



Review: Comparison of Validation and Amlodipine Content in Blood Plasma Samples Using High Performance Liquid Chromatography and Liquid Chromatography Mass Spectrometry

Review: Perbandingan Validasi dan Kadar Amlodipin dalam Sampel Plasma Darah pada Kromatografi Cair Kinerja Tinggi dan Kromatografi Cair Spektrometri Massa

Deborah Chennia Lau^{1*)}, Tiara Cinta Amelia¹, Diara Ravika Hadjami¹,

¹Universitas Singaperbangsa Karawang, Jawa Barat, Indonesia.

*email: 2010631210020@student.unsika.ac.id

ABSTRACT

Amlodipine has a high bioavailability, a large volume of distribution, and a sufficiently long elimination half-life of 35 to 50 hours so that low plasma concentrations of amlodipine are achieved after oral administration. One of the methods used to quantify amlodipine levels is High-Performance Liquid Chromatography and Liquid Chromatography Mass Spectrometry. This review aims to compare the validation of the two methods according to the parameters and determine the advantages and disadvantages of each process in terms of accuracy in identifying samples of amlodipine in blood plasma. An article review was conducted by collecting data from 2013 to 2023 using the Google Scholar and ScienceDirect databases filtered according to the inclusion and exclusion criteria. Seven journals could be compared according to the parameters of precision, accuracy, linearity, limit of detection and quantification. Better precision and accuracy are in the High-Performance Liquid Chromatography method, and good linearity is in the Mass Spectrometry Liquid Chromatography method. Liquid Chromatography Method Mass Spectrometry is easier to detect amlodipine levels because it can detect concentrations of more minor sample levels.

Keywords: *amlodipine, High-Performance Liquid Chromatography, Mass Spectrometry Liquid Chromatography, blood plasma, validation.*

ABSTRAK

Amlodipine memiliki bioavailabilitas tinggi, volume distribusi yang besar, dan waktu paruh eliminasi yang cukup lama yaitu 35 sampai 50 jam sehingga konsentrasi amlodipine plasma yang rendah dicapai setelah pemberian oral. Metode yang digunakan untuk kuantifikasi kadar amlodipin salah satunya yaitu metode Kromatografi Cair Kinerja Tinggi dan Kromatografi Cair Spektrometri Massa. Tujuan review ini yaitu membandingkan validasi kedua metode sesuai parameter dan mengetahui kelebihan dan kekurangan tiap metode dari segi keakuratan dalam mengidentifikasi sampel amlodipin dalam plasma darah.

Dilakukan article review dengan pengumpulan data dari tahun 2013 hingga 2023 menggunakan database google scholar dan sciencedirect yang disaring menurut kriteria inklusi dan eksklusi. Didapatkan 7 jurnal yang dapat dibandingkan menurut parameter presisi, akurasi, linearitas, limit deteksi, dan limit kuantifikasi. Presisi dan akurasi yang lebih baik adalah pada metode Kromatografi Cair Kinerja Tinggi dan linearitas yang baik adalah pada metode Kromatografi Cair Spektrometri Massa. Metode Kromatografi Cair Spektrometri Massa lebih mudah digunakan dalam deteksi kadar amlodipin karena mampu mendeteksi konsentrasi kadar sampel yang lebih sedikit.

Kata Kunci: amlodipine, Kromatografi Cair Kinerja Tinggi, Kromatografi Cair Spektrometri Massa, plasma darah, validasi

PENDAHULUAN

Penghambat saluran kalsium atau biasa disebut *calcium channel blocker* (CCB) telah banyak digunakan dalam pengobatan hipertensi dan angina pectoris serta kombinasi dengan penghambat reseptor angiotensin II akan meningkatkan aktivitas antihipertensi dengan kemanjuran yang lebih besar dan memiliki tolerabilitas yang lebih baik, yang memaksimalkan efek penurunan tekanan darah dan meminimalkan efek samping dari masing-masing komponen. (Chan Mei dkk, 2013). *World Health Organization* (WHO) pada tahun 2023 mengatakan bahwa sebanyak 1,28 miliar orang berusia 30 - 79 tahun di seluruh dunia menderita hipertensi. Dua pertiga diantaranya berada di negara berkembang dengan tingkat ekonomi menengah ke bawah salah satunya Indonesia (WHO, 2023).

Data yang diperoleh dari Riskesdas Kementerian Kesehatan Republik Indonesia, bahwa prevalensi hipertensi di Indonesia pada tahun 2018 sebesar 34,1% dengan jumlah kasus hipertensi sebesar 63.309.620 orang. Berdasarkan diagnosis dokter, sebesar 8,8% terdiagnosis hipertensi. Dari 8,8% penderita yang didiagnosis hipertensi, 32,3% tidak rutin minum obat dan 13,3% tidak minum obat dengan alasan merasa sudah sehat, minum obat tradisional, lupa, tidak mampu membeli obat, dsb. Hipertensi lebih sering terjadi pada perempuan dari pada laki-laki dan lebih banyak terjadi pada usia 75 tahun ke atas (Kemenkes RI, 2018). Dapat disimpulkan bahwa sebagian besar penderita hipertensi tidak mengetahui dirinya mengalami hipertensi sehingga banyak penderitanya tidak terdiagnosis kemudian tidak mendapatkan perawatan dan pengobatan. Maka dari itu, penyakit hipertensi ini sering disebut

sebagai *silent killer* karena merupakan penyakit yang sering kali muncul tanpa gejala dan baru terdeteksi ketika telah terjadi gangguan pada tubuh. (WHO, 2023). Hipertensi atau tekanan darah tinggi merupakan kondisi dimana tekanan darah pada saat kontraksi (*sistol*) menunjukkan lebih dari 140 mmHg dan tekanan darah pada saat relaksasi (*diastole*) menunjukkan lebih dari 90 mmHg.

Amlodipine{(R,S)-2-[2-aminoethoxy)methyl-4-(2-chlorophenyl)-3-thoxycarbonyl-5-methoxycarbonyl-6-methyl-1,4-dihydropyridine]} merupakan salah satu obat penghambat saluran kalsium yang ampuh digunakan untuk pengobatan hipertensi dan angina pectoris. Amlodipine memiliki bioavailabilitas tinggi, volume distribusi yang besar, dan waktu paruh eliminasi yang cukup lama ($t_{1/2}$) mulai dari 35 sampai 50 jam (Bhatt dkk, 2007). *Calcium channel blockers* (CCBs) secara luas banyak digunakan untuk pengelolaan hipertensi dan angina.

Telah dilaporkan bahwa konsentrasi amlodipine plasma yang rendah dicapai setelah pemberian oral. Amlodipine diserap dengan baik dengan konsentrasi plasma puncak yang dicapai setelah 6 sampai 12 jam. Amlodipine memiliki volume distribusi 20 L/kg. 97,5% amlodipine yang bersirkulasi terikat pada protein plasma. Amlodipine secara ekstensif dimetabolisme di hati menjadi metabolit inaktif, kemudian diekskresikan dalam urin 10% dan 60% sebagai metabolit.

Oleh karena itu, metode analitik yang sensitif dan spesifik sangat penting untuk penentuan amlodipine dalam plasma darah manusia. Telah banyak dilaporkan metode analitik untuk kuantifikasi amlodipine dalam plasma, seperti kromatografi gas (GC) dengan deteksi penangkapan electron, Kromatografi cair kinerja

tinggi (HPLC) dengan deteksi fluorimetri atau dengan deteksi ultraviolet atau dengan deteksi elektrokimia, kromatografi lapis tipis densitometri kinerja tinggi dan kromatografi cair spektrometri massa tandem (Chan Mei, dkk, 2013). Dalam article review ini, metode analisis yang dibahas adalah menggunakan kromatografi cair kinerja tinggi (KCKT) dan *Liquid Chromatography/Mass Spectrometry* (LC/MS). Metode kromatografi cair kinerja tinggi dan LC/MS adalah instrumen analitik yang menggabungkan pemisahan senyawa kimia dari kromatografi cair dan spektrometri massa untuk menunjukkan identitas sampel secara selektif. Validasi yang dilakukan untuk kedua metode tersebut dengan menggunakan parameter berdasarkan *International Conference on Harmonization* (ICH) tahun 1995, meliputi spesifitas, ketelitian (presisi), ketepatan (akurasi), linearitas, sensitivitas batas deteksi (*limit of detection*/LOD), dan batas kuantifikasi (*limit of quantification*/LOQ). Kedua metode ini kemudian dibandingkan untuk mengetahui kelebihan dan kekurangan dari masing-masing metode.

Melihat tingginya penderita hipertensi di dunia bahkan di Indonesia membuat peneliti untuk menganalisis perbandingan kadar amlodipine dalam sediaan farmasi dan plasma darah. Dengan tujuan dari artikel ini yaitu membandingkan validasi kedua metode sesuai parameter dan mengetahui kelebihan dan kekurangan tiap metode dari segi keakuratan dalam mengidentifikasi sampel amlodipin dalam plasma darah.

METODE PENELITIAN

Penulisan *review* artikel dilakukan dengan pencarian jurnal ilmiah terakreditasi nasional sinta dan Internasional melalui *database Pubmed*, *Google Scholar*, dan *Scencedirect*. Pencarian artikel menggunakan kata kunci “Amlodipine”, “Hipertensi”, “Hypertension”, “Kromatografi Cair Kinerja Tinggi”, “*High Performance Liquid Chromatography*”, “*Liquid Chromatography Mass Spectrometry*”, “Kromatografi Cair Spektrometri Massa”, “Sampel Plasma Darah”, “*Blood Plasma*”. Pengumpulan jurnal dilakukan pada bulan Februari sampai April. Jurnal yang dipublikasi yaitu pada rentang 2013-2023. Jurnal penelitian full-text: Jurnal berbahasa Inggris dan Indonesia dan dihasilkan sebanyak 2.726 jurnal. Selanjutnya, artikel disaring berdasarkan kriteria inklusi, yaitu validasi dan kadar amlodipin dalam sampel darah pada metode KCKT dan LC-MS. Kriteria eksklusi, yaitu ketidaksesuaian abstrak, hasil dan pembahasan artikel dengan judul penelitian, dan sampel obat kombinasi. Jurnal yang ditelaah membahas mengenai perbandingan kadar amlodipine dalam sampel darah pada metode KCKT dan LC-MS. Maka, jurnal yang didapatkan setelah disaring berjumlah 7 jurnal.

HASIL

Penelusuran jurnal validasi dan penetapan kadar amlodipin pada metode KCKT dan LC/MS dari tahun 2013-2023 yang dilakukan sebanyak 7 jurnal, disajikan pada tabel dibawah ini:

Tabel 1. Hasil validasi sampel amlodipin dalam darah pada kedua metode

Metode	Instrumen	Hasil	Sumber
Kromatografi Cair Kinerja Tinggi (KCKT)	Shimadzu (Japan) prominence chromatograph	- Konsentrasi sampel obat: LLOQ: 160 ng/ml LQC: 400 ng/ml MQC: 560 ng/ml HQC: 720 ng/ml - Linearitas (R ²): 0,9993 - Presisi (% CV): 2.633-9.474 - Akurasi (% nominal): 104.25-107.62	Dyade dkk, (2022)
	Shimadzu LC-2010 CHT	- Konsentrasi sampel obat: LQC: 24 ng/ml MQC: 36 ng/ml	Mahendra & Chakraborty (2021)

HQC: 48 ng/ml
 - Linearitas (R^2): 0,9913
 - Presisi
 Intraday(%): 1,48-0,64
 Interday(%): 3,586-1,65
 - Akurasi (%): 100,41-103,8
 - Stabilitas(%): 92,41-99.91 (keadaan beku)

Liquid Chromatography/ Mass Spectrometry (LC/MS)	Zorbax SB, C ₁₈ , 50 mm*4,6 mm, dan 3,5 mm.	- Konsentrasi sampel obat: LQC: 0.28 ng/ml MQC1: 1.1 ng/ml MQC2: 4.9 ng/ml HQC: 7.7 ng/ml - Linearitas (R^2): 0,9990 - Rata-rata SD: Within batch: 0,044 Intraday: 0,03; interday: 0,03 - Presisi (% CV): 1,01-7,61 - Akurasi (%) Intraday: 96.745%, Interday: 97.567 % - Sensitivitas: 99.83% - Stabilitas - LQC: 107.74% - HQC: 96.14%	Haque dkk., (2018)
	Chromolith RP _{18e} (100 mm × 4.6 mm)	- Konsentrasi sampel obat: LQC1: 0,6 ng/ml LQC2: 4 ng/ml MQC1: 10 ng/ml MQC2: 80 ng/mL HQC: 160 ng/ml - Linearitas (R^2) : 0,9992 - Presisi (%CV): 1,55-3,08 - Akurasi (%): 96,8-102,7 - (%recovery): 96,9-99,3	Shah dkk., (2017)
	Diamond C ₁₈ kolom (150 mm × 4,6 mm, 5 µm)	- Konsentrasi sampel obat: LQC: 0,1 ng/ml MQC: 1 ng/ml HQC: 10 ng/ml - Linieritas (R^2): 0,9918 - Presisi (%RSD) Intraday: 8,54; 4,32; 4,58. Inter day: 7,05; 5,16; 5,46 - Akurasi: 98,9%-106,9% - Sensitivitas: LOQ : 0,05 ng/mL	Chan-Mei dkk, (2013)
	Acquity Ultra	- Konsentrasi sampel obat:	Pongnarin

Performance LCTM, (Waters, Co., Ltd. USA)dengan kolom C18.	LLOQ: 0.05 ng/ml LQC: 0.15ng/ml MQC: 8 ng/ml HQC: 19 ng/mL - Linieritas (R ²): 0,9991 - Presisi plasma(%CV): 0,18-13,98 - Akurasi plasma (%): 90,03-109,6 - Presisi QC (%): Within: 2,56-11,67 Between-run: 5,97 -12,7 - Akurasi QC(%): Within: 80,4-117,8 Between-run: 94,53-102,41	dkk, (2017)
--	---	-------------

Hypurity C18 (50 x 2,1 mm, 5μ)	- Konsentrasi sampel obat: LQC: 0.29 ng/ml MQC: 9.56 ng/ml HQC: 15.20 ng/mL - Linearitas (R ²): 0,999 - Akurasi % : 98,77- 102,01 - Rata-rata % recovery: 76,9 - Presisi Within-run (%): 2,87-9,99 Between-run (%): 3,8-8,4 - Akurasi(%): Within-run: 98,28-104,04 Between-run: 98,77-102,01	Gupta dkk, (2017)
--------------------------------	--	-------------------

PEMBAHASAN

Amlodipin merupakan senyawa obat golongan *calcium channel blocker* (CCB) yang menghambat ion kalsium masuk ke dalam otot polos vaskular dan otot jantung, sehingga mampu menurunkan tekanan darah pada penderita hipertensi. Amlodipin sebagai obat antihipertensi perlu diketahui bioavailabilitasnya dalam darah. Waktu paruh amlodipin dalam plasma darah adalah 35 sampai 50 jam, dan efek dan kadar meningkat selama 7-10 hari selama terapi. Hal ini disebabkan karena penyerapan amlodipin sangat lambat (Nurhayati & Saputri, 2016). Amlodipin berikatan dengan protein plasma 98% yang menyebabkan jumlah kadar dalam plasma sedikit dan menunjukkan absorbansi yang kecil (Alawiyah & Mutakin, 2017). Maka dari itu, untuk mengetahui kadar amlodipin dalam darah, perlu menggunakan beberapa metode dan instrumen yang sesuai dan akurat. Pemilihan metode juga menjadi salah satu faktor penting dalam mengidentifikasi kadar

amlodipin dalam darah.

Kromatografi Cair Kinerja Tinggi (KCKT) atau *High Performance Liquid Chromatography* (HPLC) merupakan metode analisis yang digunakan untuk analisis pemisahan secara kualitatif, kuantitatif, pemisahan isolasi/pemurnian. Metode HPLC bekerja dengan melalui proses absorpsi dinamis dimana molekul analit bergerak melewati celah berpori (Anggraini & Desmaniar, 2020) atau secara kromatografi dimana pelarut dan zat terlarut terpisah oleh perbedaan kecepatan elusi dikarenakan zat terlarut melewati suatu kolom kromatografi (Alawiyah & Mutakin, 2017). Metode Kromatografi Cair Spektrometri Massa atau *Liquid Chromatography Mass Spectrometry* (LC/MS) merupakan instrumen analitik kombinasi antara kekuatan pemisahan senyawa kimia antara kromatografi cair dan Spektrometri massa untuk mendeteksi identitas sampel secara selektif. Metode ini melalui proses ionisasi pada suatu kolom kromatografi kemudian diidentifikasi dan dikuantisasi pada *electron multiplier detector*

(LPPT, 2022).

Validasi dalam suatu metode analisis merupakan penilaian untuk suatu parameter, dilihat dari percobaan laboratorium, untuk membuktikan bahwa parameter tersebut memenuhi persyaratan untuk penggunaannya (Harmita, 2004). Validasi dan penetapan kadar amlodipin pada kedua metode ini dapat terlihat dari parameter berdasarkan ICH (*International Conference on Harmonization*) tahun 1995 antara lain spesifisitas, ketelitian (presisi), ketepatan (akurasi), linearitas, sensitivitas batas deteksi (*Limit of Detection/LOD*), dan batas kuantifikasi (*Limit of Quantification/LOQ*).

Presisi atau ketelitian merupakan suatu ukuran hasil analisis yang berdekatan didapat dari sekumpulan perulangan pengukuran dari ukuran yang sama. Dalam analisis pengukuran, presisi dikenal sebagai deviasi standar relatif atau *Relative Standard Deviation (RSD)*, dalam sumber lain dapat disebut koefisien variasi atau *coefficient of variation (CV)* yang diperoleh dari independen disiapkan standar kontrol kualitas (Riyanto, 2014). Persyaratan nilai CV atau RSD suatu metode yang baik pada beberapa literatur adalah lebih kecil dari 2% (Harmita, 2004), < 5% untuk tingkat kepercayaan 95% (Christian, 2014), < 2,7% (Yuwono dan Indrayanto, 2005), tidak lebih dari 20% (Ahuja dan Dong, 2005). Berdasarkan data pada tabel hasil, didapatkan bahwa nilai CV/RSD baik pada metode Kromatografi Cair Kinerja Tinggi (KCKT) atau *High Performance Liquid Chromatography (HPLC)* maupun *Liquid Chromatography/ Mass Spectrometry (LC/MS)* telah memenuhi persyaratan validasi metode dan memiliki presisi yang baik. Namun, metode LC/MS pada beberapa jurnal tabel 1 rata-rata memiliki angka CV/RSD yang lebih besar jika dibandingkan dengan KCKT sehingga presisi pada metode KCKT lebih baik dibandingkan metode LC/MS.

Ketepatan atau akurasi suatu metode analisis diperoleh dari uji perolehan kembali dengan metode penambahan bahan baku pada analit (Dio dkk, 2021). Persyaratan uji akurasi atau recovery yaitu pada range 90,0 hingga 110,0% (Harmita, 2004). Berdasarkan data tabel hasil, didapatkan bahwa kedua metode yang dilakukan memiliki akurasi yang akurat dan memenuhi persyaratan keakuratan metode. Metode KCKT berdasarkan data memiliki rata-rata angka akurasi yang lebih besar dibandingkan metode LC/MS.

Perbedaan presisi dan akurasi pada kedua metode dapat disebabkan karena sampel yang digunakan pada pengujian. KCKT menggunakan sampel yang lebih banyak jika dibandingkan dengan LC/MS sehingga memungkinkan tingkat keakuratan KCKT lebih akurat. Tetapi hal ini bergantung pada limit kuantitasi (LOQ) dan Limit deteksi (LOD) dari suatu pengujian. LOQ merupakan jumlah atau konsentrasi terendah dari analit yang masih dapat ditentukan dan memenuhi kriteria akurasi dan presisi sedangkan LOD merupakan jumlah terkecil dari analit dalam sampel tetapi tidak dihitung pada suatu instrumen, sehingga nilainya tidak harus memenuhi kriteria akurasi dan presisi (Yulia, 2010). Namun, tidak semua jurnal diketahui nilai LOQ dan LOD sehingga sampel yang digunakan dan perbedaan metode berperan dalam perbedaan nilai presisi dan akurasinya.

Linearitas merupakan kemampuan suatu metode analisis dalam memperoleh hasil pengujian yang sesuai dengan konsentrasi analit dalam range konsentrasi yang ditetapkan (ICH, 1995). Persyaratan linearitas analisis yaitu nilai koefisien korelasi (R) yaitu lebih dari 0,999 (AOAC, 2002). Berdasarkan data penelitian pada tabel, hampir semua pengujian memenuhi syarat linearitas. Namun pada penelitian yang dilakukan Mahendra & Chakraborty tahun 2021, linearitas yang didapat adalah 0,991 sehingga belum memenuhi syarat linearitas pada pengujian.

KESIMPULAN

Suatu metode dikatakan valid apabila telah memenuhi persyaratan uji spesifisitas, ketelitian (presisi), ketepatan (akurasi), linearitas, sensitivitas batas deteksi (*Limit of Detection/LOD*), dan batas kuantifikasi (*Limit of Quantification/LOQ*). Metode KCKT dan LC/MS memiliki kelebihan dan kekurangan masing-masing dalam menganalisis suatu sampel. Kadar amlodipin dalam sampel darah lebih mudah diidentifikasi dengan metode LC/MS dibandingkan dengan KCKT karena mampu mendeteksi konsentrasi kadar sampel yang lebih sedikit. LC/MS memiliki nilai linearitas yang lebih baik. Tetapi berdasarkan data presisi dan akurasi, metode KCKT lebih akurat jika dibandingkan dengan metode LC/MS.

REFERENSI

- Ahuja, S., dan Dong, M, W, Eds. (2005). Handbook of Pharmaceutical Analysis by HPLC, Edisi Pertama. Elsevier, Inc: United Kingdom
- Alawiyah, A., Mutakin. (2017). Analisis Amlodipin Dalam Plasma Darah dan Sediaan Farmasi. *Farmaka*, 15(3), 123-133
- Angraini, N., Desmaniar, P. (2020). Optimasi High Performance Liquid Chromatography (HPLC) Untuk Analisis Asam Askorbat Guna Menunjang Kegiatan Praktikum Bioteknologi Kelautan. *Jurnal Penelitian Sains*, 22(2), 69-75.
- AOAC. (2019). Official Methods of Analysis of The Association of Analytical Chemists. Association of Official Analytical Chemists, Inc. Virginia USA.
- Bhatt, B., S.S. Agrawal. (2007). Capsules: Pharmaceutical Technology. Delhi Institute of Pharmaceutical Science and Research Sector-3, *Pushp Vihar, New Delhi*, 2-3.
- Chan-Mei., Chun-Min. W., Fan-Long. B., Rui. C., Xiao-Lu. W., Rong Li., Ben-Jie. W., Rui-Chen. (2013). Determination of Amlodipine in Human Plasma by LC-MS/MS and Its Bioequivalence Study in Healthy Chinese Subjects. *Pharmacology & Pharmacy*, 2013, 4, 191-200
- Christian, C. M. (2014). The Development and Validation of a Visual-Spatial Chemistry Specific (VSCS) Assessment Tool. *Journal of Research in Science Teaching*. 51(8), 963–981.
- Dyade, G. K., Lunkad, A. S., & Sawant R. L. Bio Analytical Validated Technique for the Simultaneous Estimation of Amlodipine, Rosuvastatin and Valsartan in Human Plasma by RP-HPLC Method. *International Journal of Pharmaceutical Science and Research*, 14(5), 2602-2612
- Dio, R. G. R., Bahri, S., Kiswandono, A. A., & Supriyanto, R. (2021). Validasi Metode Fotodegradasi Congo Red Terkatalis ZnO/Zeolit Y Secara Spektrofotometri Uv-Vis. *Analytical and Environmental Chemistry*, 6 (2), 134-144
- Kim, H. M., Juh-Hwan, P., Nguyen, P. L., Dae-Duk K., Sung W. K. (2019). Simultaneous Determination of Cardiovascular Drug in Dried Blood Spot by Liquid Chromatography-tandem Mass Spectrometry. *Journal of Food and Drug Analysis*, 27, 906-914
- Gupta R. K., Chaurasiab. A., Mishrac. K. B., Chaturvedid. V., Guptad. K. P. (2017). Estimation of Amlodipine in Human Plasma by Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry. *MIT International Journal of Pharmaceutical Sciences*, 3(2), 57–63
- Haque, M. A., Priya, D. K. S., Mohanty, D., Bakshi V., Boggula, N. (2018). Analytical Method Development and Validation of Amlodipine in Human Plasma Using Liquid Chromatography-Mass Spectrometry/Mass Spectrometry. *Asian Journal of Pharmaceutical and Clinical Research*. 11(7), 393-397
- Harmita. (2004). Petunjuk Pelaksanaan Validasi Metode dan Cara Perhitungannya. *Majalah Ilmu Kefarmasian*. Jakarta: FMIPA-UI Jakarta
- ICH. (1995). Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology. European Medicines Agency
- Kemenkes RI. (2018). Hasil utama RISKESDAS 2018. Jakarta: Badan Penelitian dan Pengembangan Kesehatan Kementerian Kesehatan RI
- Laboratorium Penelitian dan Pengujian Terpadu. (2022). Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry (LC-MS/MS) [Newsletter]. Yogyakarta: Universitas Gadjah Mada LPPT
- Shah, J. V., Parekh, J. M., Shah, P. A., Shah, P. V., Sanyal, M., & Shrivastav, P. S. (2017). Application of an LC-MS/MS Method for the Analysis of Amlodipine Valsartan and Hydrochlorothiazide in Polypill for Bioequivalence Study. *Journal of Pharmaceutical Analysis*. 7, 309-316
- World Health Organization. (2023, 16 Maret). Hypertension [website]. Diperoleh dari <https://who.int/news-room/fact-sheets/detail/hypertension>
- Yulia. (2010). Validasi Metode. Bandung: Diklat Validasi Metode Pusat Penelitian LIPI
- Yuwono, M., Indrayanto, G. (2005). Validation of Chromatographic Methods of Analysis. *Profile of Drug Substances, Excipients, and Related Methodology*, 32, 243 – 259.