

# Studije forsirane degradacije amlodipin-besilata i bisoprolol-fumarata primjenom tečne hromatografije hidrofилnih interakcija

Irena Kasagić-Vujanović<sup>1\*</sup>, Biljana Jančić-Stojanović<sup>2</sup>,  
Darko Ivanović<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Univerzitet u Banjoj Luci – Medicinski fakultet, Odsjek farmacija, Katedra za analitiku lijekova, Save Mrkalja 14, Banja Luka, Republika Srpska, BiH

<sup>2</sup> Univerzitet u Beogradu – Farmaceutski fakultet, Katedra za analitiku lekova, Vojvode Stepe 450, Beograd, Srbija

\*autor za prepisku, Tel: +387 51 340 108; e-mail: [kasagic.irena@gmail.com](mailto:kasagic.irena@gmail.com)

---

## Kratak sadržaj

U savremenim farmaceutskim analizama danas se veliki značaj pridaje *studijama forsirane degradacije*, koje mogu u velikoj mjeri pomoći u predviđanju roka upotrebe lijeka, ali i u identifikaciji mogućih proizvoda degradacije. Ove studije omogućavaju ispitivanje specifičnosti *stability indicating* metode, zatim koriste se za ispitivanje intrinzičke/unutrašnje stabilnosti molekule aktivnih supstanci, kao i za definisanje profila nečistoća aktivnih supstanci. U ovom radu vršena je *studija forsirane degradacije* amlodipin-besilata i bisoprolol-fumarata pojedinačno i u smješi, gdje se kao metoda koristila tečna hromatografija hidrofилnih interakcija, kojom su se pratile promjene koncentracije ispitivanih uzoraka. Rezultati ispitivanja pokazali su da su ispitivana jedinjenja osjetljiva na većinu ispitivanih *stres agenasa*, naročito amlodipin-besilat, kao i da su oba ova jedinjenja pokazala veću stabilnost u smješi, nego kad su pojedinačno analizirana.

**Ključne riječi:** amlodipin-besilat, bisoprolol-fumarat,  
*studije forsirane degradacije*, hromatografija hidrofилnih interakcija

---

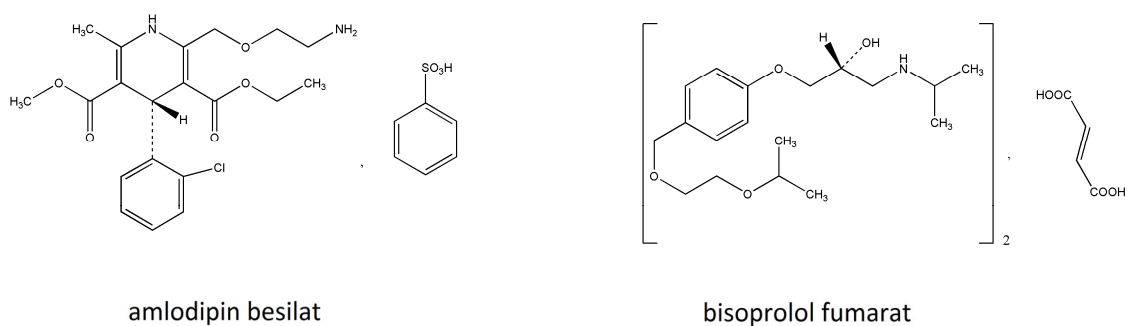
## Uvod

*Studije forsirane degradacije* ili *stres studije* važan su dio procesa razvoja lijeka. Ove studije sprovode se u cilju razvoja i validacije metode za praćenje stabilnosti lijeka (eng. *Stability Indicating Method – SIM*), otkrivanje puteva degradacije lijeka i definisanje njihove stabilnosti u farmaceutskim oblicima, kao i identifikaciji potencijalnih degradacionih proizvoda. Na ovaj način dobijaju se korisne informacije za definisanje uslova čuvanja lijeka, ali i načina proizvodnje i kompatibilnosti sa određenim ekscipijensima [1, 2].

*Studije forsirane degradacije* sprovode se na čistim farmaceutski aktivnim supstancama (standardna supstanca) i farmaceutskim oblicima u čvrstom obliku, rastvorima ili suspenzijama (zbog moguće interakcije sa nekim od ekscipijenasa). Na taj način može se utvrditi porijeklo eventualnog degradacionog proizvoda, te da li je nastala nečistoća posljedica nestabilnosti farmaceutski aktivne supstance ili interakcije sa ekscipijensima. Ove studije sprovode se prema smjernicama Međunarodne konferencije o harmonizaciji (eng. *International Conference on Harmonisation – ICH*). ICH smjernica Q1A(R2) predlaže sljedeće uslove *stres testa*: povišena temperatura (za 10 °C viša od temperature kod *ubrzanih studija stabilnosti*, tj. 50 °C, odnosno 60 °C), relativna vlažnost 75 % ili više, hidroliza u širokom opsegu pH vrijednosti, oksidacija i fotoliza [3]. Pored toga, *studije fotostabilnosti* neophodno je izvoditi u skladu sa ICH Q1B smjernicom, prema kojoj svjetlosni izvor, koji se može koristiti za ispitivanje fotostabilnosti analiziranih uzoraka, može biti vještačko dnevno osvjtljenje koje odgovara D65/ID65 propisu za emisiju zračenja. To znači da se kao izvor svjetla može koristiti vještačka dnevna svjetlost fluroscentne lampe (od 320 nm sa filterom za eliminisanje nepoželjnog zračenja) kombinovana sa vidljivom i ultraljubičastom svjetlošću, ksenon ili metal-halogenom lampom. Propis D65 podrazumijeva međunarodno priznat standard za vanjsku dnevnu svjetlost definisanu sa ISO 10977 (1993), a ID65 je standard ekvivalencije za unutrašnju dnevnu svjetlost [4]. Pored ICH smjernica postoje i dodatne preporuke koje opisuju uslove izvođenja *stres studija* [2, 5, 6]. Eksperimentalni uslovi za izvođenje *studije forsirane degradacije* moraju obuhvatati ispitivanje osjetljivosti lijeka na hidrolizu, oksidaciju, termalnu degradaciju, vlagu i svjetlost. *Studije forsirane degradacije* izvode se na jednoj seriji proizvoda, a eksperimentalni uslovi treba da budu ekstremniji nego u *ubrzanim studijama stabilnosti*. Tačni uslovi izvođenja *studija forsirane degradacije* biraju se na osnovu fizičko-hemijskih karakteristika lijeka [1, 3, 5]. Ono što prethodi eksperimentu jeste analiza hemijske strukture ispitivane supstance, odnosno funkcionalnih grupa unutar nje. Tako se za estre, amide ili laktone može očekivati da lako podliježu hidrolizi. Funkcionalne grupe koje sadrže heteroatom (azot, sumpor), aldehidi i ketoni osjetljivi su na oksidaciju. Alkeni, aromatični i heterociklični derivati su fotosenzitivni [1]. Postavljeni eksperimentalni uslovi moraju biti takvi da se ostvari degradacija farmaceutski aktivne

supstance od 5 % do 20 %, što se smatra značajnom i reprezentativnom degradacijom [1, 2]. Ukoliko se supstanca ne razgradi nakon predviđenog perioda za *stres studije*, smatra se da je stabilna prema ispitivanom *stres agensu*.

U ovom radu opisano je izvođenje *studije forsirane degradacije* na amlodipin-besilatu (AB) i bisoprolol-fumaratu (BF), a kao metoda za praćenje degradacije korišćena je metoda hidrofilnih interakcija (eng. *Hidrophilic Interaction Liquid Chromatography* – HILIC). Ispitivani analiti (AB i BF) oficinalni su po Ph. Eur. 7.0 koja za određivanje oba jedinjenja i njihovih srodnih supstanci propisuje metodu reversno-fazne tečne hromatografije (eng. *Reverse Phase High Performance Liquid Chromatography* – RP-HPLC), na koloni C18 (250 mm x 4,6 mm, 5 µm veličina čestica), sa izokratskim načinom eluiranja za amlodipin-besilat i gradijentnim načinom eluiranja za bisoprolol-fumarat [7]. Struktura analiziranih jedinjenja prikazana je na Slici 1.



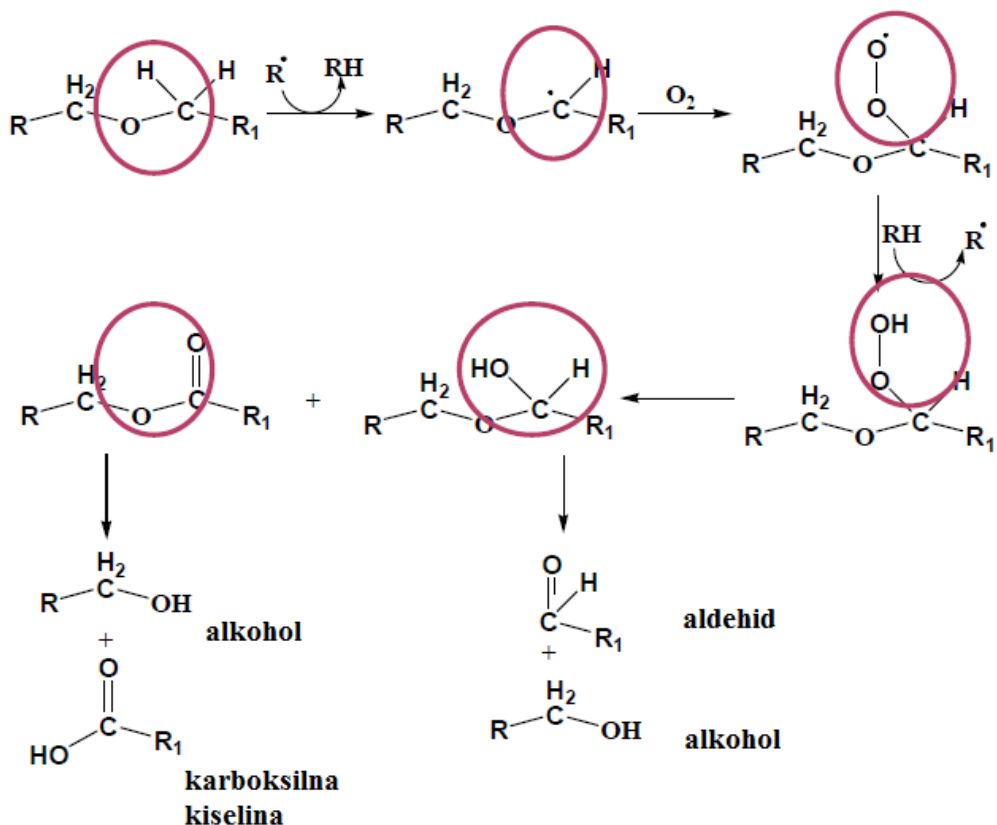
**Slika 1. Hemijska struktura amlodipin-besilata i bisoprolol-fumarata**  
**Figure 1. Chemical structures of amlodipine besylate and bisoprolol fumarate**

Cilj ovog istraživanja bio je da se sprovede istovremena *studija forsirane degradacije* na AB i BF, pojedinačno i u smješi, a upotrebom HILIC metode da se prati promjena koncentracije u definisanim vremenskim intervalima.

Pregledom literature može se vidjeti da do sada nisu objavljeni slični radovi. U radovima [8, 9] AB i BF određivani su primjenom RP-HPLC metode na C18 koloni u farmaceutskim oblicima. Dalje, opisane su metode određivanja BF u kombinaciji sa metoprololom i hidrohloriazidom iz biološkog materijala upotrebom HPLC i spektrofotometrijske metode [10–12]. Za određivanje AB iz tableta i biološkog materijala u kombinaciji s lizinoprilom, losartanom, hidrohloriazidom, metoprololom, olmesartanom ili drugim antihipertenzivnim lijekovima primjenjene su HPLC i spektrofotometrijske metode [13–18]. Od HILIC metoda u literaturi do sada je opisano određivanje sadržaja BF i drugih beta-blokatora, bilo pojedinačno ili u smješi, sa drugim lijekovima (ranitidin, omeprazol, citalopram i dr.) [19–22]. Za istovremeno

određivanje BF i drugih beta-blokatora iz biološkog materijala opisana je i HPLC metoda s masenom detekcijom [23].

Na osnovu pregleda literature zaključeno je da nema radova u kojima su produkti degradacije, nastali nakon *studije forsirane degradacije* AB i BF, analizirani primjenom HILIC sistema. Takođe, ovo je prvi rad u kome su opisane *studije forsirane degradacije* na ova dva analita pojedinačno i istovremeno što je pored definisanja njihovog degradacionog profila omogućilo i da se izvedu zaključci o međusobnom uticaju na stabilnost. BF u svojoj strukturi ima tri etarske funkcionalne grupe, spada u grupu etara i derivat je ariloksipropanolamina (para-monosupstituisani derivat). Etri su veoma osjetljivi na oksidaciju, tj. dolazi do uklanjanja vodonika iz C-H veze u  $\alpha$ -položaju (u odnosu na etarsku grupu) i stvaranje radikala, koji se dalje razlaže do  $\alpha$ -hidroperoksida, a zatim do aldehida, ketona, alkohola i karboksilnih kiselina. Šema oksidacije etara prikazana je na Slici 2 [1, 24].



Slika 2. Šema oksidacije etara  
Figure 2. Ethersoxidation scheme

Iz ovog se može predvidjeti da će BF biti osjetljiv na oksidativnu degradaciju, međutim etri su stabilni i u kiseloj i u baznoj sredini (neki i na povišenu temperaturu), te se može pretpostaviti da će se BF u manjem stepenu degradirati kiselom i baznom hidrolizom. Pregledom literature nije pronađeno da je do sada izvršena identifikacija produkata degradacije BF nakon *stres studija*.

AB je derivat 1,4-dihidropiridina, u svojoj strukturi ima dvije estarske grupe koje ga čine nestabilnim i u kiseloj i u baznoj sredini (podliježe kiseloj i baznoj hidrolizi). Iz ovog se može zaključiti da će se AB degradirati pod dejstvom HCl i NaOH (*stres agensi*). AB podliježe i fotohemijskoj degradaciji zbog prisustva aromatične nitro grupe. Pored ove funkcionalne grupe i karbonilna, alkenaska i aril-halogenidna grupa odgovorne su za fotoreaktivnost. BF u svojoj strukturi nema niti jednu od navedenih funkcionalnih grupa, pa se može pretpostaviti da će biti fotostabilan. Sam mehanizam fotodegradacije je vrlo komplikovan i do sad je razjašnjeno samo nekoliko slučajeva. Za AB u literaturi prikazan je put degradacije, odnosno prikazana je kiselna, bazna i oksidativna degradacija (Slika 3) [25], a produkti degradacije su identifikovani upotrebom metode tečne hromatografije sa tandem masenim spektrometrom (eng. *Liquid Chromatography – tandem Mass Spectrometry – LC-MS/MS*).

## **Eksperimentalni dio**

*Hromatografski sistem.* Analiza je vršena na hromatografskom sistemu *Agilent Technologies HP 1200*, koji se sastoji iz HP 1200 binarne pumpe, HP 1200 UV/VIS detektora i *ChemStation Software, Windows XP* za prikupljanje i obradu podataka.

*Ostala oprema i pribor.* pH metar Ciperscan pH 11 (Eutech, Malezija), magnetna mješalica (Falc, Italija), sistem za filtriranje vode (Whatman, Njemačka), ultrazvučno kupatilo (Bandelin, Sonorex digitec, Njemačka).

*Reagensi.* Za pripremu mobilne faze i rastvora upotrebljeni su reagensi HPLC čistoće: acetonitril (Fisher Scientific, Engleska), koncentrovana sirćetna kiselina (Lachner, Češka), voda HPLC kvaliteta dobijena sistemom Barnstead i amonijum-acetat (Lachner, Češka).

*Standardi.* Za analizu su korišćeni radni standardi: bisoprolol-fumarat (Sigma-Aldrich, Njemačka), amlodipin-besilat (Sigma-Aldrich, Njemačka) i nečistoća A od amlodipin-besilata (Sigma-Aldrich, Njemačka).

*Rastvori.* Osnovni rastvori AB i BF ( $c = 1 \text{ mg mL}^{-1}$ ) pripremljeni su u acetonitrilu. Radni rastvori AB i BF koncentracije  $100 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$  pripremljeni su razblaživanjem s odgovarajućim *stres agensom*. Kao *stres agenesi* korišćeni su: 0,1 M natrijum-hidroksid, 0,1 M i 0,01 M hlorovodonična kiselina, kao i rastvori vodonik-peroksida koncentracija 3 %, 15 % i 30 %. Vršeno je i ispitivanje u neutralnoj sredini, gdje se kao rastvarač koristila destilovana voda (dobijena sistemom Barnstead) i nije vršeno

naknadno podešavanja pH vrijednosti na 7,0. Za sprovođenje degradacije pod uticajem svjetla koristila se prirodna dnevna svjetlost u kombinaciji sa vještačkom bijelom svjetlošću, tokom dana ili samo vještačka bijela svjetlost, tokom noći, sa setom od 12 lampi. Jačina jedne lampe iznosila je 18 W (F74-765 *daylight* – 1200 lumena, Tungsram, Mađarska).

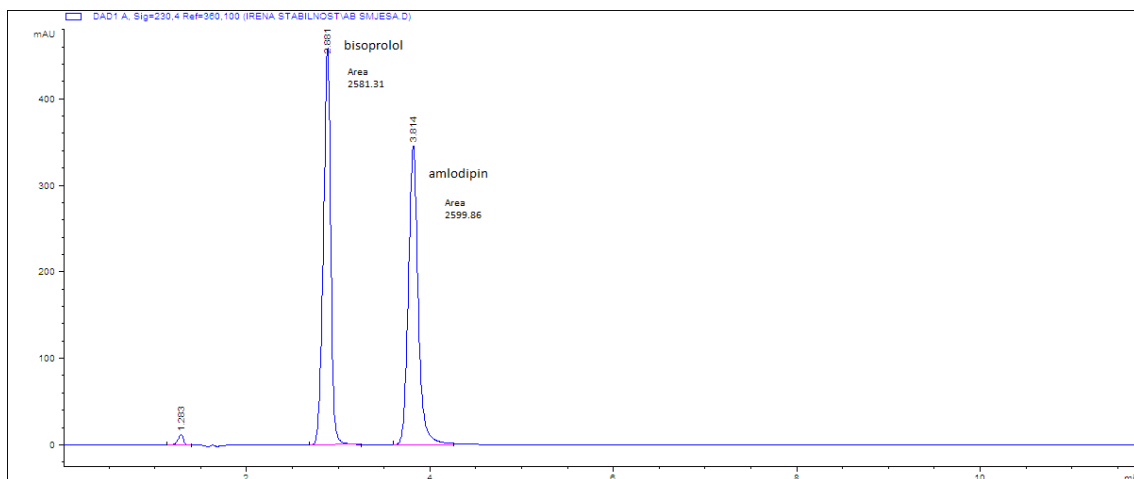
Neposredno nakon dodatka *stres agensa*, tj. u 0-tom minutu vršene su analize i razvijeni su hromatogrami ispitivanih uzoraka. Zatim, degradacija svih uzoraka AB i BF, pojedinačno i u smješi, pratila se nakon 1 h, 24 h, 48 h i 72 h, bez zaustavljanja reakcija degradacije. Sve analize su sprovedene na sobnoj temperaturi (~ 25 °C).

Osnovni rastvor nečistoće A ( $c = 0,1 \text{ mg mL}^{-1}$ ) pripremljen je u acetonitrilu. Radni rastvor nečistoće A koncentracije  $10 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$  pripremljen je razblaživanjem s mobilnom fazom.

*Hromatografski uslovi.* Kolona – Luna 5  $\mu$  HILIC 200A (100 mm x 4,6 mm, 5  $\mu\text{m}$  veličina čestica), mobilna faza je smješa acetonitril–vodeni rastvor 10 mM amonijum-acetata (pH 4,0 podešen koncentrovanom sirćetnom kiselinom) u omjeru 92:8 V/V. Protok mobilne faze bio je  $1 \text{ mL min}^{-1}$ , temperatura kolone 30 °C, talasna dužina detekcije 230 nm i injekciona zapremina 20  $\mu\text{L}$  [26].

## Rezultati i diskusija

U ovom radu opisano je ispitivanje stabilnosti AB i BF, pojedinačno i u smješi, a nakon izlaganja ispitivanih supstanci *stres uslovima*. Kao metoda koja se koristi za praćenje stepena degradacije korišćena je prethodno razvijena i validirana HILIC metoda [26]. Hromatografski uslovi prikazani su u Eksperimentalnom dijelu. Ova metoda se pokazala kao specifična, tačna i precizna za analizu navedenih analita, ali i veoma pogodna za sprovođenje njihove *studije forsirane degradacije*. Razvijena HILIC metoda omogućava zadovoljavajuće razdvajanje BF i AB, što se može vidjeti iz hromatograma dobijenog pod optimalnim hromatografskim uslovima (Slika 3).



**Slika 3. Hromatogram pri optimalnim hromatografskim uslovima: kolona Luna HILIC 200A (100 mm x 4,6 mm, 5  $\mu$ m veličina čestica), mobilna faza – smješa acetonitril : vodeni rastvor 10 mM amonijum-acetata (pH 4,0 podešen koncentrovanom sirćetnom kiselinom) u omjeru 92:8 V/V. Protok mobilne faze 1 mL min<sup>-1</sup>, temperatura kolone 30 °C, talasna dužina detekcije 230 nm i injekciona zapremina 20  $\mu$ L.**

**Figure 3. Chromatogram obtained under optimal chromatographic conditions: column Luna HILIC 200A (100 mm x 4,6 mm, 5  $\mu$ m particle size), mobile phase: acetonitrile/aqueous solution of 10 mM ammonium acetate pH adjusted whit concentrated acetic acid (92:8, V/V), flow rate 1 mL min<sup>-1</sup>, the column temperature 30 °C, UV detection at 230 nm and injection volume of 20  $\mu$ L.**

Prema proceduri, opisanoj u ekpserimentalnom dijelu, ispitivani analiti tretirani su s različitim *stres agensima*, dobijeni su rezultati *studije forsirane degradacije* i izvedeni su odgovarajući zaključci (Tabela I).

**Tabela I** Usporedni prikaz stepena degradacije AB i BF (pojedinačno i u smješi) nakon stres studije u definisanim vremenskim intervalima

**Table I** Adjacent overview AB and BF degree of degradation (individually and in mixture) after stress studies in defined period of time

vrijeme degradacije [h]		0	1	24	48	72
stepen degradacije [%]	<b>0,1M NaOH:</b>					
	AB	18,18	20,7	55,4	77,36	88,64
	BF	7,10	8,19	10,34	15,07	23,62
	smješa:					
	AB	16,43	18,43	36,46	55,07	67,18
	BF	6,65	9,17	18,30	22,74	33,78
	<b>0,01M HCl:</b>					
	AB	5,46	5,57	7,82	9,53	16,24
	BF	4,57	5,50	6,05	6,44	16,79
	smješa:					
	AB	4,14	4,58	6,48	7,19	10,86
	BF	4,14	4,44	6,15	6,68	13,99
	<b>3 % vodonik peroksid:</b>					
	AB	17,09	19,81	49,74	88,55	94,20
	BF	10,08	26,06	32,43	49,60	50,06
	smješa:					
	AB	10,22	17,0	41,81	69,16	78,90
	BF	16,70	18,83	27,38	30,11	43,27
	<b>15 % vodonik peroksid:</b>					
	AB	26,36	38,47	85,35	96,32	97,99
	BF	44,13	48,57	69,14	74,86	84,93
	smješa:					
	AB	21,16	33,87	82,37	94,54	95,51
	BF	41,33	44,48	60,14	70,61	83,86
	<b>30 % vodonik peroksid:</b>					
	AB	75,77	100,0	/	/	/
	BF	73,12	100,0	/	/	/
	smješa:					
AB	75,77	100,0	/	/	/	
BF	65,34	92,47	100,0	/	/	



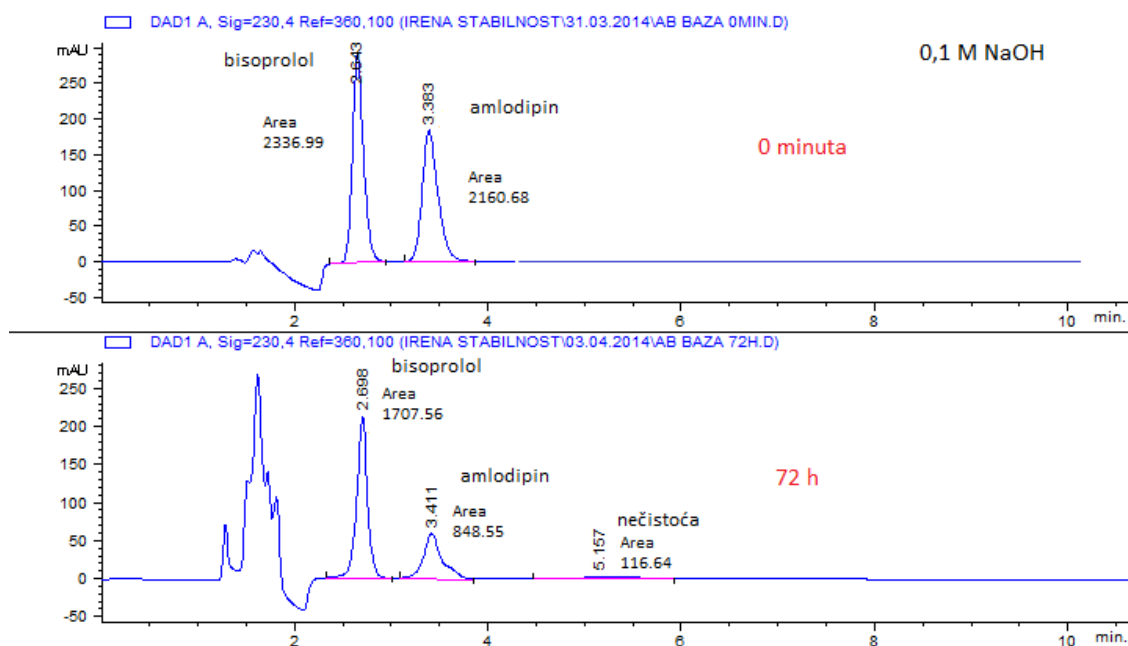
vrijeme degradacije [h]	0	1	24	48	72	
tepen degradacije [%]	<b>destilovana voda:</b>					
	AB	2,52	3,42	4,69	6,65	10,62
	BF	0	0,19	0,19	0,20	0,93
	smješa:					
	AB	2,50	2,50	4,57	5,88	6,09
	BF	0	0	0	0	0,08
	<b>svjetlost:</b>					
	AB	0	1,83	2,74	7,10	8,44
	BF	0	0,17	0,17	0,17	0,17
	smješa:					
	AB	0	1,0	2,0	5,52	6,82
	BF	0	0	0	0	0

AB – amlodipin-besilat; BF – bisoprolol-fumarat

### ***Degradacija u baznoj sredini***

Tretiranje AB, BF i njihove smješe sa 0,1 M NaOH dovelo je do degradacije svih ispitivanih uzoraka. Najprije, AB se na samom početku (0-ti minut) degradirao 18,18 %, a u narednih 60 minuta 20,7 %. Za 24 h degradirao se 55,4 %, za 48 h 77,36 % i za 72 h 88,64 % u odnosu na početnu koncentraciju. AB se vidno degradirao u toku 72 h, a i uočena je pojava nečistoće na retencionom vremenu 5,292 minuta čija se površina tokom ove *stres studije* povećavala. Ovo ukazuje da AB podliježe hidrolizi pod dejstvom 0,1 M NaOH. Pod istim eksperimentalnim uslovima, koncentracija BF se takođe smanjivala, ali ne toliko vidno kao kod AB, tj. trenutno se degradiralo svega 7,1 %, dok u narednih 60 minuta pod uticajem 0,1M NaOH došlo je do degradacije od 8,19 %. Za 72 h ukupna degradacija BF iznosila je 23,62 %. Ovo pokazuje da je BF stabilniji na hidrolizu u baznoj sredini od AB. Ispitivanjem smješe AB i BF na dejstvo 0,1 M NaOH može se zaključiti da je AB stabilniji na hidrolizu u smješi, nego pojedinačno, dok se BF u ovim uslovima pokazao nestabilniji. Odnosno, u 0-tom minutu BF se degradirao 6,65 %, a AB 16,43 %, zatim u narednih 60 minuta BF se degradira za 9,17 %, a AB za 18,43 %. Za ukupno 24 h BF se degradirao za 18,30 %, a AB za 36,46 %, dok je ukupna degradacija nakon 72 h iznosila 33,78 % za BF i 67,18 % za AB. Ukupan stepen degradacije dosta je manji za AB u smješi nego pojedinačno (razlika za oko 20 %), dok je degradacija BF za oko 10 % veća u smješi nego pojedinačno. Tačan razlog ovakvog ponašanja BF nije poznat, ali se može

pretpostaviti da tokom bazne hidrolize nastaju produkti degradacije koji dodatno pospješuju degradaciju BF. Primjer hromatograma, sa degradacionim produktima AB i BF koji nastaju nakon izlaganja ispitivanih uzoraka sa rastvorom 0,1 M NaOH, dat je na Slici 4.



Slika 4. Hromatogram uzorka smješe BF i AB nakon tretiranja sa 0,1 M NaOH

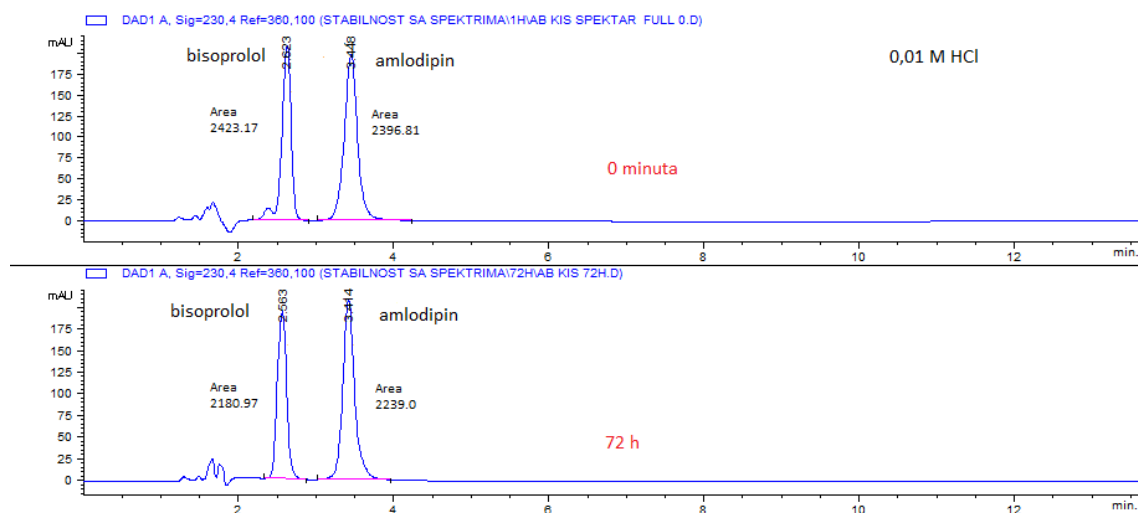
Figure 4. Chromatogram of the sample mixture BF and AB after treatment with 0,1 M NaOH

S obzirom na izraženu nestabilnost analita u baznoj sredini, posebno AB, ispitivanje nije nastavljeno u smislu analize uticaja slabije baze.

### Degradacija u kiseloj sredini

Hidroliza AB i BF sa 0,1 M HCl pokazala je potpunu degradaciju u 0-tom minutu, pa se analiza ponovila sa manjom koncentracijom ove kiseline. Hromatografska analiza uzoraka pripremljenih u 0,01 M HCl pokazala je da su AB i BF nešto stabilniji nego u baznoj sredini. Degradacija AB u 0-tom minutu iznosila je 5,46 %, dok je u narednih 60 minuta iznosila 5,57 %. Za ukupno 72 h degradiralo se 16,24 % AB. BF se pokazao isto nestabilan na dejstvo 0,01 M HCl, tj. trenutno se degradira 4,57 % BF dok u prvih 60 minuta nije došlo do značajne degradacije i ukupna degradacija je iznosila 5,50 %. U toku 72 h tretiranja BF sa 0,01 M HCl degradiralo se 16,79 %. U smješi oba jedinjenja su se pokazala nešto stabilnija, odnosno BF se u prvih 60 minuta degradirao 4,44 %, a za ukupno 72 h 13,99 %, dok se AB u prvih 60 minuta degradirao za 4,58 %, a za 72 h 10,86 %. Hromatogram rastvora smješe AB i BF, koji su izlagani djelovanju 0,01M HCl

rastvora, prikazan je na Slici 5. Može se pretpostaviti da ova dva jedinjenja u smješi povećavaju stabilnost jedan drugom na dejstvo ovog *stres agensa*.

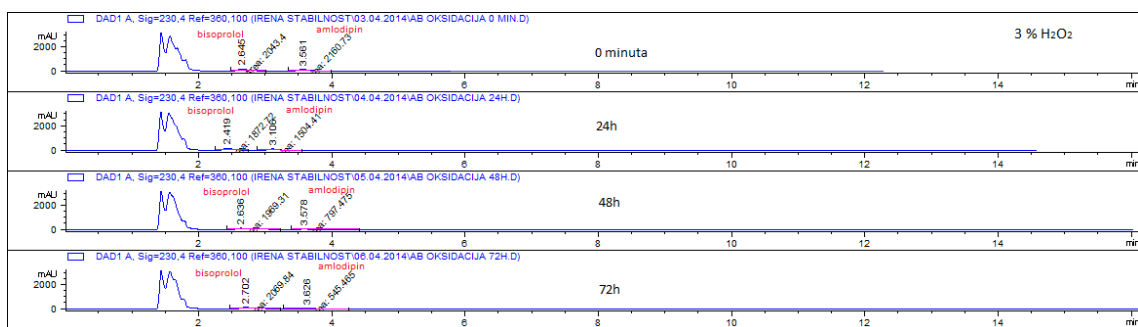


**Slika 5. Hromatogram uzorka smješe BF i AB nakon tretiranja sa 0,01 M HCl**

**Figure 5. Chromatogram of the sample mixture BF and AB after treatment with 0,01 M HCl**

### ***Degradacija pod dejstvom oksidacionog sredstva***

Degradacija AB i BF sa oksidacionim sredstvom (3 %, 15 % i 30 % H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) daleko je intenzivnija od njihove degradacije sa 0,1 M NaOH i 0,01 M HCl. Tretiranjem ispitivanih jedinjenja sa 3 % H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> došlo je do značajne degradacije. U 0-tom minutu AB se degradirao za 17,09 %, dok u narednih 60 minuta nije došlo do značajne degradacije. U toku 24 h, AB se degradirao za 49,74 %, za 48 h 88,55 %, da bi se za 72 h skoro potpuno degradirao, tj. za 94,2 %. BF se pokazao nešto stabilniji, tj. u 0-tom minutu se degradirao 10,08 %, ali u narednih 60 minuta 26,06 %. Za 24 h 32,43 %, za 48 h 49,6 % i za 72 h 50,06 %. Ispitivanjem smješe ova dva jedinjenja na dejstvo 3 % H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> pokazalo se da su oba jedinjenja stabilnija na oksidaciju, odnosno BF se u 0-tom vremenu degradira 16,7 % i u narednih 72 h degradira se 43,27 %. AB se u smješi trenutno degradira za 10,22 %, u toku 24 h do 41,81 %, a nakon 72 h 78,9 %. Hromatogram smeše pod ispitivanim uslovima prikazan je na Slici 6.



**Slika 6. Hromatogram uzorka smješe BF i AB nakon tretiranja sa 3 % H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>**

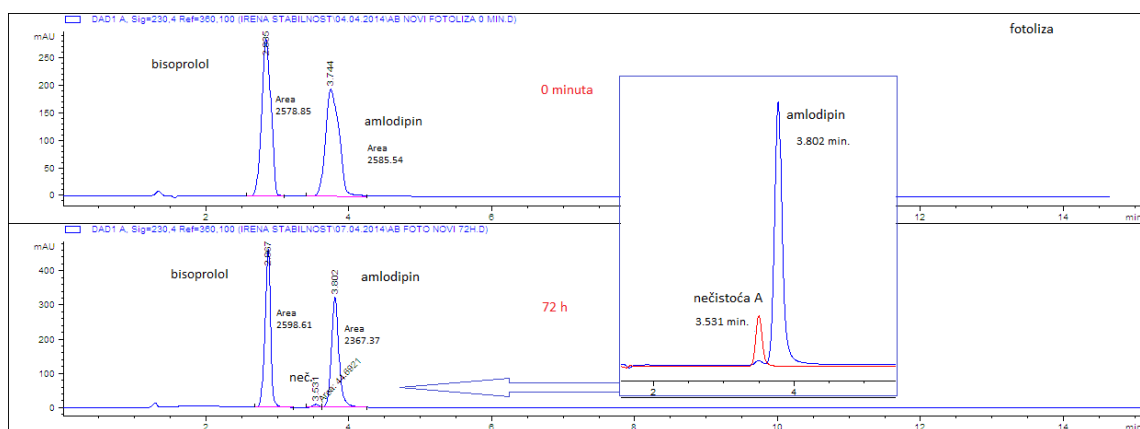
**Figure 6. Chromatogram of the sample mixture BF and AB after treatment with 3 % H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>**

Tretiranjem ispitivanih jedinjenja sa 15 % H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> dovelo je do još intenzivnije degradacije. AB se trenutno degradira za 26,36 % i u prvih 60 minuta 38,47 %. U toku 24 h došlo je do značajne degradacije od 85,35 %, da bi se u toku 72 h skoro potpuno degradirao do 97,99 %. BF pod dejstvom 15 % H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> u 0-tom minutu degradira se za 44,13 % i u prvih 60 minuta nema značajnih promjena. U toku 24 h pokazala se značajna degradacija za 69,14 %, da bi se za 72 h degradirao za 84,93 %. U smješi oba jedinjenja su se ponašala slično. Iz ovog se može zaključiti da je BF stabilniji na oksidaciju od AB, što se može vidjeti i iz analiza u kojima su ispitivani analiti tretirani sa jačom koncentracijom H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (30 %).

Tretiranjem svih uzoraka sa 30 % H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> dovelo je u 0-tom minutu do degradacije od 75,77 % AB i 73,12 % BF, da bi se u narednih 60 minuta potpuno degradirali. U smješi BF se pokazao nešto stabilniji na dejstvo ovog *stres agensa*, tj. u 0-tom minutu degradirao se za 65,34 %, nakon 60 minuta za 92,47 %, a za ukupno 24 h degradirao se 100 %. AB se u smješi, na dejstvo ovog *stres agensa*, ponašao identično kao i u pojedinačnoj analizi.

### **Degradacija pod uticajem svjetlosti**

Izlaganjem ispitivanih jedinjenja elektromagnetnom zračenju talasnih dužina vidljivog dela spektra u cilju ispitivanja stabilnosti na fotolizu, pokazalo se da je BF stabilan, dok je AB i ovdje pokazao nestabilnost. U prva 24 h AB se degradirao za 1,83 %, a u toku 72 h za ukupno 8,44 %. U toku ove *stres studije*, pri degradaciji AB, uočava se nastanak nečistoće na retencionom vremenu 3,531 minuta, koja je naročito vidljiva nakon 72 h ove *stres studije*. Injektovanjem standarda nečistoće A amlodipina potvrđeno je da se nalazi na istom retencionom vremenu, kao što je nečistoća koja je nastala u toku ove analize. Odgovarajući hromatogram prikazan je na Slici 7. Ispitivanjem smješe ovih jedinjenja koncentracija BF se nije mijenjala tokom 72 h, a AB se pokazao stabilniji na dejstvo svjetla u smješi sa BF, tj. ukupna degradacija nakon 72 h za AB iznosila je 6,82 %.

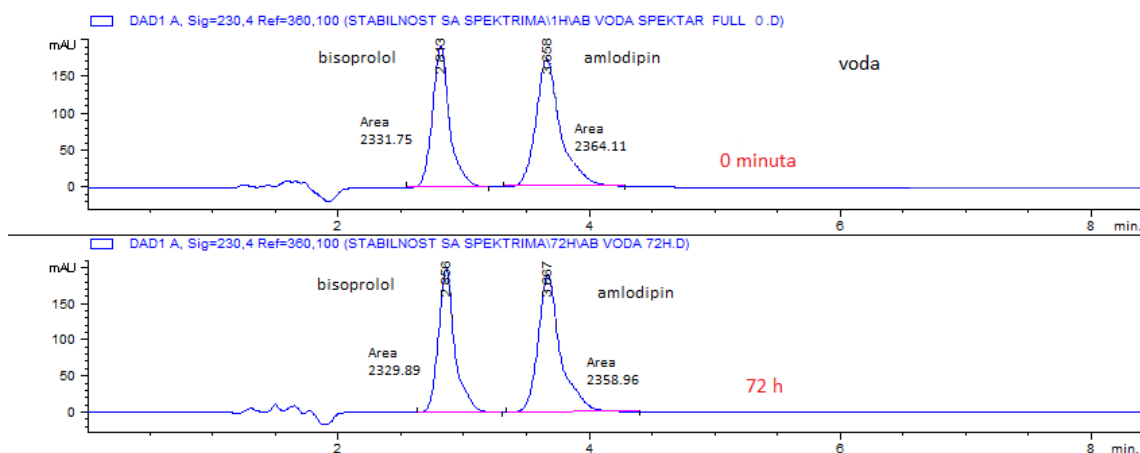


Slika 7. Hromatogram uzorka smješe BF i AB nakon fotolize

Figure 7. Chromatogram of the sample mixture BF and AB after hydrolysis

### Degradacija u neutralnoj sredini

Ispitivanje stabilnosti u *studijama forsirane degradacije* vrši se i hidrolizom u neutralnoj sredini. AB se u prvih 60 minuta degradirao za 3,42 %, nakon 24 h degradirao se za 4,69 %, nakon 48 h degradirao se za 6,65 % i ukupno za 72 h degradirao se za 10,62 %. BF se pokazao dosta stabilniji, odnosno u prva 24 h se degradirao za svega 0,19 % i za ukupno 72 h 0,93 %. U smješi AB se u toku 60 minuta degradirao za 2,5 %, nakon 24 h za 4,57 %, a za ukupno 72 h degradirao se za 6,09 %. BF se u smješi pokazao stabilan tokom sva 72 h, tj. nije došlo do značajne degradacije (Slika 8). Relativno nizak procenat degradacije analita u neutralnoj sredini biće predmet daljih istraživanja.



Slika 8. Hromatogram uzorka smješe BF i AB u neutralnoj sredini

Figure 8. Chromatogram of the sample mixture BF and AB under neutral conditions

Na kraju ove studije može se zaključiti da je AB nestabilniji na sve ispitivane *stres agense* od BF, što se može objasniti njegovom strukturom (prisustvo 1,4-dihidropiridinskog jezgra, 2-aminoetoksi-metil radikala, kao i prisustvo estrskih funkcionalnih grupa).

## Zaključak

Iz navedenih ispitivanja i dobijenih rezultata može se zaključiti da je smješa AB i BF, u većini slučajeva, stabilnija na tretiranje *stres agensima*, nego kad se ova jedinjenja pojedinačno ispituju sa odgovarajućim *stres agensima*. Može se pretpostaviti da njihovim zajedničkim prisustvom u ispitivanim *stres agensima* dolazi do stabilizacije osjetljivih funkcionalnih grupa u njihovoj hemijskoj strukturi, te u manjem stepenu podliježu procesima hidrolize, oksidacije i fotolize, što je naročito izraženo za AB. Međutim, to nije uvijek slučaj, naime BF se pokazao nestabilniji u smješi (nego pojedinačno) tretiranjem sa 0,1 M NaOH nakon 1 h, 24 h, 48 h i 72 h, ali i tretiranjem sa 3 % H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> nakon 0-tog minuta. Pretpostavlja se da je razlog ove nestabilnosti nastanak nekih od produkata degradacije ispitivanih analita (npr. nastanak kiselina usljed hidrolize estara) koji dodatno povećavaju nestabilnost i dodatno degradira molekulu BF. Ovakvo ponašanje BF, u pojedinačnim analizama i u smješi sa AB, otvara mogućnost za dodatna i detaljnija ispitivanja vezana za njihovu stabilnost, ali i identifikaciju puteva degradacije i samih degradacionih produkata.

Iz dobijenih rezultata vidi se da je degradacija AB i BF najjače izražena pod dejstvom vodonik-peroksida u koncentracijama od 3 % do 30 %, gdje se pod dejstvom 3 % H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> skoro u potpunosti degradiraju u toku 72 h, dok je u većim koncentracijama degradacija još intenzivnija. Degradacija ovih jedinjenja takođe je intenzivna pod dejstvom 0,1 M NaOH, ali u manjem stepenu od vodonik-peroksida, dok je degradacija AB i BF najslabije izražena u vodi.

## Zahvalnica

Ovaj rad realizovan je u okviru naučnog projekta 172052 koji finansira Ministarstvo za prosvetu, nauku i tehnološki razvoj Republike Srbije.

## Literatura

1. Baertschi SW (ed), *Pharmaceutical Stress Testing, Predicting Drug Degradation*, Taylor & Francis Group, Boca Raton, 2005.
2. Alsante KM, Ando A, Brown R, Ensing J, Hatajik TD, Kong W, Tsuda Y. The role of degradant profiling in active pharmaceutical ingredients and drug products, *Adv Drug Deliv Rev.* 2007; 59:29–37.
3. ICH Steering Committee. *Stability Testing of New Drug Substance and Products*, ICH Q1A (R2). 2003.
4. ICH Steering Committee. *Stability testing: photostability of new drug substances and products*, ICH Q1B. 1996.
5. Huynh-Ba K. *Handbook of stability testing in pharmaceutical development*, Springer Science, New York, USA, 2009.
6. World Health Organization, *Stability testing of active pharmaceutical ingredients and finished pharmaceutical products*, Annex 2, WHO technical report series, No. 953, 2009.
7. *European Pharmacopoeia 7th Edition*, Council of Europe, Strasbourg 2011.
8. Vora DN, Kadav AA. Development and validation of a simultaneous HPLC method for estimation of bisoprolol fumarate and amlodipine besylate from tablets. *Indian J Pharm Sci.* 2008; 70(4): 542–46.
9. Shalini P, Krishan P. Development and validation of a simultaneous HPLC method for assay and dissolution of bisoprolol fumarate and amlodipine besylate in pharmaceutical dosage. *RJPDT* 2012; 4(1):62–6.
10. Braza AJ, Modamio P, Lastra CF, Mariño EL. Development, validation and analytical error function of two chromatographic methods with fluorimetric detection for the determination of bisoprolol and metoprolol in human plasma. *Biomed Chromatogr.* 2002; 16(8):517–22.
11. Ulu ST, Aydoğmuş Z. An HPLC method for the determination of bisoprolol in human plasma and its application to a pharmacokinetic study. *J Chromatogr Sci.* 2012; 50(7):615–19.
12. Bozal B, Gumustas M, Dogan-Topal B, Uslu B, Ozkan SA. Fully validated simultaneous determination of bisoprolol fumarate and hydrochlorothiazide in their dosage forms using different voltammetric, chromatographic, and spectrophotometric analytical methods. *J AOAC Int.* 2013; 96(1):42–51.
13. Gopani KH, Havele SS, Dhaneshwar SR. Application of high performance thin layer chromatography densitometry for the simultaneous determination of amlodipine besylate and lisinopril in bulk drug and tablet formulation. *IJPT* 2011; 3(2):2353–67.
14. Wankhede SB, Raka KC, Wadkar S, Chitlange SS. Spectrophotometric and HPLC methods for simultaneous estimation of amlodipine besylate, losartan potassium and hydrochlorothiazide in tablets. *Indian J Pharm Sci.* 2010; 72(1):136–40.
15. Vichare V, Tambe V, Kashikar V, Dhole SN. Spectrophotometric simultaneous determination of amlodipine and hydrochlorothiazide in combined tablet dosage form by simultaneous equation, absorption ratio and first order derivative spectroscopy methods. *Int J Chem Res* 2011; 2(1):7–10.

16. Pournima SP, Harinath NM, Pishwikar AP. RP–HPLC method for simultaneous estimation of amlodipine besylate and olmesartan medoxomil from tablet. *Int J Pharm Pharm Sci.* 2011; 3(3):146–49.
17. Prasada Rao CHMM, Rahaman SA, Prasad YR, Reddy PG. RP–HPLC method of simultaneous estimation of amlodipine besylate and metoprolol in combined dosage form. *IJPRD* 2010; 9(2):69–76.
18. Zhao J, Wu HL, Niu JF, Yu YJ, Yu LL, Kang C, Li Q, Zhang XH, Yu RQ. Chemometric resolution of coeluting peaks of eleven antihypertensives from multiple classes in high performance liquid chromatography: A comprehensive research in human serum, health product and Chinese patent medicine samples. *J Chromatogr* 2012; 902:96–107.
19. Padivitage NL, Armstrong DW. Sulfonated cyclofructan 6 based stationary phase for hydrophilic interaction chromatography. *J Sep Sci.* 2011; 34(14):1636–47.
20. Van Nuijs AL, Tarcomnicu I, Simons W, Bervoets L, Blust R, Jorens PG, Neels H, Covaci A. Optimization and validation of a hydrophilic interaction liquid chromatography–tandem mass spectrometry method for the determination of 13 top-prescribed pharmaceuticals in influent wastewater. *Anal Bioanal Chem.* 2010; 398(5):2211–22.
21. Jeong DW, KimYH, Ji HY, Youn YS, Lee KC, Lee HS. Analysis of carvedilol in human plasma using hydrophilic interaction liquid chromatography with tandem mass spectrometry. *J Pharm Biomed Anal.* 2007; 44(2):547–52.
22. Quiming NS, Denola NL, Ueta I, Saito Y, Tatematsu S, Jinno K. Retention prediction of adrenoreceptor agonists and antagonists on a diol column in hydrophilic interaction chromatography. *Anal Chim Acta.* 2007; 598(1):41–50.
23. Kristoffersen L, Øiestad EL, Opdal MS, Krogh M, Lundanes E, Christophersen AS. Simultaneous determination of 6 beta-blockers, 3 calcium-channel antagonists, 4 angiotensin-II antagonists and 1 antiarrhythmic drug in post-mortem whole blood by automated solid phase extraction and liquid chromatography mass spectrometry. Method development and robustness testing by experimental design. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci.* 2007; 850(1–2):147–60.
24. Thomas LL, David AW, Victoria FR, William SZ. Foye’s principles of Medicinal Chemistry, 7<sup>th</sup> Edition, Lippincott Williams & Wilkins, Baltimore, 2013.
25. Divaya S, Damele S, Joshi A, Datar A. Forced degradation studies of amlodipine besylate and characterization of its major degradation products by LC–MS/MC. *Int. J. LifeSc. Bt. & Pharm. Res.* 2014; 3(3):196–207.
26. Kasagić-Vujanović I, Rakić T, Jančić-Stojanović B, Ivanović D. Design of experiments in optimization and validation of a hydrophilic interaction liquid chromatography method for determination of amlodipine besylate and bisoprolol fumarate. *J Liq Chromatogr Rel Technol.* prihvaćen rad.



# **Study of forced degradation of amlodipine besylate and bisoprolol fumarate by application of hydrophilic interaction liquid chromatography**

**Irena Kasagić-Vujanović<sup>1\*</sup>, Biljana Jančić-Stojanović<sup>2</sup>,  
Darko Ivanović<sup>2</sup>**

<sup>1</sup> University of Banja Luka – Faculty of Medicine, Pharmacy Department, Department of Drug Analysis, Banja Luka, Republic of Srpska

<sup>2</sup> University of Belgrade – Faculty of Pharmacy, Department of Drug Analysis, Vojvode Stepe 450, Belgrade, Serbia

\* Corresponding author, Tel: +387 51 340 108; e-mail: [kasagic.irena@gmail.com](mailto:kasagic.irena@gmail.com)

---

## **Summary**

Currently, in pharmaceutical analysis, great importance is given to forced degradation studies, which can greatly help to predict the shelf life of the drug, but also for identification of possible degradation products. These studies enable investigation of stability indicating method, then it is used to test the active substances intrinsic/inner molecular stability, as well as defining active substances impurity profiles. In this work forced degradation studies of amlodipine besylate and bisoprolol fumarate either individually and in mixtures, was performed, where the method of hydrophilic interaction liquid chromatography was used, and any possible changes in the concentration of samples were followed. The results showed that the test compounds are sensitive to the tested stress agents, especially amlodipine besylate, and that both of these compounds showed increased stability in the mixture in comparison to individual analysis.

**Keywords:** amlodipine besylate, bisoprolol fumarate, forced degradation study, hydrophilic interaction liquid chromatography

---