

High-Performance Liquid Chromatography Method Validation for the Determination of Cyproheptadine Hydrochloride in Tablets

Validasi Metode *High Performance Liquid Chromatography* Untuk Penetapan Kadar Siproheptadin Hidroklorida Pada Tablet

Eka Putri Ramadhani ^a, Andi Suhendi ^{a*}, Dedi Hanwar ^a

^a Department of Pharmacy, Faculty of Pharmacy, Universitas Muhammadiyah Surakarta, Surakarta, Central Java, Indonesia.

*Corresponding Authors: andi.suhendi@ums.ac.id

Abstract

Cyproheptadine hydrochloride is an antihistamine drug widely available in tablet dosage forms; therefore, a validated analytical method is required to ensure product quality. This study aimed to develop and validate a Reversed-Phase High Performance Liquid Chromatography (RP-HPLC) method for the determination of cyproheptadine hydrochloride 4 mg in tablets according to ICH Q2(R2) and USP 2024 guidelines. The analysis was performed using an XBridge C18 column (2.1 mm × 50 mm; 3.5 μm) with an isocratic mobile phase of acetonitrile:0.1% acetic acid (60:40), a flow rate of 1.0 mL/min, an injection volume of 10 μL, and PDA detection at 285 nm. Validation parameters included specificity, linearity, accuracy, precision, robustness, LOD and LOQ. The method showed excellent linearity with R² of 0.997, recovery of 100.26%, precision with % RSD of 1.42%, LOD 0.0022% and LOQ of 0.0066%. Specificity testing showed no interfering peaks, while robustness was confirmed for a ±5% change in mobile phase composition (%RSD 1.26% for retention time and 1.97% for peak area) but not for a ±5% change in flow rate, where retention time gave %RSD of 2.14%. The procedure is fit for routine quality control assay of cyproheptadine hydrochloride tablets, with the stated limitation on flow-rate robustness.

Keywords: Cyproheptadine hydrochloride, tablet, HPLC, method validation.

Abstrak

Siproheptadin hidroklorida merupakan obat antihistamin yang tersedia luas dalam bentuk tablet, sehingga diperlukan metode analisis tervalidasi untuk menjamin mutu produk. Penelitian ini bertujuan mengembangkan dan memvalidasi metode *Reversed-Phase High Performance Liquid Chromatography* (RP-HPLC) untuk penetapan kadar siproheptadin hidroklorida 4 mg dalam tablet berdasarkan pedoman ICH Q2(R2) dan USP 2024. Analisis dilakukan menggunakan kolom XBridge C18 (2,1 mm × 50 mm; 3,5 μm) dengan fase gerak asetonitril:asam asetat 0,1% (60:40) secara isokratik, laju alir 1,0 mL/menit, volume injeksi 10 μL, dan deteksi PDA 285 nm. Validasi meliputi spesifisitas, linearitas, akurasi, presisi, *robustness*, LOD dan LOQ. Metode menunjukkan linearitas yang baik dengan nilai R² 0,997, *recovery* 100,26%, presisi (% RSD) 1,42%, LOD 0,0022% dan LOQ 0,0066%. Uji spesifisitas menunjukkan tidak adanya puncak pengganggu, dan *robustness* terpenuhi terhadap perubahan komposisi fase gerak ±5% (% RSD 1,26% untuk waktu retensi dan 1,97% untuk luas area), tetapi tidak terpenuhi terhadap perubahan laju alir ±5% dengan % RSD waktu retensi 2,14%. Prosedur ini layak digunakan untuk analisis rutin pengawasan mutu tablet siproheptadin hidroklorida dengan keterbatasan pada *robustness* laju alir.

Kata Kunci: Siproheptadin hidroklorida, tablet, HPLC, validasi metode.



Copyright © 2020 The author(s). You are free to : **Share** (copy and redistribute the material in any medium or format) and **Adapt** (remix, transform, and build upon the material) under the following terms: **Attribution** — You must give appropriate credit, provide a link to the license, and indicate if changes were made. You may do so in any reasonable manner, but not in any way that suggests the licensor endorses you or your use; **NonCommercial** — You may not use the material for commercial purposes; **ShareAlike** — If you remix, transform, or build upon the material, you must distribute your contributions under the same license as the original. Content from this work may be used under the terms of the [a Creative Commons Attribution-NonCommercial-ShareAlike 4.0 International \(CC BY-NC-SA 4.0\) License](https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/)

<https://doi.org/10.36490/journal-jps.com.v9i3.1841>

Article History:

Received: 20/07/2026,
Revised: 18/09/2026,
Accepted: 18/09/2026,
Available Online: 21/09/2026.

QR access this Article



Pendahuluan

Siproheptadin hidroklorida merupakan antihistamin generasi pertama golongan turunan piperidin yang memiliki aktivitas antagonis terhadap reseptor histamin H1 serta efek antiserotonergik. Senyawa ini digunakan secara klinis dalam terapi berbagai kondisi alergi, seperti rinitis alergi dan urtikaria, melalui mekanisme penghambatan aktivitas histamin pada reseptor H1. Selain aktivitas antihistamin, efek antagonis serotonin pada siproheptadin juga berkontribusi terhadap stimulasi nafsu makan dan peningkatan berat badan pada kondisi klinis tertentu [1]. Penggunaan siproheptadin hidroklorida dalam berbagai sediaan farmasi memerlukan pengawasan mutu yang ketat untuk menjamin keamanan, efektivitas, dan konsistensi kadar zat aktif dalam produk obat. Oleh karena itu, diperlukan metode analisis yang memiliki kemampuan selektivitas, akurasi, dan presisi yang memadai untuk mendukung pengujian mutu sediaan farmasi.

Salah satu aspek penting dalam pengendalian mutu obat adalah ketersediaan metode analisis yang telah tervalidasi sebelum diterapkan dalam pengujian rutin. Validasi metode analisis merupakan proses evaluasi sistematis untuk membuktikan bahwa suatu metode mampu menghasilkan data analitik yang sesuai dengan tujuan penggunaannya melalui parameter kinerja analitik, seperti spesifisitas, linearitas, akurasi, presisi, sensitivitas, dan *robustness*. Validasi diperlukan karena performa suatu metode dapat dipengaruhi oleh berbagai faktor, termasuk kondisi instrumen, lingkungan analisis, serta tahapan preparasi sampel pada masing-masing laboratorium [2]. Setelah metode memenuhi persyaratan validasi, verifikasi berkala dapat dilakukan untuk memastikan konsistensi kinerja metode selama penerapan rutin tanpa perlu melakukan validasi ulang secara keseluruhan [3]. Salah satu metode analisis yang banyak digunakan dalam pengujian bahan aktif farmasi dan memerlukan validasi komprehensif adalah kromatografi cair kinerja tinggi (*High Performance Liquid Chromatography*).

Beberapa metode kromatografi untuk penetapan siproheptadin hidroklorida telah dilaporkan, tetapi metode tersebut dikembangkan untuk tujuan analisis yang berbeda dari penetapan kadar rutin analit tunggal sehingga membutuhkan sumber daya yang relatif lebih besar. Tuani dkk. mengembangkan metode simultan untuk penetapan siproheptadin bersama vitamin B1, B5, dan B6 menggunakan kolom Eurospher ODS 150 mm dengan fase gerak metanol-larutan *ion-pairing*. Pemisahan empat analit tersebut menyebabkan waktu analisis mencapai 8 menit serta memerlukan pereaksi *ion-pairing* yang dapat mempersingkat umur kolom [4]. Abdelrahman dkk. mengembangkan metode *stability-indicating* untuk memisahkan siproheptadin dari impuritas dan produk degradasinya dengan laju alir 2 mL/menit, sehingga konsumsi fase gerak per injeksi relatif tinggi dengan waktu analisis sekitar 7,5 menit [5]. Sementara itu, Mendes dkk. menentukan kadar siproheptadin pada konsentrasi ng/mL dalam plasma menggunakan LC-MS/MS untuk keperluan studi bioekivalensi, yang membutuhkan instrumen dengan biaya investasi dan operasional lebih tinggi dibandingkan instrumen yang umumnya tersedia di laboratorium pengawasan mutu [6]. Prosedur dalam monografi USP juga menggunakan kolom L1 berukuran 3,9 mm × 15 cm [7]. Berdasarkan kondisi tersebut, masih diperlukan prosedur yang dioptimalkan secara khusus untuk kebutuhan rutin laboratorium pengawasan mutu, terutama penetapan kadar analit tunggal dalam sediaan tablet dengan jumlah sampel yang besar, waktu analisis yang singkat, konsumsi pelarut yang rendah, serta penggunaan instrumentasi HPLC-PDA konvensional. Berdasarkan kesenjangan tersebut, penelitian ini bertujuan untuk mengembangkan prosedur RP-HPLC isokratik menggunakan kolom pendek berukuran 50 mm untuk penetapan kadar siproheptadin hidroklorida dalam tablet dengan waktu analisis total tidak lebih dari 3 menit, serta memvalidasi prosedur yang dikembangkan berdasarkan kriteria keberterimaan ICH Q2(R2), USP Bab Umum, dan Farmakope Indonesia Edisi VI. Validasi meliputi spesifisitas, linearitas, akurasi, keterulangan, *robustness*, batas deteksi, dan batas kuantitasi.

Metode Penelitian

Alat dan bahan

HPLC Alliance e2695 (Waters), Timbangan analitik 0,01 mg (Ohaus), Alat gelas, *Sonicator* (Branson), Mikro pipet (Socorex), *Vacuum* Buchner. Bahan yang digunakan meliputi, Standar siproheptadin (BPOM, No. Kontrol B0318108), Tablet siproheptadin HCl 4 mg (Merek X), Metanol HPLC *grade* (RCI Labscan), Asetonitril HPLC *grade* (RCI Labscan), Asam asetat glasial PA (Merck), Water HPLC *grade* (Fisher Scientific), Filter membrane 0,22 μm (Aijiren).

Sistem HPLC

HPLC Alliance e2695 (Waters), Kolom XBridge C18 (2,1 mm $\times$ 50 mm; 3,5 μm), *Empower Software*, Detektor PDA dengan panjang gelombang 285 nm. Asetonitril (Fase gerak A) dan Asam asetat 0,1% (Fase gerak B). Dijalankan secara isokratik dengan perbandingan fase gerak A 60% dan fase gerak B 40% dengan kecepatan alir 1,0 mL/menit, volume injeksi 10 μL dan waktu analisis selama 3 menit. Sebelum analisis, kolom dikondisikan dengan mengalirkan fase gerak pada laju alir kerja hingga delta psi konstan. Analisis dilakukan pada suhu ruang yang terkendali. Setelah rangkaian analisis selesai, kolom dicuci dengan air 100% dilanjutkan dengan metanol 100% dan diakhiri dengan metanol:air (10:90) untuk menghilangkan sisa asam asetat sebelum penyimpanan.

Pembuatan Stok Baku (Konsentrasi 0,08%)

Stok dibuat dengan melarutkan 200 mg standar siproheptadin (BPOM) pada metanol sampai volume 250 mL. Kemudian disonikasi selama 10 menit menggunakan sonikator Branson sampai terlarut sempurna [8].

Pembuatan Fase Gerak

Dibuat larutan asam asetat 0,1% dengan cara mengambil sebanyak 500 μL asam asetat glasial 100% dan ditambahkan air HPLC sampai volume 500 mL. Kemudian larutan disaring menggunakan *vacuum* buchner, lalu dilakukan *degassing* selama 15 menit. Larutan asetonitril HPLC dilakukan *degassing* selama 15 menit [6].

Pembuatan dan Penetapan Kurva Baku

Diambil larutan stok siproheptadin dan dilarutkan dalam fase gerak sebanyak enam konsentrasi yaitu: 0,002%; 0,004%; 0,008%; 0,012%; 0,016%; dan 0,020%. Larutan disaring menggunakan filter 0,22 μm . Pembuatan larutan direplikasi sebanyak tiga kali. Kemudian dibuat kurva baku kalibrasi dan dihitung persamaan regresi linear dengan keberterimaan (r^2) $\geq$ 0,999 atau mendekati satu [9,10]. Pengambilan masing-masing larutan dapat dilihat pada **Tabel 1**.

Tabel 1. Pembuatan larutan kurva baku siproheptadin hidroklorida. Seluruh larutan diencerkan dengan fase gerak asetonitril:asam asetat 0,1% (60:40) sampai volume akhir 1000 μL .

Konsentrasi target (%)	Pengambilan larutan baku 0,08% (μL)	Penambahan fase gerak asetonitril:asam asetat 0,1% (60:40) (μL)
0,020	250	750
0,016	200	800
0,012	150	850
0,008	100	900
0,004	50	950
0,002	25	975

Penetapan Akurasi

Akurasi dievaluasi dengan metode penambahan baku (*spiking*) pada matriks sampel. Beberapa tablet digerus lalu ditimbang sesuai dengan bobot per tablet. Kemudian serbuk yang telah ditimbang dilarutkan ke dalam metanol, lalu ditambahkan zat aktif murni dengan tiga level konsentrasi yaitu 80%, 100%, dan 120% sesuai dengan **Tabel 2**. Larutan uji diencerkan sesuai konsentrasi yang sesuai. Larutan uji yang sudah jadi kemudian disaring menggunakan filter *syringe* 0,22 μm . Dilakukan pembacaan larutan uji dengan replikasi sebanyak 3 kali. Kriteria keberterimaan akurasi adalah *recovery* 98,0%-102,0% dengan % RSD $\leq$ 2,0% [9].

Tabel 2. Penambahan akurasi siproheptadin hidroklorida.

Kelompok	Jumlah larutan stok (0,08%) yang diambil (mL)	Konsentrasi zat (%)	Penambahan zat aktif (%)	Volume akhir (mL)
Sampel	-	0,04	-	1
Sampel + zat aktif 80%	4	0,072	0,032	
Sampel + zat aktif 100%	5	0,08	0,04	
Sampel + zat aktif 120%	6	0,088	0,048	

Penetapan Presisi

Presisi dalam penelitian ini ditentukan melalui uji keterulangan (*repeatability* atau presisi intra-hari) sesuai dengan definisi ICH Q2(R2). Seluruh pengujian dilakukan pada hari yang sama oleh satu analis, menggunakan instrumen yang sama dan satu betas fase gerak. Tujuh tablet yang telah ditimbang masing-masing kemudian digerus dan dilarutkan ke dalam 10 mL metanol. Diambil 200 µL larutan tersebut dan dilarutkan pada fase gerak hingga volumenya 1000 µL. Larutan uji disaring menggunakan filter *syringe* 0,22 µm. Dibuat 7 larutan sebanyak tablet yang ditimbang. Masing-masing larutan uji dibaca sebanyak 1 kali. Hasil kadar terhitung digunakan untuk menghitung % RSD [9,11].

Penetapan Spesifisitas

Larutan sampel, larutan standar, dan fase gerak diinjeksikan masing-masing 3 kali replikasi. Spesifisitas menunjukkan kemampuan metode analisis untuk mengidentifikasi analit target secara spesifik tanpa gangguan dari senyawa pengotor dalam sampel [9,12].

Penetapan Linearitas

Dibuat larutan uji sebanyak 5 titik konsentrasi 80%-120% dengan menimbang serbuk sampel sesuai dengan **Tabel 3**. Kemudian diencerkan menggunakan 10 mL metanol. Lalu diencerkan kembali dengan mengambil 100 µL larutan tersebut dan ditambahkan fase gerak hingga volumenya 1000 µL. Kriteria penerimaan linearitas adalah koefisien korelasinya ($r^2 \geq 0,998$) [9,11].

Tabel 3. Penimbangan sampel linearitas siproheptadin hidroklorida.

Konsentrasi sampel	Berat sampel yang ditimbang (mg)
80%	147,42
90%	165,85
100%	184,28
110%	202,71
120%	221,14

Penetapan Robustness

Uji *robustness* dilakukan melalui pemberian variasi kecil terhadap kondisi analisis optimum. Parameter kromatografi yang dievaluasi meliputi perubahan laju alir sebesar $\pm 5\%$ serta perubahan komposisi fase gerak sebesar $\pm 5\%$ dari kondisi optimum. Larutan baku siproheptadin hidroklorida dianalisis pada masing-masing kondisi variasi. Ketangguhan metode ditentukan berdasarkan perubahan parameter kromatografi, yaitu waktu retensi, dan luas area puncak [9].

Penetapan LOD dan LOQ

Penetapan LOD dilakukan menggunakan pendekatan berbasis kurva kalibrasi. Nilai LOD diperoleh dengan mengalikan simpangan baku respons sebesar 3,3, kemudian membaginya dengan nilai kemiringan (*slope*) kurva kalibrasi.

$$LOD = \frac{3,3\sigma}{s}$$

Sedangkan LOQ dinyatakan dalam bentuk konsentrasi analit yang terkandung dalam sampel, misalnya dalam satuan persen atau bagian per miliar. Nilai LOQ diperoleh melalui perhitungan berdasarkan hasil analisis kurva kalibrasi, yaitu dengan mengalikan simpangan baku (standar deviasi) respon sebesar 10 kali, kemudian membagi hasilnya dengan nilai kemiringan (*slope*) kurva baku yang diperoleh [9,13].

$$LOQ = \frac{10\sigma}{s}$$

Penetapan Kadar

Sebuah tablet yang telah ditimbang, digerus lalu dilarutkan ke dalam 10 mL metanol. Kemudian diambil 200 μ L larutan tersebut dan dilarutkan pada fase gerak hingga volumenya 1000 μ L. Larutan uji disaring menggunakan filter *syringe* 0,22 μ m. Larutan uji dibaca sebanyak 3 kali. Hasil kadar terhitung digunakan untuk menghitung % klaim kadar tablet [9].

Analisis Data

Perhitungan didasarkan pada persamaan regresi kurva baku yang diperoleh dari enam titik konsentrasi yaitu $y = bx + a$, dengan y adalah luas area puncak dan x adalah konsentrasi larutan yang diinjeksikan (% b/v). Konsentrasi larutan injeksi dihitung dengan membalik persamaan tersebut:

$$x = (A - a) / b$$

dengan A adalah luas area puncak larutan uji, a adalah nilai intersep persamaan kurva baku, dan b adalah nilai kemiringan atau *slope* persamaan kurva baku. Kadar analit pada larutan sampel sebelum pengenceran diperoleh dengan mengalikan hasil tersebut dengan faktor pengenceran:

$$\text{Kadar (\% b/v)} = x \times \text{FP}$$

Recovery pada uji akurasi dihitung berdasarkan selisih kadar terukur yang ditambahkan baku terhadap kadar terukur larutan sampel tanpa penambahan, dibagi kadar baku yang ditambahkan:

$$\text{Recovery (\%)} = [(C_{\text{terukur}} - C_{\text{sampel tanpa penambahan}}) / C_{\text{penambahan}}] \times 100\%$$

Pada penetapan kadar per tablet, kadar dalam satuan % b/v dikonversi menjadi mg/mL, kemudian dinyatakan sebagai nisbah bobot per bobot terhadap serbuk tablet yang ditimbang dan dilarutkan dalam 10 mL metanol:

$$\text{Nisbah b/b} = \text{Kadar (mg/mL)} \div [\text{bobot serbuk ditimbang (mg)} / 10 \text{ mL}].$$

Kadar zat aktif per tablet dan persentasenya terhadap klaim etiket tablet kemudian dihitung sebagai:

$$\text{Kadar per tablet (mg)} = \text{Nisbah b/b} \times \text{bobot tablet rata-rata (mg)}$$

$$\text{Kadar terhadap klaim (\%)} = [\text{Kadar per tablet (mg)} / 4 \text{ mg}] \times 100\%$$

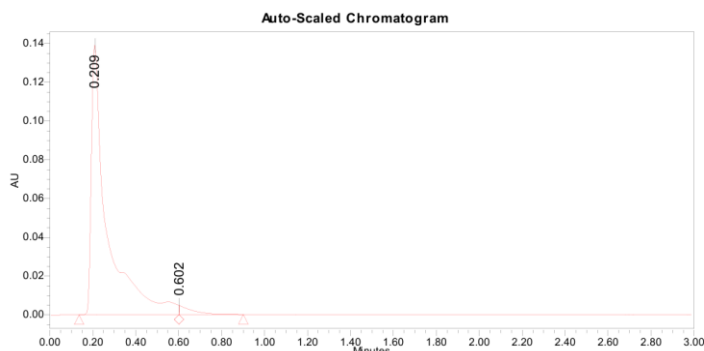
Regresi linear, koefisien korelasi (r), koefisien determinasi (r^2), simpangan baku residual regresi, simpangan baku (SD), dan simpangan baku relatif (% RSD) dihitung menggunakan Microsoft Excel.

Hasil dan Pembahasan

Pemilihan RP-HPLC sebagai sistem analisis siproheptadin hidroklorida didasarkan pada karakteristik molekulnya yang memiliki cincin aromatik dan bersifat relatif hidrofobik. Sifat tersebut memungkinkan siproheptadin berinteraksi secara selektif dengan fase diam non polar berbasis C18 melalui interaksi hidrofobik. Penggunaan pendekatan ini sebelumnya telah dilaporkan mampu menghasilkan pemisahan dan kuantifikasi yang memenuhi persyaratan validasi metode [14]. Kinerja pemisahan termasuk selektivitas dan bentuk puncak juga sangat dipengaruhi oleh komposisi fase gerak. Asetonitril berfungsi sebagai pelarut organik dengan kekuatan elusi tinggi. Peningkatan proporsi asetonitril dapat mengurangi interaksi hidrofobik antara analit dan fase diam C18, sehingga distribusi analit ke fase gerak meningkat dan proses elusi berlangsung lebih cepat [15]. Sementara itu, asam asetat digunakan untuk mempertahankan kondisi asam yang mendorong protonasi gugus amina tersier pada siproheptadin. Kondisi ini dapat mengurangi interaksi sekunder antara analit dan gugus silanol residual pada fase diam, sehingga bentuk puncak dan kualitas pemisahan kromatografi menjadi lebih baik [4,10]. Deteksi pada panjang gelombang 285 nm dipilih karena sistem aromatik pada struktur siproheptadin memberikan absorpsi UV yang kuat pada daerah tersebut. Pemilihan panjang gelombang 285–286 nm juga konsisten dengan metode yang telah dilaporkan sebelumnya dan menghasilkan parameter validasi yang memenuhi kriteria analitik [4,14]. Hasil pembacaan larutan standar siproheptadin hidroklorida dapat dilihat pada **Gambar 1**.

Dasar pemilihan kondisi kromatografi tersebut selanjutnya disesuaikan dengan tujuan utama penelitian, yaitu menetapkan kadar siproheptadin hidroklorida sebagai zat aktif tunggal dalam sediaan tablet. Fokus ini berbeda dengan penelitian Tuani dkk., yang mengembangkan metode multikomponen untuk sediaan yang mengandung siproheptadin bersama vitamin B1, B5, dan B6 sehingga diperlukan pemisahan beberapa analit dalam satu kali analisis [4]. Penelitian Abdelrahman dkk. memiliki tujuan yang berbeda

karena berfokus pada pengembangan metode *stability-indicating* untuk memisahkan siproheptadin dari impuritas dan produk degradasinya [5]. Sementara itu, Mendes dkk. mengembangkan metode untuk mengukur siproheptadin pada konsentrasi ng/mL dalam matriks plasma sebagai bagian dari studi farmakokinetik dan bioekivalensi, bukan untuk penetapan kadar dalam sediaan tablet [6]. Karena penelitian ini berfokus pada satu analit dan tidak ditujukan untuk memisahkan siproheptadin dari komponen aktif lain, impuritas, maupun produk degradasi, kondisi kromatografi dapat dioptimalkan secara lebih spesifik. Pendekatan tersebut memungkinkan penggunaan kolom yang lebih pendek, yaitu XBridge C18 berukuran $2,1 \times 50$ mm dengan ukuran partikel $3,5 \mu\text{m}$, serta sistem elusi isokratik. Dengan konfigurasi ini, waktu analisis total dapat dibatasi menjadi 3 menit tanpa mengurangi spesifisitas metode.



Gambar 1. Kromatogram larutan baku siproheptadin hidroklorida

Keunggulan dari sisi efisiensi waktu terlihat lebih jelas ketika metode ini dibandingkan dengan beberapa metode terdahulu. Pada metode Abdelrahman dkk., waktu retensi siproheptadin memang relatif singkat, yaitu 3,05 menit, tetapi waktu analisis total yang dibutuhkan sekitar dua kali lebih lama. Metode tersebut menggunakan kolom C8 dengan fase gerak dapar KH_2PO_4 0,05 M–metanol (35:65) pada laju alir 2 mL/menit dan dirancang tidak hanya untuk mendeteksi siproheptadin, tetapi juga untuk memisahkannya dari impuritas serta produk degradasi [5]. Perbedaan yang lebih besar ditemukan pada metode Tuani dkk. yang menggunakan kolom Eurospher ODS berukuran $150 \times 4,5$ mm dengan fase gerak metanol–larutan *ion-pairing* (70:30) pada laju alir 1 mL/menit. Pada metode tersebut, siproheptadin memiliki waktu retensi 4,961 menit dan waktu analisis total mencapai 8 menit, atau sekitar 2,7 kali lebih lama dibandingkan metode dalam penelitian ini. Perbedaan tersebut terutama dipengaruhi oleh penggunaan kolom yang lebih panjang, yaitu 150 mm dibandingkan 50 mm, serta kebutuhan untuk memisahkan empat komponen dalam satu analisis. Kondisi tersebut mendukung pemisahan multikomponen dengan resolusi yang memadai, tetapi secara bersamaan meningkatkan waktu analisis dan konsumsi fase gerak [4].

Tabel 4. Perbandingan waktu analisis dan kondisi kromatografi penetapan kadar siproheptadin hidroklorida dengan penelitian sebelumnya.

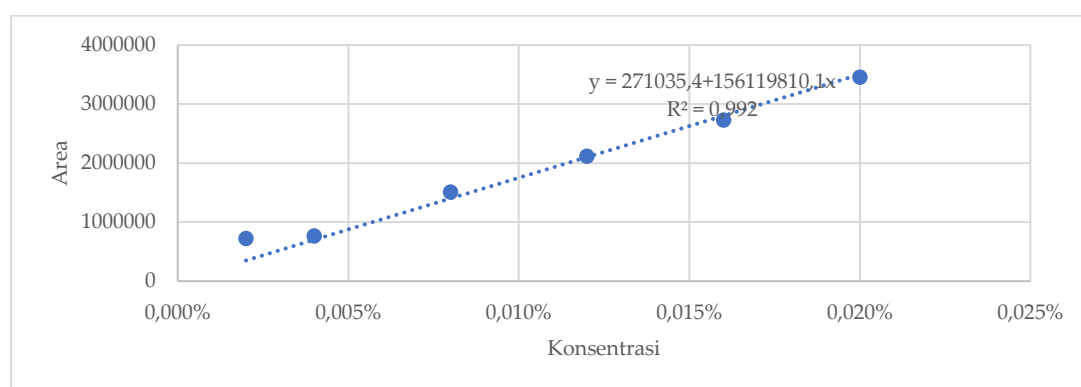
Penelitian (Tahun)	Target analit	Kolom & fase gerak	Waktu analisis	Sumber
Penelitian saat ini (2026)	Siproheptadin hidroklorida dalam tablet	XBridge C18 $2,1 \text{ mm} \times 50 \text{ mm}$, $3,5 \mu\text{m}$; Asetonitril:asam asetat 0,1% (60:40) isokratik	3 menit	-
Abdelrahman dkk. (2021)	Siproheptadin hidroklorida + impuritas + produk degradasi	Eclipse plus C8; dapar KH_2PO_4 0,05 M:metanol (35:65) isokratik	7,54 menit	[5]
Tuani dkk. (2020)	Siproheptadin hidroklorida + Vit. B1, B5, B6 dalam tablet	Eurospher ODS $150 \text{ mm} \times 4,5 \text{ mm}$; Metanol:larutan <i>ion-pairing</i> (70:30) isokratik	8 menit	[4]
Mendes dkk. (2012. LC-MS)	Siproheptadin hidroklorida dalam plasma manusia	Alltech Prevail C18 $150 \text{ mm} \times 4,6 \text{ mm}$, $5 \mu\text{m}$; Diethyl-ether:dichloromethane isokratik	4 menit	[6]

Metode LC-MS/MS yang dikembangkan Mendes dkk. memberikan waktu analisis yang relatif mendekati metode penelitian ini, yaitu sekitar 4 menit, dengan menggunakan kolom Alltech Prevail C18 berukuran $150 \times 4,6$ mm dan ukuran partikel $5 \mu\text{m}$ secara isokratik. Namun, tujuan analisis dan kompleksitas instrumennya berbeda, metode Mendes dkk. menggunakan spektrometri massa tandem untuk mendeteksi

siproheptadin pada konsentrasi ng/mL dalam matriks plasma, sehingga membutuhkan instrumen yang lebih kompleks dengan biaya operasional yang lebih tinggi [6]. Sedangkan pada penelitian ini digunakan metode RP-HPLC-PDA dengan instrumen yang lebih sederhana dan lebih umum tersedia di laboratorium pengawasan mutu. Kombinasi antara waktu analisis yang singkat, sistem kromatografi yang sederhana, dan kebutuhan instrumen yang lebih mudah diakses menjadikan metode ini lebih praktis untuk penetapan kadar rutin, terutama ketika jumlah sampel yang dianalisis relatif besar. Ringkasan perbandingan karakteristik masing-masing metode disajikan pada **Tabel 4**.

Kurva Baku

Kurva kalibrasi dinilai berdasarkan nilai koefisien korelasi (r) dan koefisien determinasi (r^2). Beberapa ahli menyatakan bahwa nilai koefisien korelasi yang mendekati satu menunjukkan bahwa kurva kalibrasi memiliki hubungan linear yang baik [16]. Kurva kalibrasi siproheptadin hidroklorida dibuat menggunakan enam titik konsentrasi dan menghasilkan persamaan regresi linear $y = 156119810,1x + 271035,4$ dengan nilai r sebesar 0,996 dan r^2 sebesar 0,992. Grafik kurva baku hubungan antara area dan konsentrasi dapat dilihat pada **Gambar 2**.



Gambar 2. Grafik kurva baku siproheptadin hidroklorida.

Akurasi

Akurasi merupakan tingkat kedekatan antara nilai hasil pengukuran dengan nilai sebenarnya. Parameter akurasi umumnya dinyatakan sebagai persentase *recovery*, yang dihitung berdasarkan perbandingan antara jumlah analit yang diperoleh dari hasil pengujian dengan jumlah analit sebenarnya yang ditambahkan ke dalam sampel [17]. Kriteria penerimaan akurasi berada pada rentang 98%–102% [3,18]. Pada penelitian ini nilai % *recovery* yang diperoleh sebesar 100,26%, sehingga memenuhi syarat keberterimaan. Hasil pengujian akurasi sampel siproheptadin hidroklorida dapat dilihat pada **Tabel 5**.

Tabel 5. Hasil parameter akurasi siproheptadin hidroklorida.

Kelompok	Kadar (%)	Area	Kadar terukur rata-rata (%)	% Recovery rata-rata	% RSD
Sampel	0,04	1583982 1580373 1588033	0,042	-	0,16
Sampel + penambahan 80%	0,072	2599890 2572492 2587890	0,074	100,35	
Sampel + penambahan 100%	0,080	2819131 2831542 2851232	0,082	100,07	
Sampel + penambahan 120%	0,088	3117192 3087192 3072119	0,090	100,36	

Presisi

Presisi merupakan parameter validasi metode analisis yang menunjukkan tingkat kedekatan antar hasil pengukuran dari serangkaian pengujian berulang terhadap sampel homogen yang sama dalam kondisi

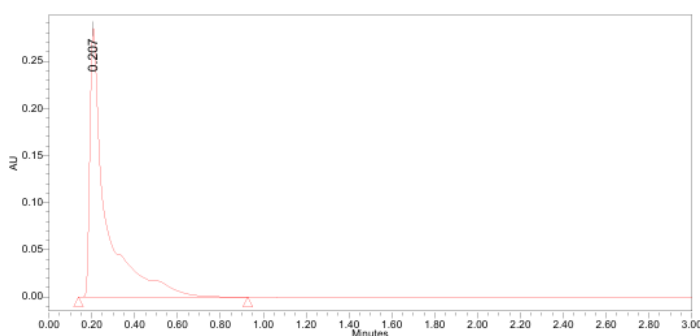
analisis yang telah ditetapkan [19]. Kriteria penerimaan presisi dinyatakan memenuhi persyaratan apabila nilai % RSD $\leq 2\%$ [20]. Pada penelitian ini, hasil pengujian presisi menunjukkan nilai % RSD sebesar 1,42%, yang mana hasil tersebut memenuhi persyaratan yang ada. Data hasil pengujian presisi sampel siproheptadin hidroklorida dapat dilihat pada **Tabel 6**.

Tabel 6. Hasil parameter presisi siproheptadin hidroklorida.

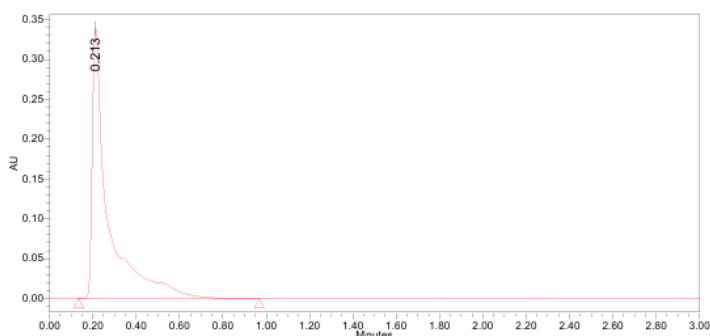
Replikasi ke-	Kadar teoritis (%)	Kadar terhitung (%)	Area	Kadar terhitung (%)
1	0,040	0,040	1550226	0,040
2		0,042	1586414	0,042
3		0,041	1575473	0,041
4		0,041	1558336	0,041
5		0,040	1534688	0,040
6		0,041	1575485	0,041
7		0,041	1578426	0,041
Rata-rata				0,041
SD				0,00059
% RSD				1,42

Spesifisitas

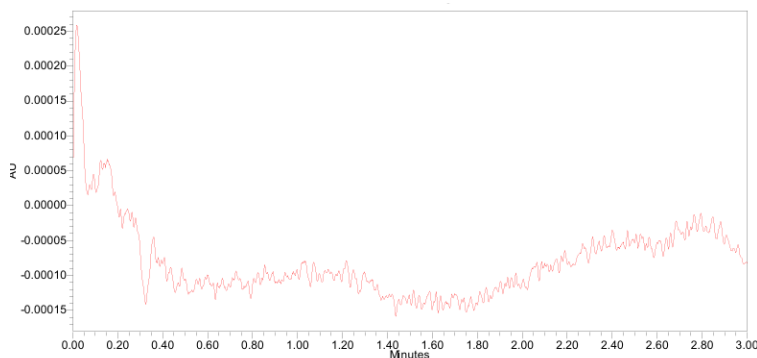
Pengujian spesifisitas dilakukan untuk memastikan bahwa metode analisis mampu mengidentifikasi dan mengukur analit secara selektif tanpa dipengaruhi oleh keberadaan komponen lain yang terdapat dalam matriks sampel [21]. Pada analisis kromatografi, keberadaan lebih dari satu senyawa dalam suatu puncak kromatogram dapat menyebabkan kesulitan dalam memastikan kemurnian puncak analit. Oleh karena itu, evaluasi spesifisitas perlu dilakukan melalui pengamatan terhadap pemisahan puncak analit dengan senyawa pengganggu atau pengotor potensial. Parameter kromatografi seperti komposisi fase gerak, laju alir, jenis kolom, dan mode deteksi perlu dioptimalkan untuk memperoleh resolusi yang memadai antara analit dan komponen lain [22]. Berdasarkan hasil pengujian, larutan baku pada **Gambar 3** dan larutan sampel pada **Gambar 4** menunjukkan puncak kromatogram dengan waktu retensi (rt) yang sama, yaitu 0,2 menit dalam waktu analisis selama 3 menit. Kesamaan waktu retensi tersebut menunjukkan bahwa senyawa yang terdeteksi pada sampel memiliki karakteristik elusi yang sama dengan standar analit. Selain itu, kromatogram fase gerak pada **Gambar 5** tidak menunjukkan adanya puncak tambahan (*interference peak*), sehingga dapat dipastikan bahwa tidak terdapat gangguan dari pelarut maupun komponen lain selama proses analisis.



Gambar 3. Hasil kromatogram parameter spesifisitas larutan standar siproheptadin hidroklorida.



Gambar 4. Hasil kromatogram parameter spesifisitas larutan sampel siproheptadin hidroklorida.

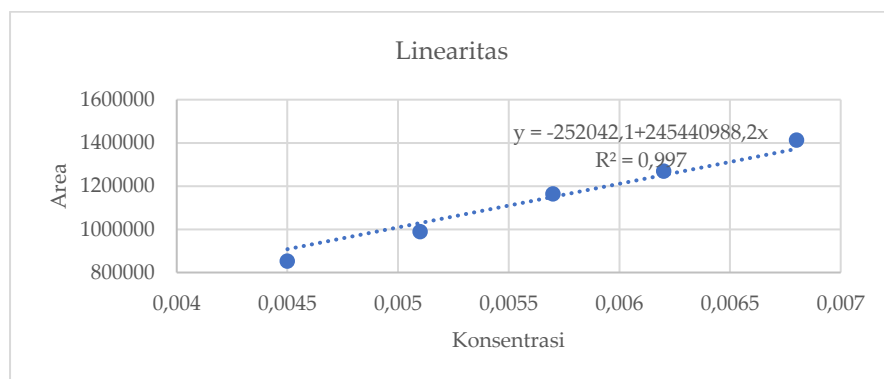


Gambar 5. Hasil kromatogram parameter spesifisitas fase gerak Asetonitril:asam asetat 0,1% (60:40).

Retensi yang singkat pada penelitian ini sesuai dengan prinsip dasar kromatografi cair, di mana kolom dengan diameter internal kecil dan panjang yang pendek memiliki volume kosong yang rendah. Kondisi ini menyebabkan waktu mati kolom (t_0) menjadi lebih singkat sehingga analit yang memiliki interaksi lemah dengan fase diam dapat terelusi lebih cepat. Penggunaan kolom pendek berdiameter kecil juga telah diterapkan dalam pengembangan metode kromatografi cepat untuk mengurangi waktu analisis hingga kurang dari satu menit [23]. Selain itu, penggunaan partikel berefisiensi tinggi dengan tekanan balik yang rendah memungkinkan analisis kemurnian senyawa farmasi dilakukan hanya dalam hitungan detik menggunakan instrumen HPLC konvensional [24].

Linearitas

Pengujian linearitas dilakukan untuk mengevaluasi kemampuan metode analisis dalam menghasilkan respons yang proporsional terhadap peningkatan konsentrasi analit pada rentang tertentu. Linearitas dievaluasi pada rentang konsentrasi 80%–120% dari kadar uji [9]. Metode dinyatakan memenuhi kriteria linearitas apabila menghasilkan nilai koefisien korelasi (r) $\geq 0,995$ [25]. Hasil penelitian menunjukkan nilai koefisien determinasi (R^2) sebesar 0,997, yang menunjukkan hubungan linear yang sangat baik antara konsentrasi analit dan respons analitik. Grafik hubungan antara area dan konsentrasi pengujian linearitas dapat dilihat pada **Gambar 6**.



Gambar 6. Grafik parameter linearitas siproheptadin hidroklorida.

Robustness

Uji *robustness* dilakukan untuk menilai kemampuan metode analisis dalam mempertahankan kinerjanya ketika terdapat perubahan kecil yang sengaja diberikan pada parameter operasional selama proses analisis [9]. Pada penelitian ini, pengujian dilakukan dengan memodifikasi kondisi optimum metode sebesar $\pm 5\%$ pada parameter laju alir (*flow rate*) dan komposisi fase gerak. Pengujian menggunakan larutan standar dengan tiga kali replikasi. Variasi *flow rate* yang digunakan adalah 0,95 dan 1,05 mL/menit, sedangkan komposisi fase gerak asetonitril:asam asetat 0,1% divariasikan menjadi 57:43 dan 63:37.

Hasil pengujian menunjukkan bahwa perubahan kecil pada kedua parameter tidak memberikan pengaruh yang berarti terhadap waktu retensi (*retention time*) dan posisi puncak (*peak shift*) pada kromatogram. Namun, berdasarkan hasil perhitungan, variasi *flow rate* menghasilkan nilai % RSD *retention time* sebesar 2,14% dan area sebesar 1,45%, sebagaimana ditunjukkan pada **Tabel 7**. Nilai *retention time* belum memenuhi kriteria keberterimaan karena terjadi pergeseran waktu retensi yang cukup besar. Sementara itu,

variasi komposisi fase gerak menghasilkan nilai % RSD *retention time* sebesar 1,26% dan area sebesar 1,97% (**Tabel 8**), yang telah memenuhi kriteria keberterimaan, yaitu % RSD <2% [26]. Hasil tersebut menunjukkan bahwa metode memiliki karakteristik kromatografi yang relatif stabil terhadap perubahan komposisi fase gerak, tetapi masih sensitif terhadap perubahan *flow rate*.

Hasil penelitian ini sejalan dengan penelitian César dan Pianetti (2009) yang mengevaluasi *robustness* metode kromatografi menggunakan pendekatan *Youden test*. Penelitian tersebut menunjukkan bahwa perubahan kecil pada beberapa parameter kromatografi, seperti komposisi fase gerak, laju alir, dan kondisi deteksi, tidak memberikan pengaruh signifikan terhadap hasil kuantifikasi analit. Berdasarkan hasil pengujian, metode dalam penelitian ini dapat dinyatakan belum memenuhi kriteria *robustness* secara keseluruhan karena variasi *flow rate* menghasilkan nilai % RSD yang tidak memenuhi persyaratan, meskipun metode tetap menunjukkan karakteristik kromatografi yang stabil pada variasi komposisi fase gerak [27].

Tabel 7. Hasil parameter *robustness* larutan standar siproheptadin hidroklorida variasi *flow rate* $\pm$ 5%.

Variasi	Retention time	Area
Flow 0,95 mL/menit	0,210	1442197
	0,210	1442435
	0,211	1442493
Flow 1,05 mL/menit	0,218	1480656
	0,219	1480711
	0,219	1482090
Rata-rata	0,215	1461763,667
SD	0,0045	21245,6674
% RSD	2,14	1,45

Tabel 8. Hasil parameter *robustness* larutan standar siproheptadin hidroklorida variasi fase gerak $\pm$ 5%.

Variasi	Retention time	Area
Fase gerak asetonitril:asam asetat (57:43)	0,213	1441295
	0,214	1441037
	0,212	1414901
Fase gerak asetonitril:asam asetat (63:37)	0,217	1485839
	0,217	1457677
	0,219	1489271
Rata-rata	0,215	1455003,333
SD	0,0027	28717,36
% RSD	1,26	1,97

LOD dan LOQ

Limit of Detection (LOD) merupakan konsentrasi analit terendah dalam sampel yang masih dapat dideteksi oleh suatu metode analisis, tetapi belum dapat ditentukan kadarnya secara tepat dan akurat [9,13]. Berdasarkan hasil perhitungan, diperoleh nilai LOD sebesar 0,0022%. *Limit of Quantification* (LOQ) merupakan jumlah atau konsentrasi terendah analit dalam sampel yang masih dapat ditentukan secara kuantitatif dengan tingkat akurasi dan presisi yang sesuai. Penentuan nilai LOQ dilakukan untuk mengevaluasi kemampuan sensitivitas metode dalam melakukan pengukuran analit pada konsentrasi rendah [9]. Berdasarkan hasil perhitungan, diperoleh nilai LOQ sebesar 0,0066%.

Tabel 9. Hasil parameter LOD dan LOQ

Parameter	Hasil
LOD	0,0022%
LOQ	0,0066%

Berdasarkan nilai LOD dan LOQ pada **Tabel 9**, nilai LOD lebih rendah daripada LOQ, sehingga sesuai dengan prinsip bahwa konsentrasi analit dapat terdeteksi pada kadar yang lebih rendah daripada kadar yang dapat dikuantifikasi secara andal. Secara numerik, hubungan kedua nilai tersebut mendekati rasio teoritis yang berasal dari faktor perhitungan LOD dan LOQ, yaitu 3,3:10. Perbedaan kecil terhadap rasio teoritis dapat

dipengaruhi oleh pembulatan nilai yang digunakan dalam perhitungan. Pendekatan berbasis parameter regresi ini memungkinkan estimasi LOD dan LOQ menggunakan simpangan baku respons dan kemiringan kurva kalibrasi tanpa menentukan rasio *signal-to-noise* secara langsung [13].

Penetapan Kadar

Penetapan kadar siproheptadin hidroklorida dalam sediaan tablet dengan metode HPLC menghasilkan klaim kadar sebesar 102%, 104%, dan 105% terhadap klaim etiket, dengan rata-rata 103,67%. Meskipun semua hasil berada sedikit di atas kadar nominal, nilai tersebut masih memenuhi spesifikasi Farmakope Indonesia Edisi VI, yaitu 90,0–110,0% $C_{21}H_{21}N \cdot HCl$ dari jumlah yang tertera pada etiket. Persyaratan ini konsisten dengan monografi USP–NF *Cyproheptadine Hydrochloride Tablets*, yang menetapkan rentang kadar 90,0–110,0% dari klaim etiket. Dengan demikian, kadar 102%, 104%, dan 105% menunjukkan bahwa seluruh sampel memenuhi persyaratan kadar siproheptadin hidroklorida yang ditetapkan dalam farmakope [7,8]. Hasil penetapan kadar sampel tablet siproheptadin dapat dilihat pada **Tabel 10**.

Berdasarkan hasil penetapan kadar siproheptadin hidroklorida dalam sediaan tablet, diperoleh nilai % RSD sebesar 1,34% dan 1,47%. Nilai % RSD yang relatif rendah menunjukkan variasi antar hasil pengukuran yang kecil dan mencerminkan presisi metode yang baik [18,28].

Tabel 10. Hasil parameter penetapan kadar tablet siproheptadin hidroklorida.

Replikasi	Penimbangan sampel (mg)	Klaim mg/tablet	Kadar sampel (mg/tablet)	Persentase kadar sampel per klaim (%)
1	129,03	4	4,09	102
2	129,10		4,20	105
3	129,08		4,16	104
	Rata-rata		4,15	103,67
	SD		0,0556	1,52
	% RSD		1,34	1,47

Kesimpulan

Prosedur RP-HPLC isokratik menggunakan kolom pendek yang dikembangkan dalam penelitian ini mampu menetapkan kadar siproheptadin hidroklorida dalam tablet 4 mg dengan waktu analisis total selama 3 menit. Metode memenuhi kriteria keberterimaan ICH Q2(R2), USP Bab Umum <1225>, dan Farmakope Indonesia Edisi VI untuk parameter spesifisitas, linearitas pada rentang 80–120% kadar uji dengan nilai $r^2 = 0,998$, akurasi dengan rata-rata *recovery* sebesar 100,26%, serta keterulangan dengan %RSD sebesar 1,42%. Metode juga menunjukkan *robustness* terhadap perubahan komposisi fase gerak $\pm 5\%$. Rentang kerja metode ditetapkan pada 0,008–0,020% b/v, yang mencakup konsentrasi di atas batas kuantitasi sebesar 0,0066%. Namun, metode belum memenuhi kriteria *robustness* terhadap variasi laju alir $\pm 5\%$, dengan nilai %RSD waktu retensi sebesar 2,14%. Oleh karena itu, laju alir perlu dikendalikan sebagai parameter kritis dan diverifikasi melalui uji kesesuaian sistem pada setiap rangkaian analisis. Dengan mempertimbangkan batasan tersebut, metode dapat digunakan untuk analisis rutin dalam pengawasan mutu tablet siproheptadin hidroklorida, terutama pada laboratorium dengan jumlah sampel yang tinggi. Penelitian selanjutnya dapat difokuskan pada pengurangan proporsi asetonitril untuk memperoleh faktor kapasitas di atas 2, evaluasi presisi antara, verifikasi LOD dan LOQ secara eksperimental, serta pengembangan metode menjadi prosedur *stability-indicating* melalui studi degradasi paksa.

Conflict of Interest

Penulis menyatakan bahwa penelitian ini tidak memiliki konflik kepentingan dalam bentuk finansial maupun nonfinansial yang dapat memengaruhi proses pelaksanaan penelitian, analisis data, maupun penyajian hasil penelitian.

Acknowledgment

Penulis mengucapkan terima kasih kepada seluruh pihak yang telah memberikan kontribusi, baik secara langsung maupun tidak langsung, sehingga penelitian ini dapat diselesaikan dengan baik.

Referensi

- [1] Harrison ME, Norris ML, Robinson A, Spettigue W, Morrissey M, Isserlin L. Use of cyproheptadine to stimulate appetite and body weight gain: A systematic review. *Appetite* 2019;137:62–72. <https://doi.org/10.1016/j.appet.2019.02.012>.
- [2] Josefsson M, Rydberg I. Determination of methylphenidate and ritalinic acid in blood, plasma and oral fluid from adolescents and adults using protein precipitation and liquid chromatography tandem mass spectrometry-A method applied on clinical and forensic investigations. *J Pharm Biomed Anal* 2011;55:1050–9. <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2011.03.009>.
- [3] Ermer J. *Method Validation in Pharmaceutical Analysis* Edited by Related Titles from Wiley-VCH : LC / MS Applications in Drug Development Reference Materials for Chemical Analysis. 2005.
- [4] Tuani Y, Amo-koi S, Pharmacopoeia US, Mingle D, Asor A. Stability-Indicating HPLC Methods for the Quantification of Cyproheptadine Hydrochloride, Vitamins B1, B5 And B6 in Tablets using RP-HPLC with UV Detection. *Chem Mater Res* 2020. <https://doi.org/10.7176/cmr/12-6-06>.
- [5] Abdelrahman MM, Abdelaleem EA, Ali NW, Emam RA. Development and validation of stability indicating high-performance liquid chromatographic method for determination of cyproheptadine hydrochloride, its impurity and degradation product. *J Chromatogr Sci* 2021;59:128–33. <https://doi.org/10.1093/chromsci/bmaa085>.
- [6] Mendes GD, Arruda A, Chen LS, de Almeida Magalhães JC, Alkharfy KM, De Nucci G. Quantification of cyproheptadine in human plasma by high-performance liquid chromatography coupled to electrospray tandem mass spectrometry in a bioequivalence study. *Biomed Chromatogr* 2012;26:129–36. <https://doi.org/10.1002/bmc.1618>.
- [7] United States Pharmacopeia. Cyproheptadine Hydrochloride. USP 47-NF 42 2024;1000:1–2.
- [8] Kementerian Kesehatan Republik Indonesia. *Farmakope Indonesia Edisi VI*. 2020.
- [9] United States Pharmacopeia. *Validation Of Compendial Procedures*. USP 47-NF 42 2024:1–6.
- [10] Wu AB, Huang MC, Ho HO, Yeh GC, Sheu MT. Investigation on liquid chromatographic separation of basic compounds using silica column with aqueous/organic mobile phase containing triethylamine and acetic acid. *Biomed Chromatogr* 2004;18:443–9. <https://doi.org/10.1002/bmc.334>.
- [11] Andi S, Ayusari Ramly E. Validasi Metode Analisis Kapsul Rifampisin Dengan HPLC-PDA. *Farmasains J Ilm Ilmu Kefarmasian* 2021;8:31–6. <https://doi.org/10.22236/farmasains.v8i1.5602>.
- [12] Aryani A. Validation of Analytical Method of Testing Cefotaxime Sodium in Injection Powder Preparation by High-Performance Liquid Chromatography. *Berk Ilm Kim Farm* 2023;10:28–33. <https://doi.org/10.20473/bikfar.v10i2.47179>.
- [13] Sanchez JM. Estimating detection limits in chromatography from calibration data: Ordinary least squares regression vs. weighted least squares. *Separations* 2018;5. <https://doi.org/10.3390/separations5040049>.
- [14] Zhaoxia WH, CHEN. Assay of cyproheptadine hydrochloride and the related substances with HPLC 2017:60–9. <https://doi.org/10.3969/j.issn.1006-0111.2017.01.014>.
- [15] Gritti F. Thermodynamic interpretation of the drift and noise of gradient baselines in reversed-phase liquid chromatography using mobile phase additives. *J Chromatogr A* 2020;1633. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2020.461605>.
- [16] Moosavi SM, Ghassabian S. Linearity of Calibration Curves for Analytical Methods: A Review of Criteria for Assessment of Method Reliability. *Calibration Valid Anal Methods - A Sampl Curr Approaches* 2018. <https://doi.org/10.5772/intechopen.72932>.
- [17] Chowdary GL, Ravisankar P, Akhil Kumar G, Mounika K SBP. Analytical Method Validation Parameters: An Updated Review. *Int J Pharm Sci Rev Res* 2020;61:1–7.
- [18] Elder D. Validation of analytical procedures – ICH Q2(R2). *Eur Pharm Rev* 2024;29:5.
- [19] More SS, Kadam SP, K.Redasani DV. A Review on Analytical Method Development And Validation. *Int J Pharm Res Appl* 2025;10:1177–95. <https://doi.org/10.35629/4494-100111771195>.
- [20] Sridhar S. Analytical Method Development and Validation Strategies for Quantitative Determination of Novel Drugs Using High Performance Liquid Chromatography. *Int J Pharm Sci* 2026;4:2304–10. <https://doi.org/10.5281/zenodo.18640178>.
- [21] Sharma S, Goyal S, Chauhan K. A review on analytical method development and validation. *Int J Appl Pharm* 2021;10:8–15. <https://doi.org/10.22159/ijap.2018v10i6.28279>.
- [22] Kazusaki M, Ueda S, Takeuchi N, Ohgami Y. Validation of analytical procedures by high-performance

- liquid chromatography for pharmaceutical analysis. *Chromatography* 2012;33:65–73. <https://doi.org/10.15583/jpchrom.2012.005>.
- [23] Kocic D, Shalliker RA. Using active flow technology columns for high through-put and efficient analyses: The drive towards ultra-high through-put high-performance liquid chromatography with mass spectral detection. *J Chromatogr A* 2015;1421:60–7. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2015.09.002>.
- [24] Gupta BP, Thakur N, Jain NP, Banweer J, Jain S. Osmotically controlled drug delivery system with associated drugs. *J Pharm Pharm Sci* 2010;13:571–88. <https://doi.org/10.18433/j38w25>.
- [25] Nelson DJ, Marbury GD. A risk-based approach to validation of ion chromatography methods using suppressed conductivity. *AAPS Open* 2021;7. <https://doi.org/10.1186/s41120-021-00044-z>.
- [26] Mishra AS, Vasanthan M. Design and validation of a robust stability-indicating reversed-phase HPLC method for quantification of mesalamine in formulated drug products. *BMC Chem* 2025;19. <https://doi.org/10.1186/s13065-025-01666-0>.
- [27] César IDC, Pianetti GA. Robustness evaluation of the chromatographic method for the quantitation of lumefantrine using Youden's test. *Brazilian J Pharm Sci* 2009;45:235–40. <https://doi.org/10.1590/S1984-82502009000200007>.
- [28] Sharaf El-Din MK, Belal F, Tolba MM, Elmansi H. Stability indicating HPLC Method Coupled with Fluorescence Detection for the Determination of Cyproheptadine Hydro-chloride in Its Tablets. *Studies on Degradation Kinetics. Anal Chem Lett* 2018;8:565–77. <https://doi.org/10.1080/22297928.2018.1451366>.