

تطوير وتحسين طريقة كروماتوغرافيا سائلة عالية الأداء ذات طور عكسي (HPLC–RP) لتحديد تركيز ترافابروست في المواد الخام وفي المستحضرات الصيدلانية

سامر هوشه*

(تاريخ الإيداع ٢٠٢٦ / ١ / ٨ - تاريخ النشر ٢٠٢٦ / ٢ / ١٧)

□ ملخص □

يستخدم ترافابروست بشكل شائع في علاج الزرق (ارتفاع ضغط العين) نظراً لفعاليتيه في خفض ضغط العين. هدفت هذه الدراسة إلى تطوير وتوثيق طريقة بسيطة وحساسة ودقيقة ومحددة للفصل الكروماتوغرافي السائل عالي الأداء ذي الطور العكسي (HPLC–RP) لتحديد كمية ترافابروست في كل من المواد الخام والأشكال الصيدلانية. أُجري الفصل الكروماتوغرافي باستخدام عمود (Hypersil BDS C ١٨ أبعاده ٤.٦×٢٥٠ mm ، ٥ μ m) مع طور متحرك مكون من الماء والميثانول والأسيتونيترييل بنسبة ١٠:١٠:٨٠ (حجم/حجم/حجم) عند pH=2 (تم ضبط درجة الحموضة إلى ٢ باستخدام حمض الفوسفور)، بمعدل تدفق ١ مل/دقيقة. وباستخدام كاشف الأشعة فوق البنفسجية عند طول موجة ٢٣٣ نانومتر، ودرجة حرارة ٤٠ درجة مئوية. أظهر ترافابروست زمن احتباس قدره ٦.٣٠ ± ٠.١ دقيقة. تم التحقق من صحة الطريقة وفقاً لإرشادات ICH. أظهر منحنى المعايرة خطية ضمن مجال تركيز يتراوح من ٢٥% إلى ١٥٠% من تركيز العمل، بمعامل تحديد (R^2) قدره ٠.٩٩٩٣. تم تحديد الحد الأدنى للكشف (LOD) والحد الأدنى للتحديد الكمي (LOQ) عند ٠.٠٠٠٢ ميكروغرام/مل و ٠.٠٠٠٧ ميكروغرام/مل على التوالي. لذلك، فإن طريقة HPLC–RP المعتمدة مناسبة للمراقبة الروتينية لترافابروست في المستحضرات العينية.

الكلمات المفتاحية: HPLC، ترافابروست، التحقق من صلاحية الطريقة، نواتج التخريب.

*دكتوراه، مدرس، قسم الكيمياء الصيدلانية والمراقبة الدوائية، كلية الصيدلة، جامعة الوادي الدولية الخاصة، حمص، سوريا

Development and Optimization of a Stability-Indicating RP-HPLC Method for the Determination of Travoprost in Bulk and Dosage Forms

Samer Housheh*

(Received 8/1/2026. Accepted 17/2/2026)

□ ABSTRACT □

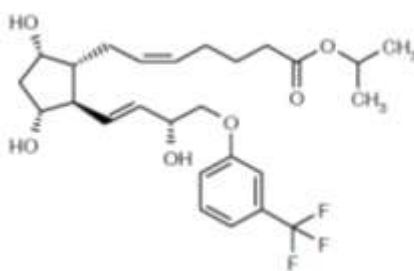
Travoprost is commonly employed in the management of glaucoma due to its efficacy in reducing intraocular pressure. This study aimed to develop and validate a straightforward, sensitive, precise, and specific reverse-phase high-performance liquid chromatography (RP-HPLC) method for the quantification of Travoprost in both raw materials and ophthalmic dosage forms. Chromatographic separation was performed using a Hypersil BDS C18 column (250 × 4.6 mm, 5 μm) with a mobile phase consisting of water (pH=2 adjusted using OPA), methanol and acetonitril in a ratio of 80:10:10 (v/v/v), at a flow rate of 1 mL/min. Detection was carried out using a photodiode array (PDA) detector at 233 nm, and the column temperature was maintained at 40°C. Travoprost exhibited a retention time of 6.30 ± 0.1 minutes. Method validation was conducted in accordance with ICH guidelines. The calibration curve demonstrated linearity across a concentration range of 25% to 150% of the working concentration, with a correlation coefficient (r^2) of 0.9993. The limit of detection (LOD) and limit of quantification (LOQ) were determined to be 0.002 μg/mL and 0.007 μg/mL, respectively. Therefore, the validated RP-HPLC method is suitable for routine quality control analysis of Travoprost in ophthalmic formulations.

KEYWORDS: HPLC; Travoprost; assay validation; degradation; stability indicating.

*Department of Quality Control and Pharmaceutical Chemistry, Al-Wadi International University, Homs, Syria

مقدمة

ترافابروست، وهو كيميائيًا [R١- α l-(β ٢Z, γ ٣E, δ ٤)-[[α ٥, α ٣R*)-٧-٢-Dihydroxy-٣,٥]-٣] - hydroxy-٤-phenoxyl)-١-(trifluoromethyl) cyclopentyl]-٥-butenoic acid-١-methylethyleste كما في الشكل (١) يستخدم في علاج الزرق (ارتفاع ضغط العين). يحتوي المستحضر الصيدلاني على ٠.٠٠٥% (حجم/حجم) من ترافابروست. لا يُعد ترافابروست دواءً مُدرجاً رسمياً في دستور الأدوية الأمريكي (USP United States Pharmacopoeia) [1]، ودستور الأدوية البريطاني (British BP) Pharmacopoeia [2]، ودستور الأدوية الهندي (IP Indian Pharmacopoeia) [٣]، ودستور الأدوية الأوروبي (EP European Pharmacopoeia) [4]. يبلغ الوزن الجزيئي لمركب ترافابروست ٥٠٠.٥٤، وصيغته الجزيئية $C_{21}H_{26}F_3O_3$ [5].



الشكل ١: التركيب الكيميائي لمركب ترافابروست

تشير مراجعة الأدبيات والدراسات إلى وجود طرق تحليلية متنوعة لتحديد كمية ترافابروست في الأشكال الصيدلانية. تشمل هذه الطرق الكروماتوغرافيا السائلة عالية الأداء HPLC المقترنة بمتحري الطيف الكتلي (Mass Spectroscopy MS) لتحديد بيماتوبروست، ولاتانوبروست، وترافابروست في أمصال مستحضرات التجميل [6]، بالإضافة إلى تقنيات HPLC/MS/MS لتحليل ترافابروست وحمضه الحر في بلازما الدم البشري [7]. علاوة على ذلك فقد طور R. V. Valli Kumari et al طريقة كروماتوغرافيا سائلة عالية الأداء مع الطور العكوس (RP-) HPLC Reversed Phase High Pressure Liquid Chromatography) لمعايرة ترافابروست بالمشاركة مع تيمولول ماليات بنفس الوقت باستخدام طور متحرك يتكون من محلول موقوي (بوتاسيوم دي هيدروجين فوسفات مع حمض الفوسفور pH=2). وقد استخدمت العديد من الدراسات الأخرى الكروماتوغرافيا السائلة عالية الأداء HPLC لتحليل ترافابروست إما كمكون صيدلاني فعال لوحده أو بالمشاركة مع مركبات أخرى، سواء بشكله الخام أو في أشكال صيدلانية مُصنعة [8-10].

تهدف هذه الدراسة إلى تطوير طريقة تحليلية فعّالة من حيث الكلفة والكفاءة باستخدام الكروماتوغرافيا السائلة عالية الأداء تُحسن من أداء الفصل. صُممت الطريقة المقترحة لتكون بسيطة ودقيقة، مع التأكد من مدى ثبات المادة الفعّالة (ترافابروست) في المواد الدوائية الخام والمستحضرات العينية.

المواد والطرائق Materials and Methods

الكواشف والمواد الكيميائية

تم توفير العياري لمركب ترافابروست (بنسبة نقاوة ٩٩.٨٥%) من شركة وطنية في سوريا، واستُخدم دون أي تنقية إضافية. كما تم استخدام قطرة العين ترافاماكس (منتج وطني) المتوفرة في الأسواق السورية، بتركيز ٠.٠٠٤%

وزن/حجم، والتي تحتوي على ٤٠ ميكروغرام من ترافابروست. استُخدمت المواد التالية: الميثانول، والأسيتونيتريل (Scharlau, Spain)، وحمض الفوسفور (Surechem, England)، وحمض كلور الماء (Surechem, England)، وهيدروكسيد الصوديوم، والماء الأوكسيجيني (Himedea, India)، وماء عالي النقاوة مناسب للتحليل الكروماتوغرافي السائل عالي الأداء (HPLC)، ومرشحات بمسام ٠.٤٥ ميكرومتر. استخدم جهاز HPLC من نوع Shimadzu مزود بمتحري للأشعة فوق البنفسجية.

تحضير المحلول العياري

تم وزن ٥ ملغ من ترافابروست العياري بدقة، ثم نُقلت إلى بالون معايرة نظيف وجاف سعة ١٠٠ مل. أُضيف حوالي ٧٠ مل من المذيب، وُخضعت للمعالجة بالأمواج فوق الصوتية لإذابتها تمامًا، ثم أُكمل الحجم باستخدام نفس المذيب. تم تمديد المحاليل الناتجة بشكل مناسب للحصول على خمسة تراكيز نهائية تتراوح بين ٢٠ و ٦٠ ميكروغرام/مل، ثم حقنت في جهاز HPLC للحصول على المخططات الكروماتوغرافية. كان المذيب المستخدم هو نفسه المستخدم في الطور المتحرك المُختار.

تحضير العينات والتحليل الكروماتوغرافي

تم أخذ حجم ٥ مل من كل تركيبة (قطرات ترافابروست العينية وقطرات ترافابروست مع تيمولول) بدقة إلى بالون معايرة سعة ٥٠ مل. أُضيف حوالي ٤٠ مل من المذيب (تركيبته موضحة في قسم الطريقة) إلى كل قارورة، وُخضعت المحتويات للمعالجة بالأمواج فوق الصوتية عند الضرورة لضمان الذوبان الكامل. ثم أُكمل الحجم إلى العلامة باستخدام نفس المذيب.

تم إجراء تمديدات متسلسلة لاحقة للحصول على تراكيز نهائية للعمل تتراوح بين ٢٠ و ٦٠ ميكروغرام/مل. رُشحت هذه المحاليل عبر مرشحات غشائية بمسام ٠.٤٥ ميكرومتر قبل الحقن في جهاز HPLC.

تطوير الطريقة وتحديد الشروط الأمثل للتحليل الكروماتوغرافي

اختيار طول الموجة: تم تحضير محلول ترافابروست في المذيب بتركيز ٤٠ ميكروغرام /مل، وتم مسحه ضوئيًا باستخدام جهاز الأشعة فوق البنفسجية فتبين أن طول الموجة الأعظمي هو ٢٣٣ نانومتر. اختيار العمود: كان الهدف من الفصل الكروماتوغرافي هو فصل ترافابروست عن نواتج تحربه. أُجريت التجارب الأولية باستخدام طورين ثابتين مختلفين:

• عمود طور عكسي ١٨C ، ٢٥٠ × ٤.٦ mm ، ٥ μm

• عمود طور عكسي ٨C ، ٢٥٠ × ٤.٦ mm ، ٥ μm

اختيار الطور المتحرك: تم تجربة العديد من الأطوار المتحركة مع كل عمود للحصول على أفضل دقة فصل:

أولاً: مع العمود ١٨C ، ٢٥٠ × ٤.٦ mm ، ٥ μm

• الماء: أسيتونيتريل (٥٠:٥٠) درجة الحموضة = ٣ (تم ضبط درجة الحموضة بحمض الفوسفور) معدل التدفق ١ مل/دقيقة (Isocratic).

• الماء: أسيتونيتريل (٧٥:٢٥) درجة الحموضة = ٢ (تم ضبط درجة الحموضة بحمض الفوسفور) معدل التدفق ١ مل/دقيقة (Isocratic).

• ميثانول: ماء (٨٠:٢٠) درجة الحموضة = ٣ (تم ضبط درجة الحموضة بحمض الفوسفور) معدل التدفق ١ مل/دقيقة (Isocratic).

• الماء: الميثانول: الأسيتونيتريل (٨٠:١٠:١٠) درجة الحموضة = ٢ (تم ضبط درجة الحموضة بحمض الفوسفور) معدل التدفق ١ مل/دقيقة (Isocratic).

ثانياً: مع العمود ٨C ٤.٦×٢٥٠ mm ٥ µm

• ميثانول (١٠٠٪) ٠.١٪ تري إيتانول أمين، معدل التدفق ١ مل/دقيقة (Isocratic).

• الماء: أسيتونيتريل (٥٠:٥٠) درجة الحموضة = ٣ (تم ضبط درجة الحموضة بحمض الفوسفور) معدل التدفق ١ مل/دقيقة (Isocratic).

• الماء: أسيتونيتريل (٥٠:٥٠) درجة الحموضة = ٣ (تم ضبط درجة الحموضة بحمض الفوسفور) معدل التدفق ١.٥ مل/دقيقة (Isocratic).

• الماء: الميثانول: الأسيتونيتريل (٨٠:١٠:١٠) درجة الحموضة = ٢ (تم ضبط درجة الحموضة بحمض الفوسفور) معدل التدفق ١ مل/دقيقة (Isocratic).

تخرب ترافابروست تحت ظروف الإجهاد القسري:

تم استخدام أنواع مختلفة من ظروف الإجهاد على ترافابروست بناءً على الإرشادات المتوفرة من قبل ICH 2A(R1Q) و 2Q(R1). وذلك للتأكد من دقة الطريقة وقوتها. وكانت ظروف الإجهاد القسري المطبقة كما يلي [11, 12]:

التخرب الناتج عن الحموض والأسس: تم أخذ كمية موزونة بدقة (١ ملغ) من ترافابروست ثم حلت في ١٠٠ مل من المذيب المحدد. ولتقييم ثبات الدواء في ظل ظروف الإجهاد، أُجريت دراسات التخرب القسري عن طريق تسخين المحلول مع حمض كلور الماء N١ وهيدروكسيد الصوديوم N١ عند حرارة ٧٠ درجة مئوية لمدة ٣ ساعات للوسط الحمضي وساعة واحدة للوسط القلوي. أُجريت جميع تجارب التخرب في غياب الضوء لاستبعاد أي تأثير ضوئي على ثبات الدواء. بعد ذلك حُففت المحاليل الناتجة بشكل مناسب وخضعت لتحليل كروماتوغرافي لتقييم مدى التخرب والتأكد من فصل نواتج التخرب [11, 12].

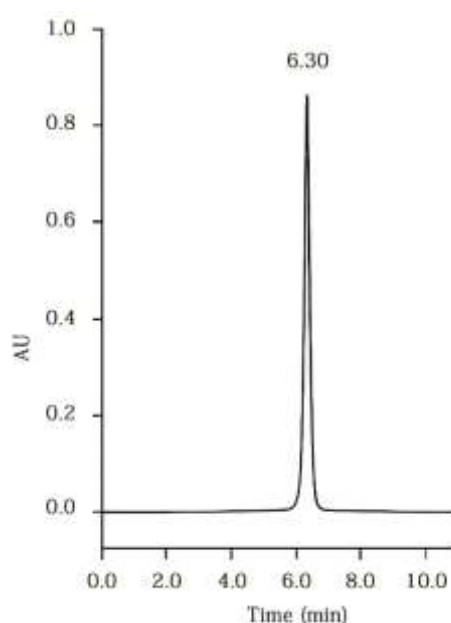
التخرب الناتج عن بيروكسيد الهيدروجين: تم إذابة كمية موزونة بدقة من ترافابروست (١ ملغ) في ١٠٠ مل من المذيب. ولتحفيز التخرب التأكسدي، أُضيف ١٠ مل من الماء الأوكسিজيني (٣٠٪ حجم/حجم) إلى محلول المادة المدروسة، ثم سُخِّن في حمام مائي مغلي لمدة ساعة واحدة لتسريع عملية التحلل وضمان إزالة الماء الأوكسিজيني الزائد. حُففت المحلول الناتج بشكل مناسب وتم إجراء التحليل الكروماتوغرافي لتقييم مدى التخرب والتأكد من فصل نواتج التخرب التأكسدي المحتملة [11, 12].

نواتج التخرب الضوئي: تم إذابة كمية موزونة بدقة من ترافابروست (١ ملغ) في ١٠٠ مل من المذيب. ولتقييم ثباته الضوئي، عُرض المحلول المُحضر لأشعة الشمس المباشرة لمدة ١٢ ساعة. بعد التعريض، تم تخفيف المحلول بشكل مناسب وتحليله باستخدام الكروماتوغرافيا السائلة عالية الأداء (HPLC) للكشف عن أي تخرب ضوئي والتأكد من فصل نواتج التخرب المحتملة [11, 12].

النتائج والمناقشة

تحليل HPLC

تم تطوير شروط الفصل الكروماتوغرافي بهدف تطوير طريقة معتمدة لتحديد تركيز ترافابروست، بالإضافة إلى كون الطريقة التحليلية تدل على ثباته. كما موضح في الشكل ٢، كشفت الدراسات التجريبية أن عمود (RP-18C ١٨٠ × ٢٥٠ × ٤.٦ mm، ٥ μm) هو الأنسب، إذ حقق أفضل أداء كروماتوغرافي وخصائص مقبولة للقمة، بما في ذلك دقة عالية وحساسية ممتازة، دون أي تداخلات أو شوائب أو تذييل في القمة. وتضمنت ظروف الفصل الكروماتوغرافي في النهاية طورًا متحركًا مكونًا من مزيج من الماء والميثانول والأسيتونيترييل (١٠:١٠:٨٠) عند درجة حموضة ٢ (حمض الفوسفوريك)، بمعدل تدفق ١ مل/دقيقة، وطول موجة كشف ٢٣٣ نانومتر.

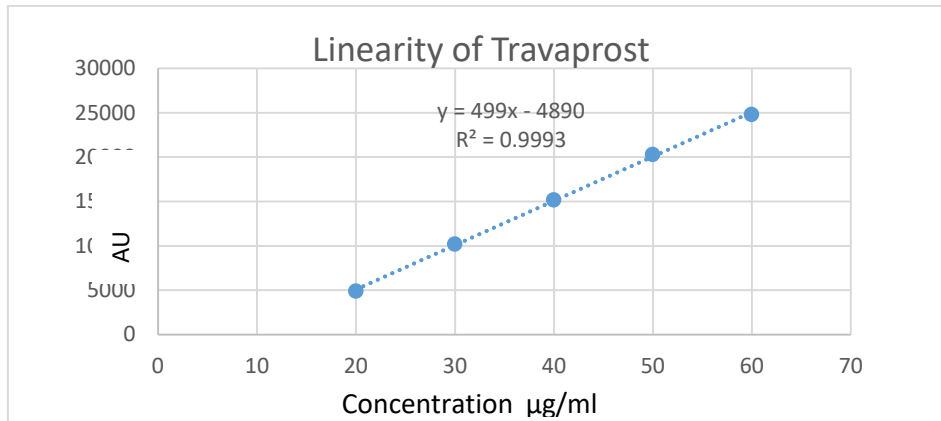


الشكل ٢: المخطط الكروماتوغرافي بواسطة HPLC لمركب ترافابروست

التحقق من صحة الطريقة التحليلية: تم إجراء التحقق من صحة الطريقة وفقًا لمجموعة متنوعة من معايير ICH [11, 12]. وتم تطبيق شروط الاختبار الموصى بها في دستور الأدوية الأمريكي ٤٨ [13].

الخطية Linearity: تم تحضير خمسة محاليل قياسية من ترافابروست بتركيز (٢٠، ٣٠، ٤٠، ٥٠، و ٦٠ ميكروغرام/مل)، وحُقن كل محلول ست مرات في جهاز الكروماتوغرافيا السائلة عالية الأداء (HPLC). يوضح الشكل ٣ خطية ترافابروست بمعامل تحديد قدره ٠.٩٩٩٣.

المدى Range: تم التأكد من الخطية والدقة والصحة في المجال (٢٠، ٣٠، ٤٠، ٥٠، و ٦٠ ميكروغرام/مل) لترافابروست.



الشكل ٣: خطية ترافابروست

الدقة Accuracy: استُخدمت تراكيز تتراوح بين (٢٠، ٣٠، ٤٠، ٥٠، و ٦٠ ميكروغرام /مل) لدراسة دقة ترافابروست كما هو موضح في (الجدول ١). تشير النتائج إلى أن نسبة استرداد ترافابروست تتراوح بين ٩٨.٠٩% و ١٠٠.٩٦%، بمتوسط استرداد ٩٩.٨٨% ونسبة انحراف معياري نسبي ١.١٣%. يُعد استرداد ترافابروست بالطريقة المقترحة مقبولاً، حيث لا تتجاوز نسبة الانحراف المعياري النسبي $\pm 2.0\%$ ، ويتراوح متوسط الاسترداد بين ٩٨.٠% و ١٠٢.٠%.

الجدول ١: نتائج دراسة الدقة

٩٨.٠٩	الحد الأدنى %
١٠٠.٩٦	الحد الأقصى %
٩٩.٨٨	متوسط الدقة
١.١٣٣٧٠٣٤٩٣	نسبة RSD

الدقة Precision:

التكرارية Repeatability: تم حقن المحلول بتركيز ٥٠ ميكروغرام /مل عشر مرات. تم حساب الانحراف المعياري والانحراف المعياري النسبي للقيمة (مساحة القمة). بلغت نسبة الانحراف المعياري النسبي لتكرار تحضير العينة ٠.٨٩%، مما يدل على أن دقة الطريقة مرضية حيث لا تتجاوز نسبة الانحراف المعياري النسبي $\pm 2.0\%$.

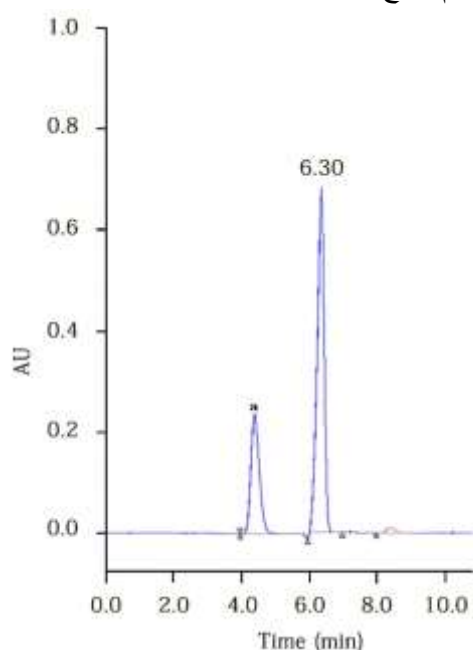
الدقة المتوسطة Intermediate Precision: تبلغ نسبة الانحراف المعياري النسبي (RSD%) للدقة المتوسطة لتحضير العينة ١.٨٠. و قد طبقت من خلال حقن العينات على يومين مختلفين لتحديد مدى تأثير الزمن على النتائج، وهذا يدل على أن الدقة المتوسطة للطريقة مرضية حيث أن نسبة الانحراف المعياري النسبي لا تتجاوز $\pm 2.0\%$.

المتانة Robustness: تم تحديد متانة ودقة الطريقة من خلال تحليل نفس العينة في ظروف التشغيل العادية، وكذلك بتغيير بعض ظروف التشغيل التحليلية مثل معدل التدفق (٠.٨-١.٢ مل/دقيقة) وطول الموجة المستخدمة في الكشف (٢٣١-٢٣٥ نانومتر). لم تؤثر التغييرات الطفيفة في معايير الطريقة على التحليل.

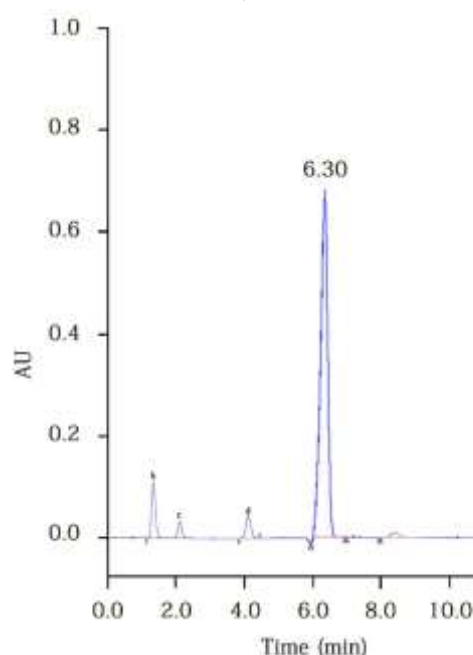
الحد الأدنى للكشف LOD والحد الأدنى للتحديد الكمي LOQ: تم حساب LOD و LOQ على التوالي 0.0002 ميكروغرام / مل و 0.0007 ميكروغرام / مل.

خواص الثبات **yStability indicating propert**

لم يُظهر المخطط الكروماتوغرافي لعينة عياري (غير المعرضة للتخرب القسري) أي قمة إضافية (الشكل ٢). عُرِضَ محلول عياري من ترفابروست لأنواع مختلفة من التخرب القسري (حمض، أساس، أكسدة، ضوء) وُخِّنَ في جهاز الكروماتوغرافيا السائلة عالية الأداء (HPLC). أظهر المخطط الكروماتوغرافي للعينة المتحللة بالحمض/الأساس قمة إضافية واحدة بزمن احتفاظ ٤.٣٥ دقيقة، ولكنها منفصلة تمامًا عن قمة ترفابروست مع وجود فرق ملحوظ في زمن الاحتفاظ بين القمتين (الشكل ٤). كما أوضح المخطط الكروماتوغرافي للعينة المتحللة بالماء الأوكسيجيني (O_2H_2) العديد من القمم عند أزمنة احتفاظ تتراوح بين ١.٤٦ و ٤.١٥ دقيقة، وهي منفصلة تمامًا عن قمة ترفابروست (الشكل ٥). أما بالنسبة لعينة ترفابروست المتحللة ضوئيًا تبين بأنه لا توجد قمم إضافية في المخطط الكروماتوغرافي. وكما هو موضح في جميع المخططات الكروماتوغرافية، فإن قمة ترفابروست منفصلة تمامًا عن قمم نواتج التخرب.



الشكل ٤: المخطط الكروماتوغرافي للتخرب ترفابروست بواسطة الحمض/الأساس



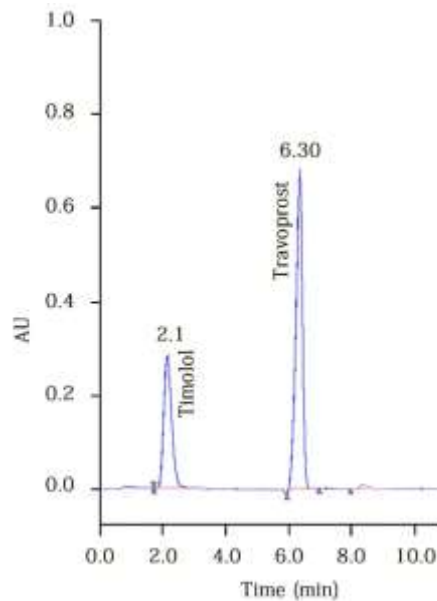
الشكل ٥: المخطط الكروماتوغرافي للتخرب التأكسدي لمادة ترفابروست

التطبيقات

تم تحديد تراكيز ترفابروست سواءً كان موجودًا كمكون فعال منفرد أو بالاشتراك مع تيمولول في المستحضرات الدوائية، كما هو موضح في (الجدول ٢) و(الشكل ٦). وأظهرت النتائج التحليلية قيم استرداد ومعايرة عبر المجال المختبر، مما يؤكد صلاحية الطريقة لكلا التركيبين. والأهم من ذلك، أن التراكيز المقاسة كانت متوافقة مع المواصفات المرجعية للمستحضرات العينية، مما يؤكد ملاءمة الطريقة لإجراءات المراقبة الروتينية في المعامل الدوائية.

الجدول ٢: نتائج تحليل القطرات العينية المتوفرة في السوق السورية

المادة	التركيز المعنون ميكروغرام/مل	الكمية الموجودة ميكروغرام/مل	النسبة المئوية	%RSD
ترفابروست	٤٠	٣٩.٨٧	٩٩.٦٧٥	٠.٢٣٠
ترفابروست مع تيمولول	٤٠	٣٩.٩٥	٩٩.٨٧٥	٠.٠٨٨



الشكل ٦: المخطط الكروماتوغرافي بواسطة HPLC لمركب ترافابروست و تيمولول

الخلاصة:

تتميز طريقة الكروماتوغرافيا السائلة عالية الأداء (HPLC) المقترحة في هذا البحث بأنها سريعة ودقيقة وموثوقة كإجراء تحليلي لتحديد ثبات مادة ترافابروست في كل من المواد الخام والأشكال الصيدلانية. تتميز هذه الطريقة بقدرتها على فصل المادة الفعالة عن نواتج تخریبها تحت ظروف إجهاد مختلفة، بما في ذلك الأوساط الحمضية (حمض كلو الماء)، والقلوية (هيدروكسيد الصوديوم)، والمؤكسدة (الماء الأوكسجينيني)، والضوئية (ضوء الشمس)، مما يؤكد ملاءمتها للاستخدام في دراسات الثبات والتحليل في مراقبة الجودة الروتينية في المعامل الدوائية.

References

1. United States Pharmacopoeia. *US Pharmaceutical Convention Inc.* Rockville: Vol I–III; 2010.
2. British Pharmacopoeia. *Her Majesty's Stationary Office.* London: Vol I–III; 2010.
3. Indian Pharmacopoeia. *Controller of Publication.* Delhi: Vol I–III.
4. European Pharmacopoeia. *Council of Europe.* Strasbourg Cedex, France: Vol I–III; 2014.
5. Sorbera LA, Castaner J. Travoprost. *Drugs Future.* 2000;25(1).
6. Marchei E, De Orsi D, Guarino C, Rotolo MC, Graziano S, Pichini S. *Cosmetics.* 2016;3(1):4. doi:10.3390/cosmetics3010004.
7. McCue BA, Cason MM, Curtis MA, Faulkner RD, Dahlin DC. *J Pharm Biomed Anal.* 2002;28(2):199-208.
8. Valli Kumari RV, Venkateswarrao P, Sunitha A, Keerthy K. *Stability indicating RP-HPLC method for simultaneous estimation of Travoprost and Timolol in bulk and pharmaceutical dosage forms.* *Int J Pharm Rev Res.* 2015;5(3):176-82.
9. Hanai TT. *HPLC: a practical guide.* Cambridge: Royal Society of Chemistry; 2007.

10. Moldoveanu SC, David V. *Selection of the HPLC method in chemical analysis*. Amsterdam: Elsevier; 2016.
11. International Conference on Harmonization (ICH). *Note for guidance on stability testing: stability testing of new drug substances and products*. ICH Topic Q1A (R2). CPMP/ICH/2736/99.
12. International Conference on Harmonization (ICH). *Validation of analytical procedures: methodology*. ICH-Q2B. CPMP/ICH/281/95. Geneva; 1996.
13. United States Pharmacopeial Convention. *United States Pharmacopeia 48 – National Formulary 43 (USP 48–NF 43)*. Rockville, MD: United States Pharmacopeial Convention; 2025.