HPLC and UV-spectrophotometric methods for rapid simultaneous estimation of amlodipine and benazepril in pure and fixed dose combination. *Arabian journal of chemistry*. 2017. Vol. 10. P. S3021–S3028.

8. Malesuik M. D., Cardoso S. G., Bajerski L., Lanzanova, F. A. Determination of amlodipine in pharmaceutical dosage forms by liquid chromatography and ultraviolet spectrophotometry. *Journal of AOAC international*. 2006. Vol. 89, № 2. P. 359–364.

9. Maimoon S., Reddy K. N. K., Swetha P. RP-HPLC method development and validation for simultaneous estimation of Amlodipine besylate and Telmisartan

in tablet dosage form. *Indian Journal of Research in Pharmacy and Biotechnology*. 2017. Vol. 5, № 1. P. 74.

10. Mohammadi A., Rezanour N., Dogaheh M. A., Bidkorbeh F. G., Hashem M., Walker R. B. A stability-indicating high performance liquid chromatographic (HPLC) assay for the simultaneous determination of atorvastatin and amlodipine in commercial tablets. *Journal of chromatography B*. 2007. Vol. 846, № 1–2. P. 215–221.

11. Alaama M., Uddin A. H., Mohamad H. J., Amiruddin N. S., Abbas S. A. Development and validation of reversed phase high performance liquid chromatographic method for determination of amlodipine. *Tropical Journal of Pharmaceutical Research*. 2015. Vol. 14, No. 4. P. 663–669.

12. Kumaraswamy G., Ravindra N., Jyothsna B. Development and validation of a reversed-phase HPLC method for simultaneous determination of Aspirin, Atenolol and Amlodipine in capsules dosage forms. *Asian Journal of Pharmaceutical Analysis*. 2014. Vol. 4, № 3. P. 116–120.

13. Gigopulu O., Godzo H., Atanasovska B., Gjorgievska M. Z., Panovska A. P., Tonic-Ribarska J., Nakov, N. Green RP-HPLC method for impurity profile of amlodipine in tablets. *Archives of Pharmacy*. 2024. Vol. 74, № 2. P. 216–234.

14. Yenduri S., Sulthana H., Koppuravuri N. P. Sustainability evaluation of existed HPLC based analytical methods for quantification of amlodipine besylate and telmisartan using RGB model: A whiteness approach. *Green Analytical Chemistry*. 2023. Vol. 6. P. 100074.

15. Shamshad H., Naz A., Mirza A. Z. Reverse phase HPLC method for the simultaneous determination of cetirizine, verapamil / Diltiazem and amlodipine. *Analytical*

and Bioanalytical Chemistry Research. 2021. Vol. 8, № 2. P. 139–145.

16. Owolabi M. A., Soremi E. M., Ajala O. S. Reversed phase HPLC method development and validation for the analysis of amlodipine besylate in tablets dosage form and human plasma.: <https://doi.org/10.51412/psnnjp.2023.38>. *The Nigerian Journal of Pharmacy*. 2023. Vol. 57, № 2. P. 774–783. URL: <https://www.psnnjp.org/index.php/home/article/view/502>

17. Patel D. B., Mehta F. A., Bhatt K. K. Simultaneous estimation of amlodipine besylate and indapamide in a pharmaceutical formulation by a high performance liquid chromatographic (RP-HPLC) method. *Scientia pharmaceutica*. 2012. Vol. 80. P. 581.

18. Attimarad M., Venugopala K. N., SreeHarsha N., Aldhubiab B. E., Nair A. B. Validation of rapid RP-HPLC method for concurrent quantification of amlodipine and celecoxib in pure and formulation using an experimental design. *Microchemical journal*. 2020. Vol. 152. P. 104365.

19. ICH I. (2023). Q9 (R1) Quality Risk Management. In *International conference on harmonization of technical requirements for registration of Pharmaceuticals for Human use considerations*.

20. ICH Q2 (R2) Validation of Analytical Procedures – Scientific guideline. Geneva, 2023. URL: <https://www.ema.europa.eu/en/ich-q2r2-validation-analytical-procedures-scientific-guideline> (accessed on 24 June 2024).

21. Pena-Pereira F., Wojnowski W., Tobiszewski M. AGREE – Analytical GREENness metric approach and software. *Analytical chemistry*. 2020. 9 Vol. 2, № 14. P. 10076–10082.

22. Mansour F. R., Plotka-Wasylyk J., Locatelli, M. Modified GAPI (MoGAPI) tool and software for the assessment of method greenness: case studies and applications. *Analytica*. 2024. Vol. 5, № 3. P. 451–457.

REFERENCES

1. Gonchar, A., & Sholoiko, N. (2022). Consumption analysis of two-component fixed combinations of medicines for arterial hypertension treatment in Ukraine as one of the stages for evaluation of their reimbursement prospects. *ScienceRise: Pharmaceutical Science*, 4(38), 19–27. DOI: <https://doi.org/10.15587/2519-4852.2022.263733>

2. PubChem – National Library of Medicine. (2024). Retrieved from: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/> Accessed on 31 May 2024

3. European Pharmacopoeia. European Pharmacopoeia. 11 ed. (2022). Retrieved from: <https://www.edqm.eu/en/european-pharmacopoeia-ph.-eur.-11th-edition> (accessed on 22 March 2023).

4. The United States Pharmacopeia. (2021). The National Formulary. Rockville, Md.: United States Pharmacopeial Convention, Inc.; Retrieved from: <https://www.uspnf.com> (accessed on 22 March 2023) .

5. Jeelani, S., & Kouznetsova, N. (2023). A new stability-indicating HPLC-UV method for determination of amlodipine besylate and its impurities in drug substance. *Heliyon*, 9(9), e19993.

6. Sharma, M., Kothari, C., Sherikar, O., & Mehta, P. (2014). Concurrent estimation of amlodipine besylate, hydrochlorothiazide and valsartan by RP-HPLC, HPTLC and UV–spectrophotometry. *Journal of chromatographic science*, 52(1), 27–35.

7. Kavathia, A., & Misra, M. (2017). Development and validation of RP-HPLC and UV-spectrophotometric methods for rapid simultaneous estimation of amlodipine and benazepril in pure and fixed dose combination. *Arabian journal of chemistry*, 10, S3021–S3028.

8. Malesuik, M. D., Cardoso, S. G., Bajerski, L., & Lanzaova, F. A. (2006). Determination of amlodipine in pharmaceutical dosage forms by liquid chromatography and ultraviolet spectrophotometry. *Journal of AOAC international*, 89(2), 359–364.

9. Maimoon, S., Reddy, K. N. K., & Swetha, P. (2017). RP-HPLC method development and validation for simultaneous estimation of Amlodipine besylate and Telmisartan in tablet dosage form. *Indian Journal of Research in Pharmacy and Biotechnology*, 5(1), 74.

10. Mohammadi, A., Rezanour, N., Dogaheh, M. A., Bidkorbeh, F. G., Hashem, M., & Walker, R. B. (2007). A stability-indicating high performance liquid

chromatographic (HPLC) assay for the simultaneous determination of atorvastatin and amlodipine in commercial tablets. *Journal of chromatography B*, 846(1–2), 215–221.

11. Alaama, M., Uddin, A. H., Mohamad, H. J., Amiruddin, N. S., & Abbas, S. A. (2015). Development and validation of reversed phase high performance liquid chromatographic method for determination of amlodipine. *Tropical Journal of Pharmaceutical Research*, 14(4), 663–669.

12. Kumaraswamy, G., Ravindra, N., & Jyothsna, B. (2014). Development and validation of a reversed-phase HPLC method for simultaneous determination of Aspirin, Atenolol and Amlodipine in capsules dosage forms. *Asian Journal of Pharmaceutical Analysis*, 4(3), 116–120.

13. Gigopulu, O., Godzo, H., Atanasovska, B., Gjorgievska, M. Z., Panovska, A. P., Tonic-Ribarska, J., ... & Nakov, N. (2024). Green RP-HPLC method for impurity profile of amlodipine in tablets. *Archives of Pharmacy*, 74 (Notebook 2), 216–234.

14. Yenduri, S., Sulthana, H., & Koppuravuri, N. P. (2023). Sustainability evaluation of existed HPLC based analytical methods for quantification of amlodipine besylate and telmisartan using RGB model: A whiteness approach. *Green Analytical Chemistry*, 6, 100074.

15. Shamshad, H., Naz, A., & Mirza, A. Z. (2021). Reverse phase HPLC method for the simultaneous determination of cetirizine, verapamil/Diltiazem and amlodipine. *Analytical and Bioanalytical Chemistry Research*, 8(2), 139–145.

16. Owolabi, M. A., Soremi, E. M., & Ajala, O. S. (2023). Reversed phase HPLC method development and validation for the analysis of amlodipine besylate

in tablets dosage form and human plasma.: <https://doi.org/10.51412/psnnjp.2023.38>. *The Nigerian Journal of Pharmacy*, 57(2), 774–783. Retrieved from: <https://www.psnnjp.org/index.php/home/article/view/502>

17. Patel, D. B., Mehta, F. A., & Bhatt, K. K. (2012). Simultaneous estimation of amlodipine besylate and indapamide in a pharmaceutical formulation by a high performance liquid chromatographic (RP-HPLC) method. *Scientia pharmaceutica*, 80(3), 581.

18. Attimarad, M., Venugopala, K. N., SreeHarsha, N., Aldhubiab, B. E., & Nair, A. B. (2020). Validation of rapid RP-HPLC method for concurrent quantification of amlodipine and celecoxib in pure and formulation using an experimental design. *Microchemical journal*, 152, 104365.

19. ICH, I. (2023). Q9 (R1) Quality Risk Management. In *International conference on harmonization of technical requirements for registration of Pharmaceuticals for Human use considerations*.

20. ICH Q2 (R2) Validation of Analytical Procedures – Scientific guideline. (2023). Geneva. Retrieved from: <https://www.ema.europa.eu/en/ich-q2r2-validation-analytical-procedures-scientific-guideline> (accessed on 24 June 2024).

21. Pena-Pereira, F., Wojnowski, W., & Tobiszewski, M. (2020). AGREE–Analytical GREENness metric approach and software. *Analytical chemistry*, 92(14), 10076–10082.

22. Mansour, F. R., Plotka-Wasyłka, J., & Locatelli, M. (2024). Modified GAPI (MoGAPI) tool and software for the assessment of method greenness: case studies and applications. *Analytica*, 5(3), 451–457.

Адреса для листування: tverdun_mamy@tdmu.edu.ua

M. M. Horyn
IVAN HORBACHEVSKY TERNOPIL NATIONAL MEDICAL UNIVERSITY
OF THE MINISTRY OF HEALTH OF UKRAINE

OPTIMIZATION OF THE HPLC METHOD FOR THE DETERMINATION OF AMLODIPINE IN TABLETS USING THE APPROACH “QUALITY BY DESIGN”

Summary

Introduction. To ensure the safety and effectiveness of medicinal products, reliable, express and simple methods for quantitative determination of active pharmaceutical ingredients in drugs are required. Calcium channel blockers (CCBs) are often used in the treatment protocols of arterial hypertension, both in monodrugs and in combination drugs. Amlodipine (AML) is a representative of CCBs. The methods for quantitative determination of amlodipine given in pharmacopoeias have some drawbacks, therefore they need to be optimized using modern approaches.

The aim of the work was to develop a rapid, simple and “green” HPLC method for the determination of amlodipine besylate in medicinal products using Quality by Design (QbD) approaches.

Research Methods. The study was performed using a Shimadzu LC-2050 C liquid chromatograph with a diode array detector, LabSolutions software was used to obtain chromatograms and integrate the results. Chromatographic columns: Luna C8 (100 x 4.6 mm 3 μm), Luna C18 (100 x 4.6 mm 3 μm), InertClone ODS (150 x 4.6 mm 3.5 μm), Zorbax SB C8 (150 x 4.6 mm 3.5 μm) and Zorbax SB Phenyl (150 x 4.6 mm 3.5 μm). Amlodipine besylate (AML) CRS (purity ≥98%) was purchased from Sigma-Aldrich Chemicals Co. (St. Louis, MO, USA), amlodipine besylate tablets “Amlodipine” 10 mg “Farmak” was purchased from a local pharmacy.

Results and Discussion. The method was optimized using QbD, using a three-level factorial design, taking into account the main factors of the method (ratio of methanol (MeOH), triethylamine (TEA) and pH value) that affect the chromatographic response (number of theoretical plates (NTP), peak area (A), retention time (Rt) and asymmetry coefficient (Tf)). The proposed chromatographic conditions were based on isocratic elution of amlodipine besylate with a mobile phase composed of: acetonitrile (ACN) – MeOH – 0.7% TEA with adjustment

to pH 2.81 using 88% phosphoric acid in the ratio 30-35-35. Optimal chromatographic conditions: temperature – 30°C, flow rate – 1 ml/min, detection wavelength – 237 nm, retention time up to 3 min. The described conditions with satisfactory parameters of the chromatographic system were tested on various columns: Luna C8 (100 x 4.6 mm 3 µm), Luna C18 (100 x 4.6 mm 3 µm), InertClone ODS (150 x 4.6 mm 3.5 µm), Zorbax SB C8 (150 x 4.6 mm 3.5 µm). For the optimized HPLC method for the determination of amlodipine besylate in drugs, various alkyl columns can be used as a stationary phase. The developed method for the determination of amlodipine besylate is universal, because when testing different types of columns, it remains express and with satisfactory parameters of the chromatographic system. The obtained results expand the possibilities of using the developed method for laboratories with a small arsenal of chromatographic columns, since the work also shows columns with different pricing policies (Phenomenex – cheaper, Agilent – expensive). The validation of the HPLC method was carried out according to the following parameters: linearity, robustness, accuracy and precision in accordance with the requirements of the International conference on harmonization (ICH). The limit of detection (LOD) and the limit of quantification (LOQ) of the method are 1.39 µg/ml and 4.21 µg/ml, respectively. The range of application was within 10 to 50 µg/ml. The results of the study of the accuracy (99.88-101.35%) and precision (RSD < 2.0%) of the developed HPLC method meet the acceptance criteria. The principles of "green" chemistry were successfully implemented in the developed HPLC method, which was confirmed by the results of the study of environmental friendliness using the AGREE (0.78) and MOGAPI (79) tools.

Conclusions. A simple, express and "green" HPLC method for the determination of amlodipine has been developed for quality control of finished dosage forms, studying the stability of finished dosage forms, studying the impact of changes on finished dosage forms when introducing new manufacturers of excipients, when changing manufacturing technology, changing the composition of drugs and other processes of the life cycle of finished dosage forms of amlodipine.

KEY WORDS: amlodipine besylate; quantification; HPLC; Quality by Design; tablets.