

SIMULTANEOUS QUANTITATIVE DETERMINATION OF HYDROCHLOROTHIAZIDE AND IRBESARTAN BY HIGH PERFORMANCE LIQUID CHROMATOGRAPHY

Doan Phu Quy*, Le Thi Thu Cuc, Nguyen Dang Khoa, Nguyen Nhat Thanh
 Nguyen Tat Thanh University

ARTICLE INFO		ABSTRACT
Received:	24/9/2024	In this study, an HPLC method for the simultaneous analysis of hydrochlorothiazide and irbesartan in pharmaceutical formulations was developed and validated. The chromatographic separation was performed on a Nucleosil 100 column (250 x 4.6 mm; 5 μ m). The mobile phase consisted of two solvents: Mobile Phase A (0.1% trifluoroacetic acid in water) and Mobile Phase B (0.1% trifluoroacetic acid in acetonitrile). A gradient elution program was employed with a flow rate maintained at 1.5 mL/min, and the injection volume was set to 20 μ L. Detection was carried out at a wavelength of 205 nm. The results demonstrated good linearity ($R^2 > 0.999$) with linear regression equations of $y = 49739x$ for HCTZ and $y = 118902x$ for IRB. The accuracy and precision of the method met the required criteria, with an RSD of less than 2%. The average recovery rate ranged from 100.29% to 101.95% for HCTZ and from 99.14% to 100.18% for IRB. The validation data showed that the method was validated according to the guidelines and met the ASEAN requirements for analytical method validation.
Revised:	29/10/2024	
Published:	30/10/2024	
KEYWORDS		
Hydrochlorothiazide		
Irbesartan		
High perform liquid chromatography		
HPLC		
PDA		

ĐỊNH LƯỢNG ĐỒNG THỜI HYDROCHLOROTHIAZID VÀ IRBESARTAN BẰNG PHƯƠNG PHÁP SẮC KÝ LỎNG HIỆU NĂNG CAO

Đoàn Phú Quý*, Lê Thị Thu Cúc, Nguyễn Đăng Khoa, Nguyễn Nhật Thanh
 Trường Đại học Nguyễn Tất Thành

THÔNG TIN BÀI BÁO		TÓM TẮT
Ngày nhận bài:	24/9/2024	Trong nghiên cứu này, một phương pháp sắc ký lỏng hiệu năng cao để phân tích đồng thời hydrochlorothiazide và irbesartan trong các công thức dược phẩm đã được phát triển và xác nhận. Phân tách sắc ký được thực hiện trên cột Nucleosil 100 (250 x 4,6 mm; 5 μ m). Pha động bao gồm hai dung môi: Pha động A (axit trifluoroacetic 0,1% trong nước) và Pha động B (axit trifluoroacetic 0,1% trong acetonitril). Chương trình rửa giải gradient được sử dụng với tốc độ dòng chảy được duy trì ở mức 1,5 mL/phút và thể tích tiêm được đặt ở mức 20 μ L. Phát hiện được thực hiện ở bước sóng 205 nm. Kết quả chứng minh tính tuyến tính tốt ($R^2 > 0,999$) với các phương trình hồi quy tuyến tính $y = 49739x$ đối với HCTZ và $y = 118902x$ đối với IRB. Độ chính xác và độ tin cậy của phương pháp đáp ứng các tiêu chí yêu cầu, với RSD nhỏ hơn 2%. Tỷ lệ thu hồi trung bình dao động từ 100,29% đến 101,95% đối với HCTZ và từ 99,14% đến 100,18% đối với IRB. Dữ liệu xác nhận cho thấy phương pháp đã được xác nhận theo các hướng dẫn và đáp ứng các yêu cầu của ICH về xác nhận phương pháp phân tích.
Ngày hoàn thiện:	29/10/2024	
Ngày đăng:	30/10/2024	
TỪ KHÓA		
Hydrochlorothiazide		
Irbesartan		
Sắc ký lỏng hiệu năng cao		
HPLC		
PDA		

DOI: <https://doi.org/10.34238/tnu-jst.11177>

* Corresponding author. Email: doanphuquy17071986@gmail.com

1. Đặt vấn đề

Trong bối cảnh sức khỏe hiện nay tại Việt Nam, bệnh tăng huyết áp và bệnh tim mạch đang là các vấn đề quan trọng, đặc biệt là trong dân số người lớn tuổi. Bệnh tăng huyết áp được coi là yếu tố nguy cơ tim mạch hàng đầu, gây tỷ lệ tử vong và mắc bệnh cao hơn so với nhiều nguyên nhân khác như hút thuốc lá hoặc tăng đường huyết. Tuy có nhiều thuốc chống tăng huyết áp khả dụng, nhưng một số không ít các bệnh nhân không đạt được chỉ số huyết áp mong muốn và vì vậy vẫn có nguy cơ tim mạch cao.

Việc kết hợp tác dụng của nhiều dược chất khác nhau sẽ cung cấp giải pháp điều trị hiệu quả hơn. Irbesartan (IRB) phối hợp với hydrochlorothiazid (HCTZ) với liều cố định là một liệu pháp phối hợp chống tăng huyết áp được công nhận để điều trị bệnh nhân không kiểm soát được huyết áp một cách thỏa đáng bằng đơn trị liệu và để điều trị ban đầu cho bệnh nhân có khả năng cần dùng nhiều thuốc để đạt được huyết áp mong muốn [1], [2].

Ngành công nghiệp dược phẩm ngày càng phát triển đã tạo điều kiện thuận lợi cho việc xuất hiện ngày càng phổ biến các chế phẩm kết hợp nhiều dược chất với nhau [3] – [5]. Do đó, việc phát triển các phương pháp phân tích các chế phẩm đa thành phần sẽ là một đóng góp quan trọng trong công tác kiểm tra chất lượng thuốc trên thị trường [6]-[10]. Đã có công trình trong nước phân tích đồng thời hai hợp chất hydrochlorothiazide và irbesartan bằng phương pháp LC/MS/MS. Tuy nhiên, phương pháp HPLC có nhiều ưu điểm quan trọng so với LC/MS/MS khi xét về chi phí, tính đơn giản trong vận hành, tính ứng dụng rộng rãi, và khả năng xử lý các mẫu không phức tạp. HPLC thích hợp cho các phòng thí nghiệm có nguồn lực hạn chế hoặc không cần độ nhạy quá cao, trong khi LC/MS/MS mạnh hơn ở khả năng phân tích mẫu phức tạp và yêu cầu độ nhạy rất cao.

Tính mới của nghiên cứu này nằm ở việc phát triển một phương pháp HPLC với các cải tiến về pha động, cột sắc ký, chương trình rửa giải gradient để phân tích đồng thời hydrochlorothiazide và irbesartan trong các công thức dược phẩm. Kết quả của nghiên cứu này có thể cung cấp thêm một phương pháp kiểm nghiệm nhằm đảm bảo kiểm soát tốt chất lượng dược phẩm trước khi đến tay người bệnh. Phương pháp này đã được xác nhận đầy đủ theo các tiêu chí của ASEAN, đảm bảo tính chính xác, độ nhạy và tính ổn định cao, với khả năng phát hiện và thu hồi tốt, đồng thời tối ưu hóa quy trình để đạt được kết quả đáng tin cậy trong thời gian ngắn.

Trong bài báo này, chúng tôi giới thiệu kết quả về xây dựng quy trình phân tích đồng thời hydrochlorothiazid và irbesartan bằng phương pháp sắc ký lỏng hiệu năng cao (HPLC).

2. Nguyên liệu và phương pháp

2.1. Chất đối chiếu, trang thiết bị, dung môi và hóa chất

Hydrochlorothiazid số lô: QT3000224 - Viện Kiểm nghiệm thuốc TP. Hồ Chí Minh, hàm lượng 99,5% tính trên chế phẩm nguyên trạng.

Irbesartan - Số lô: QT2010822 – Viện Kiểm nghiệm thuốc TP. Hồ Chí Minh, hàm lượng 99,6% tính trên chế phẩm nguyên trạng.

Trang thiết bị:

Máy sắc ký lỏng hiệu năng cao SHIMADZU LC 20-AD, đầu dò DAD

Cột sắc ký Nucleosil 100 (250 x 4,6 mm; 5 µm)

Cân phân tích điện tử Mettler Toledo

Dung môi và hóa chất:

Các loại dung môi dùng cho HPLC: Acetonitril, methanol, acid trifluoroacetic (TFA)

2.2. Đối tượng nghiên cứu

Viên nén IHYBES – H150 số lô: 040523, ngày sản xuất 24/05/23, hạn dùng 24/05/26, nhà sản xuất: CPDP Agimexpharm.

2.3. Phương pháp nghiên cứu

2.3.1. Xây dựng quy trình phân tích đồng thời hydrochlorothiazide và irbesartan bằng phương pháp HPLC

Chuẩn bị mẫu

- Chuẩn bị dung dịch chuẩn gốc

+ Dung dịch chuẩn gốc IRB: Cân chính xác khoảng 75 mg IRB cho vào bình định mức 100 mL, thêm khoảng 60 mL acetonitril lắc cho tan hoàn toàn, sau đó thêm acetonitril vừa đủ thể tích lắc đều.

+ Dung dịch chuẩn gốc HCTZ: Cân chính xác khoảng 6,25 mg HCTZ cho vào bình định mức 100 mL, thêm khoảng 60 mL acetonitril lắc cho tan hoàn toàn, sau đó thêm acetonitril vừa đủ thể tích lắc đều.

- *Dung dịch chuẩn hỗn hợp*: Lấy chính xác 10 mL dung dịch IRB và 10 mL dung dịch HCTZ cho vào bình định mức 100 mL, thêm acetonitril vừa đủ thể tích, lắc đều. Lọc qua giấy lọc Millipore 0,45 μm . Dùng dung dịch này tiêm sắc ký.

- Dung dịch thử

Cân 20 viên, xác định khối lượng trung bình viên. Nghiền thành bột mịn.

Cân một lượng bột viên tương đương 75 mg IRB cho vào bình định mức 100 mL. Thêm khoảng 60 mL acetonitril siêu âm 20 phút, để nguội, thêm acetonitril vừa đủ thể tích, lắc đều. Lọc bỏ 20 mL dịch lọc đầu.

Lấy chính xác 10 mL dịch lọc cho vào bình định mức 100 mL, thêm acetonitril lắc đều. Lọc qua giấy lọc Millipore 0,45 μm . Dùng dung dịch này tiêm sắc ký.

- Dung dịch placebo

Cân một lượng placebo tương đương placebo của $\frac{1}{2}$ viên cho vào bình định mức 100 mL. Thêm khoảng 60 mL acetonitril siêu âm 20 phút, để nguội, thêm acetonitril vừa đủ thể tích, lắc đều. Lọc (bỏ 20 mL dịch lọc đầu). Lấy chính xác 10 mL dịch lọc cho vào bình định mức 100 mL, thêm acetonitril lắc cho tan hoàn toàn. Lọc qua giấy lọc Millipore 0,45 μm .

Điều kiện sắc ký

+ Cột thép không gỉ (25 cm \times 4,6 mm) được nhồi pha tĩnh octyldecylsilan (kích thước hạt 5 μm).

- Pha động: - Pha động A: acid trifluoroacetic acid 0,1% trong nước và pha động B: acid trifluoroacetic acid 0,1% trong AcCN

- Detector PDA. Bước sóng phát hiện

205 nm

- Tốc độ dòng: 1,5 mL/phút

- Thể tích tiêm: 20 μl .

- Sử dụng chương trình gradient dung môi ở Bảng 1.

Bảng 1. Chương trình gradient

Thời gian (phút)	Pha động A (%)	Pha động B (%)
0.00	85	15
5.00	5	95
7.00	85	15
10.00	85	15

2.3.2. Thẩm định quy trình

Tương thích hệ thống, tính tuyến tính, tính đặc hiệu, độ lặp lại, độ chính xác trung gian và độ đúng [11], [12].

3. Kết quả và bàn luận

3.1. Khảo sát tính phù hợp của hệ thống

Thực hiện tiêm 6 lần dung dịch chuẩn ở nồng độ định lượng ghi lại các thông số sắc ký: Thời gian lưu tương đối, diện tích peak và độ phân giải giữa tín hiệu HCTZ và IRB. Kết quả trình bày trong Bảng 2.

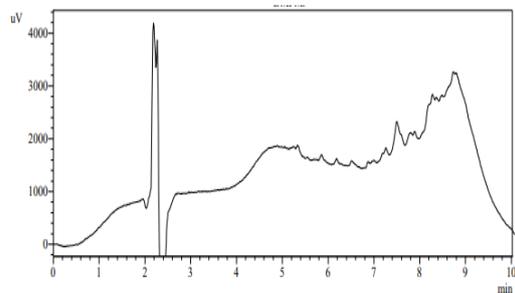
Kết quả thống kê Bảng 2 cho thấy, sau 6 lần sắc ký, diện tích pic và thời gian lưu có RSD < 2%; giá trị độ phân giải (R_s) lớn hơn 1,5. Vậy phương pháp đạt tính phù hợp của hệ thống.

Bảng 2. Kết quả khảo sát tính phù hợp của hệ thống của phương pháp ($n = 6$)

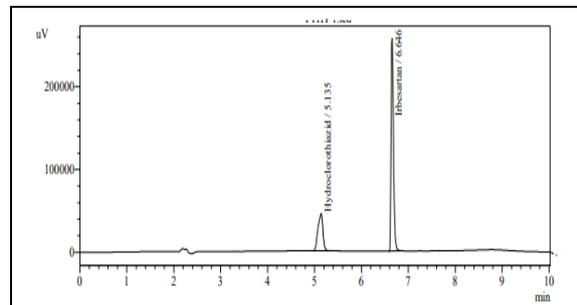
	HCTZ			IRB			
	t_R (phút)	S (μ AU x giây)	As	t_R (phút)	S (μ AU x giây)	As	R_s
TB	5,130	318387	0,9	6,640	894513	1,5	23,60
RSD (%)	0,07	0,12		0,06	0,15		

3.2. Tính đặc hiệu

Tiến hành sắc ký mẫu trắng, mẫu đối chiếu và mẫu thử. Kết quả được trình bày ở Hình 1 và Hình 2. Kết quả cho thấy mẫu trắng không có pic trùng với pic chất phân tích. Thời gian lưu của pic chính trong mẫu thử tương ứng với thời gian lưu của pic chính trong mẫu đối chiếu. Phổ tử ngoại tại thời gian lưu của các pic trong mẫu thử giống phổ tử ngoại của mẫu đối chiếu. Độ tinh khiết của các pic lớn hơn 99%. Hai pic của hai dạng đồng phân có phổ UV giống nhau. Vậy phương pháp có tính đặc hiệu.



Hình 1. Sắc ký đồ khảo sát tính đặc hiệu placebo tại điều kiện sắc kí (cột Nucleosil 100 (250 x 4,6 mm; 5 μ m))



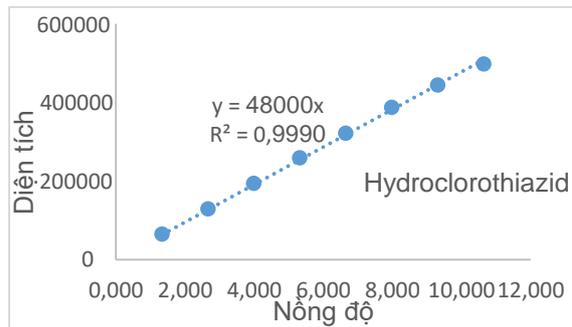
Hình 2. Sắc ký đồ của hydrochlorothiazide và irbesartan tại điều kiện sắc kí (cột Nucleosil 100 (250 x 4,6 mm; 5 μ m))

3.3. Tính tuyến tính

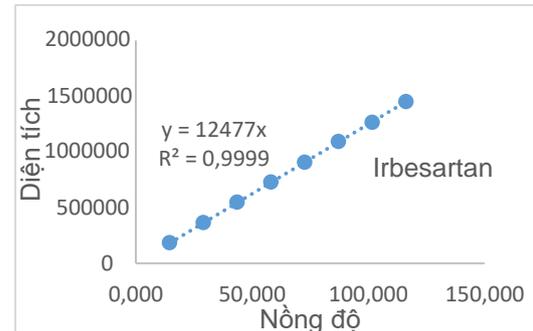
Từ dung dịch chuẩn gốc, tiến hành pha một dãy chuẩn hỗn hợp (tương ứng nồng độ lần lượt là 20%, 40%, 60%, 80%, 100%, 120%, 140% và 160%) theo Bảng 3. Kết quả Bảng 3 cho thấy, trong khoảng nồng độ đã khảo sát của HCTZ, IRB có sự tương quan tuyến tính chặt chẽ giữa diện tích pic với nồng độ đối với cả hai hoạt chất, phương trình hồi qui lần lượt là $y = 49739x$ cho HCTZ và $y = 118902x$ cho IRB với hệ số hồi quy tuyến tính (r) đều lớn hơn 0,999, chứng tỏ phương pháp đạt yêu cầu độ tuyến tính. Hình 3 và Hình 4 trình bày dữ liệu tuyến tính của phương pháp.

Bảng 3. Cách pha dãy dung dịch chuẩn hỗn hợp

Khoảng nồng độ (%)	HCTZ		IRB	
	Nồng độ (μ g/ml)	Diện tích pic	Nồng độ (μ g/ml)	Diện tích pic
20	1,330	64589	14,540	184139
40	2,660	128620	29,080	365259
60	3,990	193575	43,620	547637
80	5,320	258374	58,160	729662
100	6,650	320677	72,700	905249
120	7,980	386926	87,240	1091424
140	9,310	443834	101,780	1265892
160	10,640	497154	116,320	1449731
Đường hồi quy	$y = 49739x$		$y = 118902x$	
R^2	0,9992		1	



Hình 3. Đường biểu diễn sự tương quan giữa diện tích pic với nồng độ của HCTZ



Hình 4. Đường biểu diễn sự tương quan giữa diện tích pic với nồng độ của IRB

3.4. Độ lặp lại, độ chính xác trung gian và độ đúng

Độ chính xác: Tiến hành phân tích 6 mẫu khác nhau, lặp lại trong 2 ngày. Giá trị RSD (%) kết quả định lượng hàm lượng hoạt chất có trong các mẫu $\leq 2,0\%$. Vì vậy, qui trình định lượng đạt yêu cầu độ chính xác

Bảng 4. Kết quả khảo sát độ lặp lại và độ chính xác trung gian (phòng 1)

Số mẫu (n)	HCTZ (%)		IRB (%)	
	Ngày 1	Ngày 2	Ngày 1	Ngày 2
1	98,22	97,29	106,66	105,53
2	98,53	98,12	106,74	106,35
3	99,13	99,28	107,81	107,19
4	99,38	99,15	107,52	107,46
5	98,36	97,64	106,61	105,66
6	98,96	97,52	107,68	105,56
TB(%)	98,47		106,73	
RSD(%)	0,74		0,78	

Bảng 5. Kết quả khảo sát độ lặp lại và độ chính xác trung gian (phòng 2)

Số mẫu (n)	HCTZ (%)		IRB (%)	
	Ngày 1	Ngày 2	Ngày 1	Ngày 2
1	98,22	97,29	106,66	105,53
2	98,53	98,12	106,74	106,35
3	99,13	99,28	107,81	107,19
4	99,38	99,15	107,52	107,46
5	98,36	97,64	106,61	105,66
6	98,96	97,52	107,68	105,56
TB(%)	98,47		106,73	
RSD(%)	0,74		0,78	

Kết quả ở Bảng 4 và Bảng 5 cho thấy độ lặp lại các kết quả định lượng của HCTZ, IRB đều có giá trị RSD $< 2,0\%$. Điều này chứng tỏ phương pháp có độ lặp lại trong ngày tốt.

Nhận xét: Chênh lệch kết quả hàm lượng trung bình giữa 2 phòng thí nghiệm đạt trong khoảng giới hạn ($< 2,0\%$) và giá trị RSD của 2 phòng thí nghiệm $< 2,0\%$ đối với cả hai hoạt chất cho thấy phương pháp có độ lặp lại tốt giữa hai phòng thí nghiệm khác nhau.

Độ đúng: được xác định bằng cách đánh giá kiểm tra độ lặp lại của phương pháp phân tích thông qua giá trị độ phục hồi. Tiến hành thực hiện tối thiểu 9 lần định lượng trên ít nhất 3 mức nồng độ khác nhau. Độ đúng được thực hiện bằng cách thêm chuẩn vào mẫu placebo ở ba mức nồng độ 80%, 100%, 120% so với nồng độ định lượng. Mỗi mức nồng độ chuẩn bị 3 mẫu và tiến hành sắc ký theo điều kiện sắc ký đã chọn. Tính tỷ lệ phục hồi.

Bảng 6. Kết quả thẩm định độ đúng

	Lượng placebo (mg)	Lượng thêm (mg)	Diện tích pic	Lượng tìm lại (mg)	Tỷ lệ phục hồi (%)
HCTZ	224,2	4,89	238135	4,97	101,71
	224,5	5,12	249832	5,22	101,92
	223,9	5,01	240562	5,02	100,29
	223,7	6,34	308801	6,45	101,73
	224,4	6,42	313359	6,54	101,95
	223,8	6,17	300849	6,28	101,84
	223,7	7,76	374925	7,83	100,91
	223,5	7,82	383201	8,00	102,35
	224,3	7,71	373687	7,81	101,23
	Trung bình (%)				101,55
	RSD (%)				0,62
IRB	224,2	60,17	740943	60,22	100,08
	224,5	65,34	806674	65,56	100,34
	223,9	60,92	750925	61,03	100,18
	223,7	76,85	937893	76,23	99,19
	224,4	76,91	943138	76,65	99,66
	223,8	73,56	901430	73,26	99,60
	223,7	91,02	1110323	90,24	99,14
	223,5	91,89	1131264	91,94	100,06
	224,3	90,46	1104933	89,80	99,27
	Trung bình (%)				99,72
	RSD (%)				0,46

Nhận xét: Kết quả Bảng 6 cho thấy phương pháp có độ đúng cao với tỷ lệ tìm lại từ 98,0% - 102,0% và RSD < 2,0% đáp ứng yêu cầu về độ đúng của phương pháp.

Áp dụng qui trình phân tích để xác định hàm lượng mẫu chứa hydrochlorothiazid và irbesartan đang lưu hành trên thị trường. Tiến hành như phương pháp xử lý mẫu tại mục 2.3. Kết quả trình bày trong Bảng 7.

Bảng 7. Hàm lượng mẫu chứa hydrochlorothiazid và irbesartan đang lưu hành trên thị trường

Tên mẫu	Số TT	Quy trình 2	
		Hàm lượng (%)	
		HCTZ	IRB
IHYBES – H150	Thứ 1	98,72	99,98
	Thứ 2	99,03	100,68
	Thứ 3	98,91	101,23
Trung bình (%)		98,89	100,63
RSD (%)		0,16	0,62

4. Kết luận

Bằng phương pháp HPLC, với cột sắc ký Nucleosil 100 (250 x 4,6 mm; 5 μ m), chúng tôi xây dựng được quy trình phân tích đồng thời hydrochlorothiazid và irbesartan bằng phương pháp sắc ký lỏng hiệu năng cao hoàn toàn mới. Tính mới của nghiên cứu này nằm ở việc phát triển một phương pháp HPLC với các cải tiến về pha động, cột sắc ký, và chương trình rửa giải gradient để phân tích giúp cho việc phát triển nghiên cứu thuốc có thêm nhiều sự lựa chọn. Quy trình có tính đặc hiệu, đạt độ chính xác (RSD \leq 2%), đạt độ đúng với tỷ lệ thu hồi từ 98% – 102% (RSD \leq 2%). Kết quả thu được góp phần vào việc phân tích đồng thời hai hoạt chất và có thể ứng dụng để xác định hàm lượng trong nguyên liệu hydrochlorothiazid, irbesartan và các chế phẩm đồng thời chứa hydrochlorothiazid và irbesartan đang lưu hành trên thị trường.

TÀI LIỆU THAM KHẢO/ REFERENCES

- [1] X. Wan, P. Ma, and X. Zhang, "A promising choice in hypertension treatment: Fixed-dose combinations," *Asian Journal of Pharmaceutical Sciences*, vol. 9, no. 1, pp. 1-7, 2014.
- [2] L. F. Tutunji, M. F. Tutunji, M. I. Alzoubi, M. H. Khabbas, and A. I. Arida, "Simultaneous determination of irbesartan and hydrochlorothiazide in human plasma using HPLC coupled with tandem mass spectrometry: Application to bioequivalence studies," *J. Pharm. Biomed. Anal.*, vol. 51, no. 4, pp. 985-990, 2010.
- [3] Q. F. Huang, C. S. Sheng, Y. Li, G. S. Ma, Q. Y. Dai, and J. G. Wang, "Efficacy and safety of a fixed combination of irbesartan/hydrochlorothiazide in Chinese patients with moderate to severe hypertension," *Drugs R D.*, vol. 13, no. 2, pp. 109-117, 2013.
- [4] X. Qiu, Z. Wang, B. Wang, H. Zhan, X. Pan, and R. A. Xu, "Simultaneous determination of irbesartan and hydrochlorothiazide in human plasma by ultra high performance liquid chromatography tandem mass spectrometry and its application to a bioequivalence study," *J. Chromatogr. B Analyt. Technol. Biomed. Life Sci.*, vol. 957, pp. 110-115, 2014.
- [5] M. M. Zareh, M. Z. Saad, W. S. Hassan, M. E. Elhennawy, M. K. Soltan, and M. M. Sebaiy, "Gradient HPLC Method for Simultaneous Determination of Eight Sartan and Statin Drugs in Their Pure and Dosage Forms," *Pharmaceuticals*, vol. 13, p. 32, 2020.
- [6] T. Ali, G. Mohamed, A. Aglan, and F. Heakal, "RP-HPLC Stability-indicating Method for Estimation of Irbesartan and Hydrochlorothiazide in Bulk and Pharmaceutical Dosage Form," *Chinese Journal of Analytical Chemistry*, vol. 44, pp. e1601-e1608, 2016.
- [7] H. A. Alhazmi *et al.*, "A Fast and Validated Reversed-Phase HPLC Method for Simultaneous Determination of Simvastatin, Atorvastatin, Telmisartan and Irbesartan in Bulk Drugs and Tablet Formulations," *Sci. Pharm.*, vol. 86, no. 1, p.1, 2017.
- [8] T. Q. T. Nguyen, V. H. Nguyen, D. G. C. Nguyen, and T. B. Tran, "Simultaneous Determination of Amlodipine, Hydrochlorothiazide, and Valsartan in Pharmaceutical Products by a Combination of Full Spectrum Measurement and Kalman Filter Algorithm," (in Vietnamese), *Advances in Materials Science and Engineering*, vol. 126, pp. 1-9, 2019.
- [9] L. T. Dao, "Development of analytical method for irbesartan and hydrochlorothiazide in human plasma," (in Vietnamese), *Journal of Science & Technology*, vol. 16, pp. 30-37, 2022.
- [10] FDA, *Guidance for Industry - Bioanalytical Method Validation*. Rockville, MD, USA, 2018.
- [11] S. R. Nikam, A. S. Jagdale, S. S. Boraste, and S. B. Patil, "Bioanalysis - method development, validation, sample preparation, its detection techniques and its application," *Asian Journal of Pharmaceutical Analysis*, vol. 11, no. 4, pp. 297-305, 2021.
- [12] ICH, "ICH Harmonised Tripartite Guideline Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology Q2(R1)," *International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use*, Geneva, 2005, pp.1-13.