

Hai phương pháp định lượng Amlodipine besilate và Atorvastatin calcium trong chế phẩm bằng phép đo quang phổ bước sóng kép

Nguyễn Đức Thiện*, Nguyễn Thị Mỹ Linh, Lê Thị Phương Anh, Điều Diễm Quỳnh

Trường Đại học Dược Hà Nội, 13-15 Lê Thánh Tông, phường Phan Chu Trinh, quận Hoàn Kiếm, Hà Nội, Việt Nam

Ngày nhận bài 23/9/2021; ngày chuyển phản biện 27/9/2021; ngày nhận phản biện 15/10/2021; ngày chấp nhận đăng 20/10/2021

Tóm tắt:

Hai phương pháp đo bằng quang phổ đơn giản, rõ ràng, chính xác dựa vào việc lựa chọn 2 bước sóng được phát triển để xác định đồng thời Amlodipine besilate (AML) và Atorvastatin calcium (ATO) dạng bào chế viên nén trên thị trường. Phương pháp hiệu biên độ độ hấp thụ tỷ lệ sử dụng 2 bước sóng là 238 và 288 nm. Phương pháp hiệu biên độ độ hấp thụ tỷ lệ cho các thông số: khoảng tuyến tính 4-40 µg/ml; độ đúng với AML là 100,22±0,7856, ATO là 100,12±0,6439; độ lặp lại với AML là 0,9122, ATO là 0,8968. Phương pháp tỷ lệ hấp thụ sử dụng 2 bước sóng là 221 và 238 nm. Phương pháp tỷ lệ hấp thụ cho các thông số: khoảng tuyến tính 4-40 µg/ml; độ đúng với AML là 100,6±0,9562, ATO là 100,86±0,8596; độ lặp lại với AML là 1,0124, ATO là 1,1045. Cả 2 phương pháp này đều cho thấy có thể định lượng AML và ATO trong hỗn hợp của chúng mà không cần bất kỳ sự tách chiết nào cả. Phương pháp hiệu biên độ độ hấp thụ tỷ lệ cho thấy khả năng áp dụng nhanh, đơn giản đối với cả hỗn hợp thuốc trong phòng thí nghiệm và thuốc thương mại.

Từ khóa: Amlodipine besilate, Atorvastatin calcium, hỗn hợp, phân tích, phổ tỷ lệ.

Chỉ số phân loại: 3.4

1. Đặt vấn đề

AML có công thức hóa học $C_{26}H_{31}ClN_2O_8S$, là thuốc được dùng lâu dài để điều trị tăng huyết áp và cơn đau thắt ngực mãn tính [1]. ATO là thuốc hạ lipid máu tổng hợp và là chất ức chế men khử 3-hydroxy-3-methyl-glutaryl coenzyme A (HMG-coA). Men này xúc tác cho sự biến đổi của HMG-CoA thành mevalonate, một bước đầu tiên và quyết định về mức độ trong quá trình tổng hợp cholesterol. Công thức hóa học của ATO là $(C_{33}H_{34}FN_2O_5)_2Ca_2H_2O$ và trọng lượng phân tử là 1209,42 [2].

Có nhiều phương pháp được báo cáo cho xác định AML và ATO ở các dạng bào chế khác nhau để ước tính nồng độ AML và ATO trong hỗn hợp 2 chất này [3, 4], bao gồm sắc ký, quang phổ, điện hóa và hóa học. Các phương pháp sắc ký, điện hóa và hóa học thường đòi hỏi các bước chuẩn bị phức tạp, kỹ lưỡng, đôi khi cần thiết bị đắt tiền. Trong khi đó, phương pháp quang phổ UV-Vis chỉ cần thiết bị máy quang phổ có sẵn trong các phòng thí nghiệm phân tích và không yêu cầu chuẩn bị phức tạp. Trong bài báo này, chúng tôi trình bày 2 phương pháp sử dụng quang phổ bước sóng kép là phương pháp hiệu biên độ độ hấp thụ tỷ lệ [5] và phương pháp tỷ lệ hấp thụ ở 2 bước sóng [6] để xác định đồng thời AML và ATO ở dạng bào chế trong phòng thí nghiệm và dạng viên nén trên thị trường.

*Tác giả liên hệ: Email: thiennd@hup.edu.vn

2. Đối tượng và phương pháp nghiên cứu

Các chất chuẩn AML hàm lượng 99,8%, ATO hàm lượng 99,84% nguồn gốc từ Viện Kiểm nghiệm thuốc Trung ương. Ethanol và HCl đạt tiêu chuẩn phân tích. Dung môi pha mẫu là hỗn hợp dung dịch ethanol 96% và HCl 0,1 N với tỷ lệ thể tích là 3:2. Các chế phẩm có chứa đồng thời AML và ATO gồm: viên nén Zoamco-A tỷ lệ 5 mg/10 mg (Công ty Cổ phần Pymepharco, Việt Nam, số lô 201220), viên nén Caduet tỷ lệ 5 mg/20 mg (Công ty Pfizer, Mỹ, số lô DD6231).

Để định lượng hoạt chất trong các chế phẩm sử dụng 20 viên đem nghiền mịn và cân chính xác một lượng tương đương với 8 mg AML và 8 mg ATO, cho tương ứng vào 2 bình định mức 100 ml, thêm dung môi, lắc, siêu âm khoảng 20 phút và thêm dung môi cho vừa đủ 100 ml. Tiến hành lọc loại bỏ 20-30 ml dịch lọc đầu. Tiếp đến, mỗi bình lấy 8 ml dịch lọc cho vào bình định mức 100 ml, thêm dung môi vừa đủ, được dung dịch AML nồng độ 80 µg/ml và ATO nồng độ 80 µg/ml, lắc đều. Phép đo quang phổ được thực hiện với máy quang phổ Hitachi U1900 UV-Vis được kết nối với máy vi tính (hệ điều hành Window) bằng phần mềm chuyên dụng Solution 2.2. Chế độ: bước sóng bắt đầu là 200 nm - kết thúc 400 nm; kiểu dữ liệu: độ hấp thụ A; độ rộng 4,0 nm; tốc độ quét: 100 nm/phút; cuvet thạch anh 1 cm. Phổ thu sẽ được sơ bộ lọc nhiễu bằng bộ lọc Savitzky Galay (số lần 2, số điểm 15).

Two methods for determination of a binary mixture of Amlodipine besylate and Atorvastatin calcium using dual-wavelength spectrophotometry

Duc Thien Nguyen*, Thi My Linh Nguyen,
Thi Phuong Anh Le, Diem Quynh Dieu

Ha Noi University of Pharmacy,

13-15 Le Thanh Tong Street, Phan Chu Trinh Ward, Hoan Kiem District, Hanoi, Vietnam

Received 23 September 2021; revised 15 October 2021; accepted 20 October 2021

Abstract:

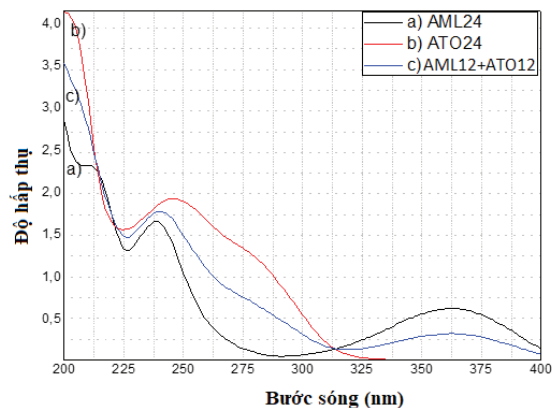
Two simple, clear, and accurate spectrophotometric methods based on two-wavelength selections, were developed for the simultaneous determination of Amlodipine besylate (AML) and Atorvastatin calcium (ATO) in tablet dosage forms. The ratio difference method uses amplitudes between 238 and 288 nm. The measured amplitudes for the parameters: linear range 4-40 $\mu\text{g/ml}$; precision for AML is 100.22 ± 0.7856 , repeatability is 0.9122, precision for ATO is 100.12 ± 0.6439 , repeatability is 0.8968. The absorption ratio method using two wavelengths is 221 and 238 nm. The absorption rate method for parameters: linear range 4-40 $\mu\text{g/ml}$; precision for AML is 100.6 ± 0.9562 , repeatability is 1.0124, precision for ATO is 100.86 ± 0.8596 , repeatability is 1.1045. Both quantitative methods showed that AML and ATO could be quantified in their mixtures without any extraction at all. The absorption ratio method exhibited quick, simple applicability to both laboratory and commercial drug mixtures.

Keywords: Amlodipine besylate, analysis, Atorvastatin calcium, binary mixtures, ratio spectra.

Classification number: 3.4

3. Kết quả

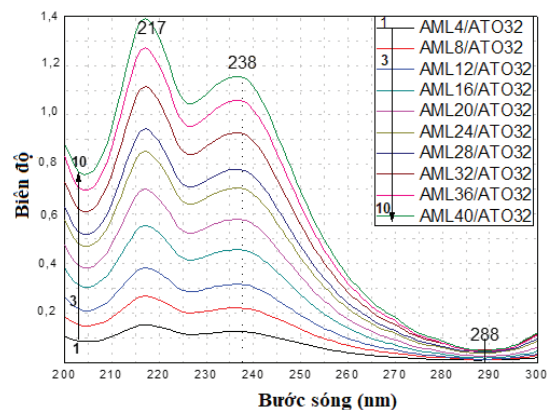
Tiến hành đo phổ hấp thụ của các dung dịch chuẩn AML 24 $\mu\text{g/ml}$, ATO 24 $\mu\text{g/ml}$ và dung dịch hỗn hợp AML 12 $\mu\text{g/ml}$ + ATO 12 $\mu\text{g/ml}$ trong khoảng bước sóng 200-400 nm.



Hình 1. Phổ hấp thụ của 24 $\mu\text{g/ml}$ AML (a), 24 $\mu\text{g/ml}$ ATO (b) và 12 $\mu\text{g/ml}$ AML với 12 $\mu\text{g/ml}$ ATO (c) sử dụng dung môi (3 ethanol 96%: 1 HCl 0,1 N) làm mẫu trắng.

Kết quả đo phổ của AML và ATO nồng độ 24 $\mu\text{g/ml}$ ở hình 1 cho thấy, 2 phổ này có sự chồng chất lên nhau trong vùng UV-Vis. Điều này gây cản trở việc sử dụng phương pháp đo quang phổ UV thông thường để xác định đồng thời chúng trong hỗn hợp nhị phân. Còn kết quả đo phổ hấp thụ của dung dịch hỗn hợp ở hình 1 cho biết độ hấp thụ của hỗn hợp có tính chất cộng tính trong khoảng 200-300 nm.

3.1. Phương pháp hiệu biên độ độ hấp thụ tỷ lệ ở 2 bước sóng

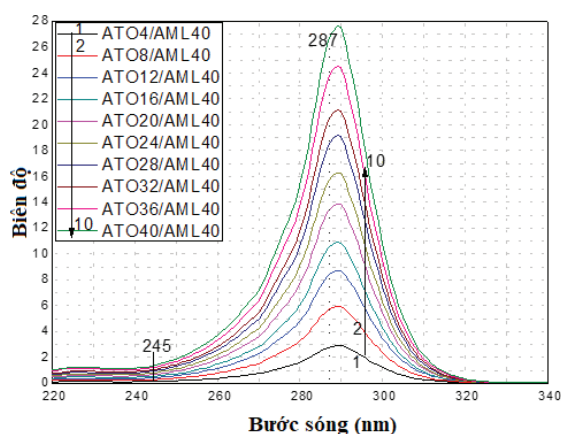


Hình 2. Phổ hấp thụ tỷ lệ của AML (nồng độ 4-40 $\mu\text{g/ml}$) sử dụng phổ ATO (nồng độ 32 $\mu\text{g/ml}$) là thừa số và dung môi (3 ethanol 96%: 1 HCl 0,1 N) làm mẫu trắng.

Đo phổ hấp thụ của các dung dịch chuẩn AML có nồng độ 4-40 $\mu\text{g/ml}$ (mỗi dung dịch cách nhau 4 $\mu\text{g/ml}$) với mẫu trắng là dung môi. Sau đó, vẽ và chồng phổ hấp thụ tỷ lệ của AML (nồng độ 4-40 $\mu\text{g/ml}$), sử dụng phổ ATO (nồng độ 32 $\mu\text{g/ml}$) là thừa số và ethanol làm mẫu trắng (hình 2). Từ giá trị phổ hấp thụ tỷ lệ có thể chọn các cặp bước bất kỳ để

hiệu biên độ của độ hấp thụ có giá trị tăng hay giảm tuyến tính. Với AML các cặp bước sóng như 217-227, 217-238 và 217-288 nm không được lựa chọn vì độ tuyến tính kém. Chúng tôi tiếp tục lựa chọn 217-238, 227-288, 238-288 và 238-288 nm cho kết quả tốt nhất. Tương quan tuyến tính thu được giữa hiệu biên độ độ hấp thụ tỷ lệ ở 238-288 nm của các dung dịch chuẩn AML nồng độ 4-40 $\mu\text{g/ml}$ với thừa số ATO 32 $\mu\text{g/ml}$ có dạng:

$\Delta P_{238-288} = 0,0279.C - 0,0137$, với hệ số tương quan $r = 0,9988$ (trong đó C là nồng độ dung dịch chuẩn AML tính bằng $\mu\text{g/ml}$, ΔP là hiệu biên độ độ hấp thụ ở 2 bước sóng 238 và 288 nm).



Hình 3. Phổ hấp thụ tỷ lệ của ATO (nồng độ 4-40 $\mu\text{g/ml}$) sử dụng phổ AML (nồng độ 40 $\mu\text{g/ml}$) là thừa số và dung môi (3 ethanol 96%: 1 HCl 0,1 N) làm mẫu trắng.

Đo phổ hấp thụ của các dung dịch chuẩn ATO có nồng độ 4-40 $\mu\text{g/ml}$ (mỗi dung dịch cách nhau 4 $\mu\text{g/ml}$) với mẫu trắng là dung môi. Sau đó vẽ và chồng phổ hấp thụ tỷ lệ của ATO (nồng độ 4-40 $\mu\text{g/ml}$) sử dụng phổ AML (nồng độ 40 $\mu\text{g/ml}$) là thừa số và dung môi làm mẫu trắng (hình 3). Từ giá trị độ hấp thụ của phổ tỷ lệ đối với ATO các cặp bước sóng 245-227, 300-230, 287-227 và 287-235 nm được lựa chọn và cho thấy hiệu biên độ tỷ lệ cho độ tuyến tính thấp. Tiếp tục lựa chọn các cặp bước sóng khác nhau và chúng tôi xác định được cặp 287-245 nm cho kết quả tốt nhất. Tương quan tuyến tính thu được giữa hiệu biên độ độ hấp thụ tỷ lệ ở 287-245 nm của các dung dịch chuẩn ATO nồng độ 4-40 $\mu\text{g/ml}$ với thừa số AML 40 $\mu\text{g/ml}$ có dạng: $\Delta P_{287-245} = 0,6084.C + 0,3307$ và hệ số tương quan $r = 0,9993$ (trong đó, C là nồng độ dung dịch chuẩn ATO tính bằng $\mu\text{g/ml}$, ΔP là hiệu biên độ độ hấp thụ ở 2 bước sóng 287 và 245 nm).

Các dung dịch hỗn hợp của 2 chất AML và ATO được pha chuẩn với các tỷ lệ như ở bảng 1 và được đo phổ hấp thụ từ 200 đến 400 nm. Phổ hấp thụ thu được sẽ được chia cho phổ ATO (nồng độ 40 $\mu\text{g/ml}$) là thừa số khi xác định nồng độ AML trong dung dịch hỗn hợp và chia cho phổ AML (nồng độ 40 $\mu\text{g/ml}$) là thừa số khi xác định nồng độ ATO

trong dung dịch hỗn hợp. Kết quả xác định nồng độ AML và ATO trong các dung dịch hỗn hợp với tỷ lệ xác định được cho ở bảng 1.

Bảng 1. Kết quả xác định nồng độ AML và ATO trong hỗn hợp được chế tạo tại phòng thí nghiệm bằng 2 phương pháp.

Nồng độ (µg/ml)		Phương pháp hiệu biên độ độ hấp thụ tỷ lệ (hàm lượng % so với nhân, nồng độ µg/ml)		Phương pháp tỷ lệ hấp thụ (hàm lượng % so với nhân)	
AML	ATO	AML	ATO	AML	ATO
8	8	100,75 (8,06)	99,38 (7,95)	101,13 (8,09)	99,13 (7,93)
8	16	100,63 (8,05)	100,51 (16,08)	101,50 (8,12)	100,88 (16,14)
8	24	99,38 (7,95)	100,25 (24,06)	99,50 (7,96)	100,96 (24,23)
16	8	100,31 (16,05)	99,38 (7,95)	101,38 (16,22)	101,38 (8,11)
16	24	100,44 (16,07)	100,42 (24,10)	100,81 (16,13)	101,08 (24,26)
24	8	99,63 (23,91)	99,38 (7,95)	99,58 (23,90)	101,50 (8,12)
24	16	100,38 (24,08)	100,75 (16,12)	100,63 (24,15)	101,32 (16,21)
Trung bình		100,22	100,01	100,65	100,89
SD		0,5139	0,6075	0,6869	0,8098
RSD (%)		0,5128	0,6074	0,6825	0,8026

3.2. Phương pháp tỷ lệ hấp thụ

Hình 1 cho phổ hấp thụ của AML có đỉnh hấp thụ cực đại ở 2 bước sóng 238 và 362,5 nm; phổ hấp thụ ATO có đỉnh hấp thụ cực đại ở 245,5 nm; phổ của dung dịch hỗn hợp AML và ATO có nồng độ bằng nhau thì cho 2 điểm cắt 2 phổ thành phần ở 2 điểm có bước sóng là 214 và 221 nm (λ_{iso}). Chúng tôi lựa chọn $\lambda_1 = \lambda_{iso} = 221$ nm và $\lambda_2 = 238$ nm để tiến hành xác định nồng độ của AML và ATO trong các tính toán thêm chuẩn và trong tính toán với chế phẩm trên thị trường.

Phương trình hồi quy độ hấp thụ của AML trong khoảng nồng độ 4-40 $\mu\text{g/ml}$, đựng bằng cuvet thạch anh 1 cm với bước sóng 221 nm là $y = 0,0673x + 0,0202$ (hệ số $r = 0,9987$); với bước sóng 238 nm là $y = 0,0686x - 0,0091$ (hệ số $r = 0,9988$). Từ 2 phương trình này ta có $a_{x1} = 0,673$, $a_{x2} = 0,686$.

Phương trình hồi quy độ hấp thụ của ATO trong khoảng nồng độ 4-40 $\mu\text{g/ml}$, đựng bằng cuvet thạch anh 1 cm với bước sóng 221 nm là $y = 0,0688x + 0,0377$ (hệ số $r = 0,9983$); với bước sóng 238 nm là $y = 0,0772x + 0,0324$ (hệ số $r = 0,9993$). Từ 2 phương trình này ta có $a_{y1} = 0,688$, $a_{y2} = 0,686$. Để xác định nồng độ của AML và ATO theo phương pháp tỷ lệ hấp thụ ta sử dụng công thức sau:

$$C_{AML} = \frac{Q_M - Q_Y}{Q_X - Q_Y} \times \frac{A_1}{a_{x1}} \quad \text{và} \quad C_{ATO} = \frac{Q_M - Q_X}{Q_Y - Q_X} \times \frac{A_1}{a_{y1}}$$

trong đó: $Q_M = A_2/A_1$, $Q_X = a_{x2}/a_{x1}$ và $Q_Y = a_{y2}/a_{y1}$; A_1 và A_2 là độ hấp thụ của dung dịch hỗn hợp ở $\lambda_1 = \lambda_{iso} = 221$ nm và $\lambda_2 = \lambda_{maxAML} = 238$ nm.

Kết quả xác định nồng độ AML và ATO trong các dung dịch hỗn hợp với tỷ lệ lựa chọn pha chế trong phòng thí nghiệm được xác định cho ở bảng 1.

Sử dụng 2 phương pháp để xác định nồng độ 2 hoạt chất AML và ATO trong các dung dịch hỗn hợp được tạo ra từ các viên nén Zoamco-A và Caduet bằng kỹ thuật thêm chuẩn, các kết quả thu được thể hiện ở bảng 2.

Bảng 2. Kết quả xác định nồng độ AML và ATO trong viên nén bằng 2 phương pháp với kỹ thuật thêm chuẩn.

Biệt dược	Hoạt chất	Thêm chuẩn		Phương pháp hiệu biên độ độ hấp thụ tỷ lệ		Phương pháp tỷ lệ hấp thụ	
		Ban đầu	Thêm	Khối lượng*	%	Khối lượng*	%
Zoamco-A	AML	6	4	3,956	98,80	3,945	98,63
			6	5,962	99,37	5,954	99,23
			8	8,028	100,35	8,058	100,73
		Trung bình			99,51		99,53
		SD			0,7840		1,0817
		RSD			0,7879		1,0968
	ATO	12	8	8,028	100,35	7,922	99,03
			12	11,961	99,68	11,879	98,99
		16	16,084	100,53	16,094	100,59	
			Trung bình		100,19		99,54
Caduet	AML	6	4	3,961	99,03	3,938	98,45
			6	6,012	100,2	6,025	100,42
			8	8,024	100,3	8,032	100,40
		Trung bình			99,84		99,76
		SD			0,6790		1,1316
		RSD			0,6803		1,1344
	ATO	16	14	14,105	100,75	14,176	101,26
			22	22,138	100,63	22,149	100,68
		26	25,855	99,44	25,872	99,50	
			Trung bình		100,27		100,48
		SD			0,7242		0,8968
		RSD			0,7222		0,8926

*: khối lượng tìm được là giá trị trung bình của 10 lần.

Các thông số thẩm định phương pháp phân tích được thực hiện theo yêu cầu của ICH [7] được thể hiện ở bảng 3. Với phương pháp hiệu biên độ độ hấp thụ tỷ lệ các thông số thẩm định có đầy đủ trong bảng 3. Còn phương pháp tỷ lệ hấp thụ xác định nồng độ của AML và ATO sử dụng theo các công thức nên bảng 3 không có các thông số đánh giá như độ dốc, hệ số chặn và hệ số tương quan.

Bảng 3. Các thông số thẩm định phương pháp phân tích xác định nồng độ đồng thời AML và ATO trong một hỗn hợp.

Thông số đánh giá	Phương pháp hiệu biên độ độ hấp thụ tỷ lệ		Phương pháp tỷ lệ hấp thụ	
	AML	ATO	AML	ATO
Độ đúng (trung bình±RSD)	100,22±0,7856	100,12±0,6439	100,67±0,9562	100,86±0,8596
Độ chính xác				
Độ lặp lại ^a	0,9122	0,8968	1,0124	1,1045
Độ chụm trung gian ^b	1,0786	1,0142	1,1044	1,1127
Độ ổn định ^c	0,976	1,0011	1,0284	1,1126
Độ dốc	0,0279	0,6084	-	-
Hệ số chặn	-0,0137	0,3307	-	-
Hệ số tương quan	0,9988	0,9993	-	-
Khoảng tuyến tính (µg/ml)	4-40	4-40	4-40	4-40

a: trung bình của 3 nồng độ 12, 16 và 20 µg/ml chất AML và ATO 3 lần trong 1 ngày; b: trung bình của 3 nồng độ 12, 16 và 20 µg/ml chất AML và ATO 3 lần trong 3 ngày; c: trung bình của 3 nồng độ 12, 16 và 20 µg/ml chất AML và ATO sử dụng 75 và 80% dung môi.

4. Bàn luận

Hai phương pháp xác định AML và ATO đều sử dụng 2 bước sóng để phân tích hỗn hợp 2 chất. Trong đó, phương pháp hiệu biên độ độ hấp thụ cho phép lựa chọn 2 bước sóng bất kỳ để xác định nồng độ 2 chất, còn phương pháp tỷ lệ hấp thụ sẽ phải lựa chọn một bước sóng có độ hấp thụ cực đại và một bước sóng có độ hấp thụ 2 chất bằng nhau (λ_{iso}). Điều này cho thấy, phương pháp hiệu biên độ độ hấp thụ tỷ lệ có nhiều ưu điểm hơn và có nhiều lựa chọn hơn. Phương pháp hiệu biên độ độ hấp thụ tỷ lệ cũng có ưu điểm hơn là sử dụng đơn giản, chỉ cần một bước lập tỷ lệ và một bước trừ 2 đỉnh của phổ tỷ lệ.

So với phương pháp quang phổ đạo hàm thì 2 phương pháp này không phải tìm một bước sóng thích hợp tương ứng với điểm giao nhau với hợp chất gây nhiễu [8]. Hoặc một số hợp chất còn phải sử dụng đạo hàm bậc cao (3 hoặc 4) để xác định một chất mà không bị nhiễu từ chất kia [9]. Với phương pháp sắc ký lỏng hiệu năng cao thì dung môi đắt tiền, điều kiện phân tích phức tạp, nhưng đây vẫn là phương pháp thường được sử dụng trong Dược điển của các nước trên thế giới [10]. Có thể thấy rằng, phương pháp hiệu biên độ độ hấp thụ tỷ lệ rất phù hợp để phân tích kiểm soát chất lượng thường quy của các hợp chất thương mại trong các phòng kiểm soát chất lượng ở các công ty sản xuất dược phẩm, cũng như ở các trung tâm kiểm nghiệm thuốc và mỹ phẩm các tỉnh, thành phố.

5. Kết luận

Có thể nhận thấy rằng, phương pháp hiệu biên độ độ hấp thụ tỷ lệ là đơn giản, chính xác, có tính chọn lọc và hoàn toàn có thể được sử dụng để xác định nồng độ các chất trong

một hỗn hợp gồm 2 thành phần. Phương pháp tỷ lệ hấp thụ cũng có thể dùng để xác định nồng độ các chất trong một hỗn hợp gồm 2 thành phần nhưng các phép tính toán phức tạp, độ chính xác không cao. Trong phương pháp tỷ lệ hấp thụ sử dụng 2 bước sóng: một là bước sóng có độ hấp thụ cực đại của một chất, bước sóng thứ 2 là ở bước sóng mà 2 chất ở cùng nồng độ có độ hấp thụ bằng nhau. Phương pháp hiệu biên độ độ hấp thụ tỷ lệ sử dụng 2 bước sóng là đỉnh đến đáy hoặc là 2 bước sóng bất kỳ. Ưu điểm lớn của phương pháp hiệu biên độ độ hấp thụ tỷ lệ là có thể lựa chọn 2 bước sóng bất kỳ để xét hiệu biên độ, thừa số chia của tỷ lệ cũng có nhiều lựa chọn. Ngoài ra, phương pháp hiệu biên độ độ hấp thụ tỷ lệ có thể sử dụng được trong điều kiện các phòng thí nghiệm thiếu các dụng cụ sắc ký đắt tiền, hợp chất phân tích không cần chiết tách phức tạp.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- [1] H. Fares, J.J. Dinicolantonio, J.H. O'keefe, et al. (2016), "Amlodipine in hypertension: A first-line agent with efficacy for improving blood pressure and patient outcomes", *Open Heart*, **3**(2), DOI: 10.1136/openhrt-2016-000473.
- [2] T. Elsaman, E. Ibrahim, M.E. Adam (2020), "Development and validation of uv-spectrophotometric method for the determination of Atorvastatin calcium using sodium citrate as hydrotropic agent", *Pharm. Chem. J.*, **54**(4), pp.422-429, DOI: 10.1007/s11094-020-02214-x.
- [3] N. Shulyak, M. Piponski, S. Kovalenko, et al. (2021), "Development of a novel, fast, simple HPLC method for determination of Atorvastatin and its impurities in tablets", *Sci. Pharm.*, **89**(2), DOI: 10.3390/scipharm89020016.
- [4] H. Danafar, M. Hamidi (2016), "Method validation of Amlodipine and Atorvastatin by liquid chromatography-mass spectrometry (LC-MS) method in human plasma", *Cogent Med.*, **3**(1), DOI: 10.1080/2331205X.2015.1129790.
- [5] E.S. Elzanfaly, A.S. Saadn, A.E.B.A. Elaleem (2012), "A smart simple spectrophotometric method for simultaneous determination of binary mixtures", *J. Pharm. Anal.*, **2**(5), pp.382-385, DOI: 10.1016/j.jpha.2012.04.004.
- [6] H.M. Lotfy, M.A.M. Hegazy (2013), "Simultaneous determination of some cholesterol-lowering drugs in their binary mixture by novel spectrophotometric methods", *Spectrochim. Acta - Part A Mol. Biomol. Spectrosc.*, **113**, pp.107-114, DOI: 10.1016/j.saa.2013.04.064.
- [7] P. Borman, D. Elder (2017), "Q2(R1) validation of analytical procedures", *ICH Quality Guidelines: An Implementation Guide*, pp.127-166, DOI: 10.1002/9781118971147.ch5.
- [8] E.H. Mohamed, H.M. Lotfy, M.A. Hegazy, et al. (2017), "Different applications of isosbestic points, normalized spectra and dual wavelength as powerful tools for resolution of multicomponent mixtures with severely overlapping spectra", *Chem. Cent. J.*, **11**(1), DOI: 10.1186/s13065-017-0270-8.
- [9] C.M.E. Maraghy, E.H. Mohamed (2018), "Successive stability indicating spectrophotometric technique for simultaneous determination of que-tiapine fumarate and its three major related compounds", *Curr Anal. Chem.*, **16**(4), pp.447-455, DOI: 10.2174/1573411014666180709145526.
- [10] K. Peleshok, M. Piponski, E.A. Ajie, et al. (2021), "Novel HPLC-UV method for simultaneous determination of valsartan and atenolol in fixed dosage form; Study of green profile assessment", *Pharmacia*, **68**(1), pp.43-51, DOI: 10.3897/pharmacia.68.e53631.