Medical Science Journal of Islamic Azad University Vol. 36, No. 3, Autumn 2026 ORIGINAL ARTICLE

Development and validation of a high performance liquid chromatographic (HPLC) method for simultaneous determination of Linagliptin and Metformin in tablet

***Melika Bagheri*[1], *Ensieh Ghasemi*[2]**
[1] *Department of Pharmaceutical Chemistry, TeMS.C., Islamic Azad Univeresity, Tehran, Iran*
[2] *Associate Professor, Department of Pharmaceutical Chemistry, TeMS.C., Islamic Azad Univeresity, Tehran, Iran*

[Downloaded from tmuj.iautmu.ac.ir on 2026-10-11]

[DOR: 20.1001.1.10235922.1405.36.3.5.2]
[DOI: 10.66224/iau.36.3.302]

Abstract

Background: The combination of metformin, a first-line biguanide, and linagliptin, a DPP-4 inhibitor that reduces GLP and GIP degradation, improves insulin secretion, decreases glucagon production, and effectively controls blood glucose and HbA1c levels in patients with type diabetes. This study aimed to develop and validate a simple, rapid, accurate, and sensitive method for the simultaneous determination of metformin and linagliptin in tablet dosage forms.

Materials and methods: Simultaneous analysis was performed using ion chromatography with sodium lauryl sulfate as an ionic reagent. Chromatographic conditions were optimized. Peak separation and symmetry were evaluated using resolution and tailing factors. The method was validated for specificity, linearity, accuracy, precision, repeatability, detection limit, quantification limit, and robustness.

Results: Optimal separation was achieved using a C18 column (4.6 × 150 mm, 5 µm) with a mobile phase of methanol: acetonitrile: 0/02 M potassium hydrogen phosphate (10:35:55, pH 4.6), at 218 nm and a flow rate of 1 mL/min. Linearity was observed for metformin (0.11–0.66 µg/mL) and linagliptin (0.00054–0.00324 µg/mL). Retention times were 3.7 and 2.2 minutes, respectively.

Conclusion: The validated method demonstrated satisfactory accuracy, precision, and robustness and is suitable for routine quality control analysis of metformin and linagliptin tablets. Overall, this method offers a reliable and efficient analytical approach for the simultaneous determination of both drugs in combined pharmaceutical formulations.

Keywords: *Metformin, Linagliptin, Liquid chromatography, Ionic reagent, Development and validation method.*

Cited as: Bagheri.M, Ghasemi E. Development and validation of a high performance liquid chromatographic (HPLC) method for simultaneous determination of Linagliptin and Metformin in tablet. Medical Science Journal of Islamic Azad University, Tehran Medical Branch 2026; 36(3): **302-3011.**

Correspondence to: Ensieh Ghasemi
Tel: *+98 9122821034*
E-mail: ghasemi.e@iaups.ac.ir
ORCID ID: 0000-0003-3418-2773
Received: 15 Nov 2025; **Accepted:** 11 Jan 2026

مجله علوم پزشکی دانشگاه آزاد اسلامی
دوره ۳۶، شماره ۳، پاییز ۱۴۰۵، صفحات ۳۰۲ تا ۳۱۱

Original Article

توسعه و معتبرسازی روش کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا (HPLC) به منظور اندازه گیری همزمان لیناگلیپتین و متفورمین در قرص

ملیکا باقری[۱]، انسیه قاسمی[۲]

[۱] گروه شیمی دارویی، دانشکده شیمی دارویی، واحد علوم پزشکی تهران، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران
[۲] دانشیار گروه شیمی دارویی، دانشکده شیمی دارویی، واحد علوم پزشکی تهران، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران

چکیده

سابقه و هدف: *ترکیب متفورمین از دسته بیگوانیدها و لیناگلیپتین از دسته مهارکننده‌های DPP-4 که با کاهش تجزیه GLP و GIP منجر به کاهش تولید گلوکاگون و افزایش تولید انسولین می‌شود، در کنترل قند خون و کاهش HbA1c در بیماران مبتلا به دیابت نوع ۲ مؤثر است. بنابراین توسعه و معتبرسازی روش‌های اندازه‌گیری همزمان این مواد در قرص‌ها اهمیت دارد. هدف مطالعه، توسعه و اعتبارسنجی روشی ساده، سریع، دقیق، حساس و کارآمد برای تعیین همزمان متفورمین و لیناگلیپتین در قرص‌های دارویی بود.*

روش بررسی: *اندازه‌گیری همزمان با استفاده از کروماتوگرافی یونی معکوس (IC) و معرف یونی SLS انجام شد. شرایط کروماتوگرافی شامل ترکیب فاز متحرک، سرعت جریان و طول موج بهینه شد. جداسازی پیک‌ها با عامل قدرت جداسازی و شکل پیک‌ها با Tailing factor ارزیابی گردید. روش طراحی‌شده از نظر اختصاصی بودن، خطی بودن، دقت، صحت، تکرارپذیری، حد تشخیص، حد تعیین و استحکام اعتبارسنجی شد.*

یافته‌ها: *بهترین جداسازی با ستون C18 (۴/۶ × ۱۵۰ mm/5µ)، فاز متحرک متانول: استونیتریل: پتاسیم در هیدروژن فسفات ۰/۰۲ مولار به نسبت ۵۵:۳۵:۱۰، pH ۴/۶ طول موج ۲۱۸ نانومتر و سرعت ۱ میلی‌لیتر/دقیقه حاصل شد. نمودار متفورمین در بازه ۰/۶۶-۰/۱۱ µg/ml و لیناگلیپتین در بازه ۰/۰۰۰۳۲۴-۰/۰۰۰۵۴ µg/ml خطی بود. زمان بازداری متفورمین ۳/۷ دقیقه و لیناگلیپتین ۲/۲ دقیقه بود.*

نتیجه‌گیری: *روش اعتبارسنجی‌شده دقت، صحت و استحکام قابل قبولی را نشان داد و برای آنالیز کنترل کیفی روتین قرص‌های متفورمین و لیناگلیپتین مناسب است. در مجموع، این روش یک رویکرد تحلیلی قابل اعتماد و کارآمد برای تعیین همزمان هر دو دارو در فرمولاسیون‌های دارویی ترکیبی فراهم می‌کند.*

واژگان کلیدی: *متفورمین، لیناگلیپتین، کروماتوگرافی مایع، معرف یونی، توسعه و معتبرسازی روش.*

مقدمه

لیناگلپتین و متفورمین دو داروی ضد دیابت هستند که اغلب به صورت ترکیبی برای درمان دیابت نوع ۲ استفاده می‌شوند(۱). لیناگلپتین، مهارکننده دی‌پپتیدیل پپتیداز-۴ (DPP-4) است که سطح هورمون‌های اینکرتین را افزایش می‌دهد و ترشح انسولین را تحریک می‌کند (۲). متفورمین نوعی بیگوآنید است که تولید گلوکز در کبد را کاهش می‌دهد و حساسیت به انسولین را بهبود می‌بخشد (۳). آزمایش‌های بالینی برای ارزیابی ایمنی و اثربخشی درمان ترکیبی لیناگلیپتین و متفورمین در بیماران مبتلا به دیابت نوع ۲ انجام شده است (۴). در یک مطالعه فاز ۲، مشخص شد که درمان ترکیبی به طور قابل توجهی کنترل قند خون را در مقایسه با هر یک از داروها به تنهایی بهبود بخشیده است و هیچ رویداد نامطلوب قابل توجهی گزارش نشد (۵). چندین کارآزمایی بالینی فاز ۳ اثر بخشی و ایمنی درمان ترکیبی لیناگلیپتین و متفورمین را در بیماران مبتلا به دیابت نوع ۲ ارزیابی کرده‌اند (۶). در یک مطالعه تصادفی، دو سوکور و کنترل شده با دارونما، ترکیب

آدرس نویسنده مسئول: تهران، دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم پزشکی تهران، دانشکده شیمی دارویی، انسیه قاسمی (email: ghasemi.e@iaups.ac.ir)
ORCID ID: 0000-0003-3418-2773
تاریخ دریافت مقاله: ۱۴۰۴/۸/۲۴
تاریخ پذیرش مقاله: ۱۴۰۴/۱۰/۲۱

[Downloaded from tmuj.iautmu.ac.ir on 2026-10-11]
[DOR: 20.1001.1.10235922.1405.36.3.5.2]
[DOI: 10.66224/iau.36.3.302]

لیناگلیپتین و متفورمین نشان داد که در کاهش سطح HbA1C و بهبود کنترل قند خون در طول ۲۴ هفته درمان، از هر یک از داروها به تنهایی برتر است (۷).

با این حال، مانند هر دارویی، عوارض جانبی احتمالی مرتبط با لیناگلیپتین و متفورمین وجود دارد (۸). برخی از عوارض جانبی شایع لیناگلپتین شامل عفونت‌های دستگاه تنفسی فوقانی، سردرد و هیپوگلیسمی است (۹). عوارض جانبی شایع متفورمین شامل علائم گوارشی مانند تهوع، استفراغ و اسهال است (۱۰). عوارض جانبی نادر اما جدی متفورمین شامل اسیدوز لاکتیک است که می‌تواند تهدیدکننده زندگی باشد (۱۱). روش‌های کروماتوگرافی کاربردهای گسترده‌ای در فرآیندهای تحلیلی و تصفیه دارند (۱۲). تعیین دارو و محصولات جانبی یا ناخالصی‌های آن بسیار مهم است، زیرا این اطلاعات از نظر داروشناسی و سم‌شناسی به‌ویژه برای صنعت داروسازی و دانشمندان اهمیت زیادی دارد (۱۳). برای اطمینان از ایمنی در طول توسعه دارویی، لازم است به دلیل پتانسیل آن‌ها برای سمی بودن، تکنیک‌های نظارتی برای آزمایش‌های پایداری بر روی مواد اولیه، ناخالصی‌ها و محصولات تجزیه ایجاد شود (۱۴). زمانی که روشی ساده و به راحتی قابل اجرا باشد، تعیین‌های هم‌زمان یا مستقیم ترجیح داده می‌شوند (۱۴، ۱۵). یک ترکیب شیمیایی که از ماده دارویی منشا می‌گیرد یا در طول فرآیند سنتز می‌شود، به عنوان ناخالصی در جرم دارو در نظر گرفته می‌شود (۱۵). ایمنی دارو نه تنها به سمیت ماده فعال بستگی دارد، بلکه به ناخالصی‌های دارویی آن نیز وابسته است (۱۶). تشخیص و اندازه‌گیری ناخالصی‌ها در مواد اولیه دارویی و محصولات تجزیه‌ای که ممکن است در طول فرمولاسیون، تولید یا ذخیره‌سازی ایجاد شوند، بسیار حائز اهمیت است. این ناخالصی‌ها که به عنوان "مواد مرتبط" نیز شناخته می‌شوند، ممکن است از نظر داروشناسی یا سم‌شناسی اهمیت داشته باشند. به همین دلیل، وجود و سطح آن‌ها در محصولات نشان‌دهنده کیفیت محصول است و می‌تواند خطراتی برای ایمنی بیمار ایجاد کند (۱۹-۱۷).

کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا (HPLC)، نوعی روش تحلیلی بسیار مؤثر است که برای جداسازی، شناسایی و اندازه‌گیری ترکیبات شیمیایی در انواع مختلف نمونه‌ها استفاده می‌شود (۱۳). در تحلیل دارویی، HPLC به طور گسترده‌ای برای تعیین داروها و متابولیت‌های آن‌ها در مایعات بیولوژیکی، از جمله خون، ادرار و پلاسما، و همچنین در فرمولاسیون‌های دارویی استفاده می‌شود (۲۰). تأیید گسترده یک روش HPLC ضروری است، زیرا معمولاً برای تجزیه و تحلیل منظم مواد اولیه یا داروها در مراحل مختلف، از جمله پذیرش مواد، پیش‌فرمولاسیون، کنترل کیفیت و ذخیره‌سازی استفاده می‌شود (۲۳-۲۱). ما یک تکنیک تحلیلی HPLC سریع و مقرون به صرفه را برای اندازه‌گیری مقادیر لیناگلیپتین و متفورمین در اشکال دارویی یا مواد اولیه ارائه می‌دهیم. این روش با راهنماهای ICH در مورد "اعتبارسنجی روش‌های تحلیلی: متن و روش‌شناسی" اعتبارسنجی شده است (۲۴). ما پارامترهای مختلفی از جمله خاصیت، خطی بودن، بازیابی، دقت، استحکام، پایداری محلول و مناسب بودن سیستم را ارزیابی کردیم و متوجه شدیم که تمام نتایج در محدوده‌های قابل قبول قرار دارند. بنابراین، این روش می‌تواند برای مقاصد دیگر به کار گرفته شود یا مورد استفاده قرار گیرد.

مواد و روشها

مواد شیمیایی

در این مطالعه فاز متحرک از ۱۰٪ متانول از برند کارلو و ۳۵٪ استونیتریل از برند دایجونگ و ۵۵٪ مابقی شامل بافر ۰/۰۲ مولار پتاسیم دی هیدروژن فسفات از برند دکتر مجللی که با (۳۷٪) HCl ۰/۱ نرمال از برند مرک به حجم رسانده‌ایم را با ۰/۰۰۰۵ مولار سدیم لوریل سولفات با برند مرک ترکیب کردیم. همچنین در این مطالعه از ورکینگ استاندارد متفورمین تولید شرکت مهبان شیمی و ورکینگ استاندارد لیناگلیپتین تولید شرکت فاران شیمی نیز استفاده شد که مواد اولیه بالک نیز از این دو شرکت تامین شده بود.

شرایط ابزارآلات و کروماتوگرافی

علاوه بر ابزار معمول آزمایشگاه مثل بشر، بالن حجمی، پیپت پاستور، سرنگ، ارلن مایر، فیلتر سرنگی ۰/۴۵µm، سرسمپلر و... ، این تحقیق به روش کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا (HPLC) با استفاده از دستگاه Waters مدل ۲۶۹۴ ساخت کشور آمریکا با یک سیستم کواترنری، تزریق آن توسط اتوسمپلر و پمپ اختلاط فشار پایین و گاززدایی خلاء Inline و دتکتور PDA مدل ۹۹۶ که آشکارسازی با حد تشخیص gµ و مطابق با شویش ایزوکراتیک بود، انجام شد. این جداسازی با استفاده از ستون C18 به قطر ۴/۶ و طول ۱۵۰ میلی‌متر متشکل از فاز ساکنی با ذراتی به قطر ۵ میکرون و منافذی به ابعاد ۱۲۰ آنگستروم از برند واترز (ساخت کشور آمریکا) پیش رفت. آب نیز با استفاده از دستگاه Pure lab ultra 370 ساخت شرکت الگا لب محصول UK خالص‌سازی شد. PHمتر مورد استفاده در این تحقیق Inolab ۷۳۱۰ تولید شرکت دبلیوتی‌دبلیو آلمان بود و همچنین توزین مواد با استفاده از ترازوی (۵ صفر) رادوگ لهستان انجام شد. جهت هم زدن و حرارت دادن همزمان محلول‌ها نیز از دستگاه هیتر استیرر برند دراگون ساخت کشور چین استفاده شد. جهت برداشت و انتقال

[Downloaded from tmuj.iautmu.ac.ir on 2026-10-11]
[DOR: 20.1001.1.10235922.1405.36.3.5.2]
[DOI: 10.66224/iau.36.3.302]

حجم معینی از مایعات و محلول‌های مورد نظر نیز از سمپلر متغیر ۱۰-۱۰۰ میکرولیتر از برند دراگون استفاده شد. همچنین برای جداسازی و تنظیم غلظت اجزا مختلف از سانتریفیوژ دور بالا (۱۰۰۰۰ RPM) ساخت شرکت ایرانی ارمغان طب ایرانیان بهره گرفتیم. تحقیق در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد با سرعت جریان ml/min ۱ و طول موج ۲۱۸ نانومتر جهت دستیابی به حالت اپتیمم و رویت پیک‌هایی با رزولوشن بالا انجام شد.

تهیه محلول استوک استاندارد متفورمین

۱۱ میلی‌گرم از استاندارد متفورمین توزین شد و به یک بالن ۱۰ میلی‌لیتری منتقل شد و با متانول به حجم رساندیم. حال محلول‌های استاندارد با غلظت‌های موردنظر از محلول استوک ساخته شد.

تهیه محلول استاندارد متفورمین

متفورمین: جهت تهیه محلول استاندارد متفورمین به ترتیب ۱، ۲/۵، ۴و ۵/۹ میلی لیتر ازمحلول استوک برداشته و در بالن ۱۰ توسط HCl .0/01 N به حجم رسانده تا غلظت‌های ۰/۱۱، ۰/۲۷۵، ۰/۴۴، ۰/۵۵ و ۰/۶۶µg/ml ساخته شود.

تهیه محلول استوک استاندارد لیناگلیپتین: ۰/۰۰۵۴ میلی‌گرم از استاندارد لیناگلیپتین توزین شد و به یک بالن ۱۰ میلی‌لیتری منتقل گردید و با متانول به حجم رساندیم. حال محلول‌های استاندارد با غلظت‌های موردنظر از محلول استوک ساخته شد.

تهیه محلول استاندارد لیناگلیپتین: جهت تهیه محلول استاندارد لیناگلیپتین به ترتیب ۱، ۲/۵، ۴و ۵/۹ میلی لیتر ازمحلول استوک برداشته و در بالن ۱۰ توسط HCl .0/01 Nبه حجم رسانده تا غلظت‌های ۰/۰۰۰۵۴، ۰/۰۰۱۳۵، ۰/۰۰۲۱۶، ۰/۰۰۲۷، ۰/۰۰۳۲۴ساخته شود.

تهیه محلول نمونه

۲۰ عدد قرص حاوی ۵۰۰ میلی‌گرم متفورمین و ۲/۵ میلی‌گرم لیناگلپتین جداگانه وزن گردید. قرص‌ها را پودر کرده و از پودر یکنواخت‌شده حاصل، معادل وزن یک قرص برداشته و سپس در بالن ۱۰ میلی‌لیتری با حلال‌های فاز متحرک به حجم رسانده و به کمک سونیکتتور کاملاً حل شده و با استفاده از فیلتر خلا به محلولی شفاف تبدیل شد.

معتبرسازی روش آنالیز

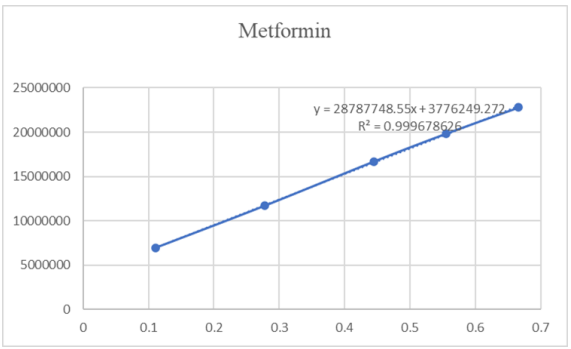
خطی بودن و گستره

خطی بودن توانایی پروسه آنالیتیکال در به‌دست آوردن نتایجی است که به‌طور مستقیم با غلظت آنالیت در نمونه در محدوده معین متناسب است. خطی بودن ممکن است از طریق یک منحنی کالیبراسیون با ۵ نقطه در سه تکرار در محدوده غلظت ۰/۰-۶۶/۱۱ میکروگرم بر میلی‌لیتر برای متفورمین ۰/۰۰۲۱۶-۰/۰۰۳۲۴ میکروگرم بر میلی‌لیتر آزمایش ارزیابی شود. جهت اثبات خطی بودن، ضریب همبستگی منحنی خطی بودن، عرض از مبدا، شیب خط رگرسیون و مجموع مربعات انحرافات تخمین و گزارش می‌شود. نتایج حاصل از تزریق غلظت‌های تعیین شده متفورمین در جدول ۱ ارائه شده است.

جدول ۱. نتایج حاصل از تزریق غلظت‌های تعیین‌شده متفورمین

Area	Con.
۶۹۴۵۹۱۰	µg/ml ۰/۱۱
۱۱۶۹۸۳۳۸	µg/ml ۰/۲۷۵
۱۶۶۸۷۷۶۵	µg/ml ۰/۴۴
۱۹۸۵۵۶۲۶	µg/ml ۰/۵۵
۲۲۸۰۹۲۴۹	µg/ml ۰/۶۶

منحنی کالیبراسیون متفورمین بر اساس غلظت‌های تعیین شده در نمودار ۱ نشان داده شده است.



نمودار ۱. نمودار منحنی کالیبراسیون متفورمین

نتایج حاصل از تزریق غلظت‌های تعیین شده لیناگلیپتین در جدول ۲ ارائه شده است.

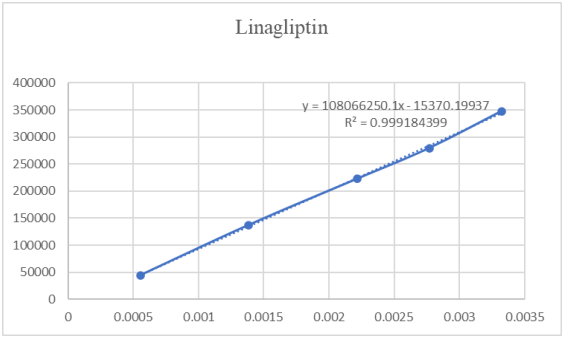
جدول ۲. نتایج حاصل از تزریق غلظت‌های تعیین‌شده لیناگلیپتین

Area	Con.
۴۴۱۰۶	µg/ml ۰/۰۰۰۵۴
۱۳۷۰۹۷	µg/ml ۰/۰۰۱۳۵
۲۲۲۴۹۴	µg/ml ۰/۰۰۲۱۶
۲۷۹۳۷۳	µg/ml ۰/۰۰۲۷
۳۴۷۶۵۰	µg/ml ۰/۰۰۳۲۴

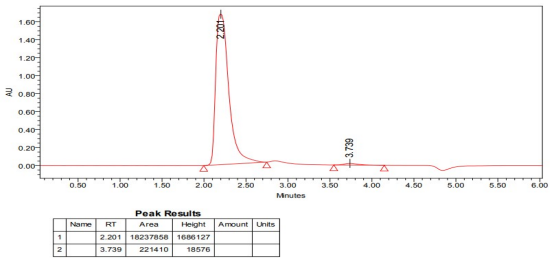
منحنی کالیبراسیون لیناگلپتین براساس غلظت‌های تعیین شده در نمودار ۲ نشان داده شده است.

کروماتوگرام های حاصل از تزریق متفورمین و لیناگلپتین در غلظت های مختلف در شکل‌های ۱ تا ۳ نشان داده شده‌اند.

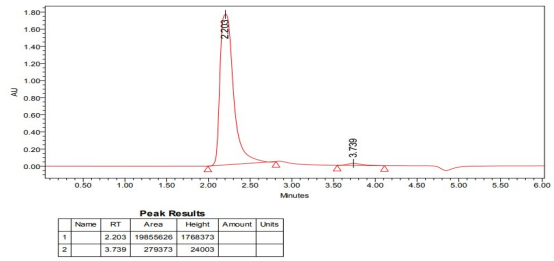
[Downloaded from tmuj.iautmu.ac.ir on 2026-10-11]
[DOR: 20.1001.1.10235922.1405.36.3.5.2]
[DOI: 10.66224/iau.36.3.302]



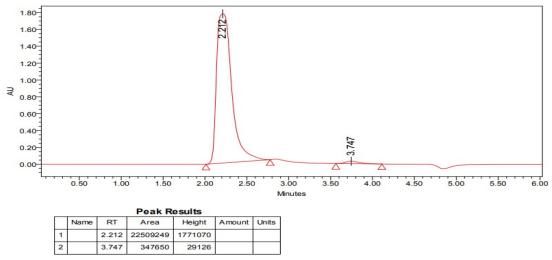
نمودار ۲. نمودار منحنی کالیبراسیون لیناگلیپتین



شکل ۱. کروماتوگرام حاصل از تزریق متفورمین لیناگلیپتین به ترتیب با غلظت ۰/۰۰۲۱۶ µg/ml و ۰/۴۴



شکل ۲. کروماتوگرام حاصل از تزریق متفورمین لیناگلیپتین به ترتیب با غلظت ۰/۰۰۲۷ µg/ml و ۰/۵۵



شکل ۳. کروماتوگرام حاصل از تزریق متفورمین لیناگلیپتین به ترتیب با غلظت ۰/۰۰۳۲۴ µg/ml و ۰/۶۶

صحت

صحت یک روش تحلیلی ممکن است به‌صورت نزدیک بودن نتایج آزمون به‌دست‌آمده از روش به مقدار واقعی تعریف شود. اندازه‌گیری صحت روش تحلیلی به‌عنوان درصد بازیابی با سنجش مقدار معین آنالیت در محدوده خطی بیان می‌شود.

صحت باید با استفاده از حداقل ۹ آزمایش روی حداقل ۳ غلظت که بازه مدنظر را پوشش می‌دهند، بررسی شود (۳ غلظت که برای هرکدام از آن‌ها تمام پروسه آزمایش آنالیز ۳ بار تکرار شده باشد).صحت باید با تعیین غلظت نمونه‌ای که مقدار معینی دارو به ان اضافه شده است یا با محاسبه تفاوت بین میانگین و مقدار واقعی پذیرفته شده در بازه محاسبه شود. برای اطمینان از صحت روش برای آنالیت‌های اصلی، RSD باید کوچکتر یا برابر با ۲٪ باشد.نتایج حاصل از بررسی صحت روش برای متفورمین در جدول ۳ ارائه شده است.

جدول ۳. نتایج حاصل از تزریق غلظت‌های معین از متفورمین

Accuracy of Metformin

غلظت	نمونه	محدوده پیک	میانگین	RSD(%)	% Recovery
۰/۴۴µg/ml	۱	۱۷۷۳۷۸۵۸	۱۷۳۵۱۴۵۰/۵۶	۱/۶۹	۱۰۵/۱۱
	۲	۱۷۶۳۰۱۰۰			
	۳	۱۷۷۳۷۳۲۲			
	۴	۱۷۲۳۷۵۸۵			
	۵	۱۷۲۶۴۵۶۹			
	۶	۱۷۳۶۰۸۹۲			
	۷	۱۷۰۲۳۵۶۹			
	۸	۱۷۰۶۵۹۹۳			
	۹	۱۷۰۷۴۸۹۴			
۰/۵۵µg/ml	۱	۱۹۸۵۵۶۲۶	۲۰۳۱۶۸۳۴/۳۳	۱/۲۸	۱۰۳/۴۶
	۲	۱۹۹۴۰۵۳۴			
	۳	۲۰۳۶۷۲۲۶			
	۴	۲۰۲۹۸۱۸۸			
	۵	۲۰۳۲۴۴۲۱			
	۶	۲۰۳۹۴۵۷۰			
	۷	۲۰۲۹۸۱۸۸			
	۸	۲۰۳۲۴۴۲۱			
	۹	۲۰۳۹۴۵۷۰			
۰/۶۶µg/ml	۱	۲۲۵۰۹۲۴۹	۲۲۳۰۷۹۱۳/۴۴	۰/۸۹	۹۷/۰۶
	۲	۲۲۵۰۹۲۴۹			
	۳	۲۲۵۰۹۲۴۹			
	۴	۲۲۰۵۹۰۶۹			
	۵	۲۲۳۰۲۶۵۳			
	۶	۲۲۲۰۷۳۲۳			
	۷	۲۲۴۵۶۸۹۵			
	۸	۲۲۴۶۵۹۸۶			
	۹	۲۲۴۹۸۷۳۶			

دقت

دقت یک روش آنالیز (که با انحراف استاندارد یا انحراف استاندارد نسبی اندازه‌گیری می‌شود)، درجه توافق بین نتایج

[Downloaded from tmuj.iautmu.ac.ir on 2026-10-11]
[DOR: 20.1001.1.10235922.1405.36.3.5.2]
[DOI: 10.66224/iau.36.3.302]

آزمایش فردی است، زمانی که این روش به‌طور مکرر برای نمونه‌برداری‌های متعدد از یک نمونه همگن اعمال می‌شود.

بررسی دقت روش در یک روز (Inter Day)

سه غلظت ۰/۴۴، ۰/۵۵ و ۰/۶۶ میکروگرم بر میلی‌لیتر برای متفورمین و سه غلظت ۰/۰۰۲۱۶، ۰/۰۰۲۷ و ۰/۰۰۳۲۴ میکروگرم بر میلی‌لیتر بر ای لیناگلیپتین در یک روز طی ۳ مرتبه تهیه و هرکدام ۳ بار تزریق شده و انحراف استاندارد نسبی نیز برای داده‌های به‌دست آمده در یک روز محاسبه شد.نتایج حاصل از تزریق غلظت‌های معین لیناگلپتین در جدول ۴ ارائه شده است.

جدول۴. نتایج حاصل از تزریق غلظت‌های معین از لیناگلیپتین

Accuracy of Linagliptin

غلظت	نمونه	محدوده پیک	میانگین	RSD(%)	% Recovery
۰/۰۰۲۱۶ µg/ml	۱	۲۲۱۴۳۵	۲۲۰۷۶۶/۵۵۶۶	۰/۹۷	۹۹/۴۹
	۲	۲۲۱۸۴۶			
	۳	۲۲۳۸۶۹			
	۴	۲۲۴۱۱۰			
	۵	۲۱۹۰۲۰			
	۶	۲۱۹۳۶۰			
	۷	۲۱۹۱۲۵			
	۸	۲۱۹۴۵۷			
	۹	۲۱۸۶۵۹			
۰/۰۰۲۷ µg/ml	۱	۲۷۹۳۷۳	۲۷۸۵۴۹/۸۸۸۹	۰/۹۵	۹۸/۰۶
	۲	۲۷۹۷۶۲			
	۳	۲۸۰۱۷۸			
	۴	۲۷۴۵۹۴			
	۵	۲۷۶۸۱۳			
	۶	۲۷۹۷۹۲			
	۷	۲۷۷۹۸۶			
	۸	۲۷۸۹۶۵			
	۹	۲۷۹۴۸۶			
۰/۰۰۳۲۴ µg/ml	۱	۳۴۷۶۵۰	۳۴۸۳۸۹/۵۵۵۶	۱/۲۶	۱۰۰/۳۲
	۲	۳۵۹۳۲۲			
	۳	۳۴۸۷۷۴			
	۴	۳۴۸۳۲۱			
	۵	۳۴۷۸۱۸			
	۶	۳۴۷۵۶۶			
	۷	۳۴۴۸۹۷			
	۸	۳۴۵۶۹۵			
	۹	۳۴۴۵۶۳			

نتایج حاصل از بررسی دقت متفورمین و لیناگلپتین در یک روز در جدول ۵ ارائه شده است.

جدول۵. نتایج حاصل از تزریق متفورمین و لیناگلپتین در یک روز

Precision Interday

	غلظت	میانگین	انحراف معیار	%RSD
Met	۰/۴۴µg/ml	۱۷۳۵۱۴۵۰/۶	۲۹۲۸۱۴/۳۵۲	۱/۶۹
	۰/۵۵µg/ml	۲۰۳۱۶۸۳۴	۲۵۹۰۷۷/۴	۱/۲۸
	۰/۶۶µg/ml	۲۲۳۰۷۹۱۳	۱۹۹۰۸۷/۷۵	۰/۸۹
Lin	۰/۰۰۲۱۶µg/ml	۲۲۰۷۶۶/۵۵۵۶	۲۱۳۱/۱۷۵۴۴۵	۰/۹۷
	۰/۰۰۲۷µg/ml	۲۷۸۵۴۹/۹	۱۸۱۵/۶۵۲	۰/۶۵
	۰/۰۰۳۲۴µg/ml	۳۴۸۳۸۹/۶	۴۴۰۳/۱۹۵	۱/۲۶

بررسی دقت روش در روزهای متوالی (Intra Day)

غلظت‌های تعیین شده طی سه روز متفاوت و هر نمونه ۳ بار تزریق شد و انحراف استاندارد نسبی نیز برای داده‌های به‌دست آمده طی سه روز و همچنین انحراف استاندارد کل برای هر غلظت محاسبه شد. نتایج حاصل از بررسی دقت متفورمین و لیناگلپتین طی روزهای متوالی در جدول‌های ۶ و ۷ ارائه شده است و درصد انحراف استاندارد کل در جدول ۸ نشان داده شده است.

کمترین حد تشخیص

براساس نسبت سیگنال به نویز ۳ به ۱ تخمین زده شد.

کمترین حد اندازه‌گیری

براساس نسبت سیگنال به نویز ۱۰ به ۱ تخمین زده شد.

بررسی استحکام روش

برای بررسی استحکام روش فاکتورهایی چون اثر تغییر سرعت جریان، ترکیب فاز متحرک و افزودن معرف یونی بررسی شدند. نتیجه بررسی در ابتدای فصل ۴ آورده شده است. بر طبق داده‌های به‌دست آمده، روش مدنظر از استحکام قابل قبولی برخوردار است.

بررسی پایداری قرص حاوی ۲/۵ میلی‌گرم لیناگلیپتین و ۵۰۰ میلی‌گرم متفورمین

در جدول ۹ نتایج آن آمده است.

تزریق نمونه قرص متفورمین و لیناگلیپتین

در جدول ۱۰ یافته‌ها را مشاهده می‌کنید.

یافته‌ها

در این مطالعه، روش کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا (HPLC) برای اندازه‌گیری همزمان متفورمین و لیناگلیپتین در قرص توسعه و اعتبارسنجی شد. پس از بهینه‌سازی شرایط کروماتوگرافی، بهترین جداسازی با استفاده از ستون C18 با ابعاد ۴/۶ × ۱۵۰ میلی‌متر و اندازه ذرات ۵ میکرومتر، فاز متحرک متانول: استونیتریل: بافر پتاسیم دی‌هیدروژن فسفات ۰/۰۲ مولار

[Downloaded from tmuj.iautmu.ac.ir on 2026-10-11]
[DOR: 20.1001.1.10235922.1405.36.3.5.2]
[DOI: 10.66224/iau.36.3.302]

جدول۶. نتایج حاصل از تزریق متفورمین در روز های متوالی

Precision Intraday of Metformin									
Concentration	1st Day			2nd Day			3rd Day		
	میانگین	انحراف معیار	%RSD	میانگین	انحراف معیار	%RSD	میانگین	انحراف معیار	%RSD
۰/۴۴µg/ml	۱۷۳۵۱۴۵۰/۶	۲۹۲۸۱۴/۳۵۲	۱/۶۹	۱۷۴۱۶۷۳۹	۱۳۴۳۰۷/۶	۰/۷۷	۱۷۱۸۶۷۷۵	۲۲۶۸۲۷/۳۸	۱/۳۲
۰/۵۵µg/ml	۲۰۳۱۶۸۳۴	۲۵۹۰۷۷/۴	۱/۲۸	۱۹۳۳۹۸۹۲	۱۱۹۰۸۷	۰/۶۲	۱۹۰۰۷۰۳۰	۷۷۵۸۷/۲۱۲	۰/۴۱
۰/۶۶µg/ml	۲۲۳۰۷۹۱۳	۱۹۹۰۸۷/۷۵	۰/۸۹	۲۲۵۶۶۵۷۲	۱۵۶۵۷۶/۰۸	۰/۶۹	۲۲۱۴۸۴۴۳/۴	۴۹۳۵۶/۵۲۲	۰/۲۲

جدول۷. نتایج حاصل از تزریق لیناگلپتین در روز های متوالی

Precision Interday of Linagliptin									
Concentratio	1st Day			2nd Day			3rd Day		
	میانگین	انحراف معیار	%RSD	میانگین	انحراف	%RSD	میانگین	انحراف معیار	%RSD
۰/۰۰۲۱۶µg/ml	۲۲۰۷۶۶/۵۵۵۶	۲۱۳۱/۱۷۵۴۴۵	۰/۹۷	۲۱۸۳۰۰/۷	۳۹۰/۰۰۵۳	۰/۱۸	۲۲۰۱۳۳/۱۱	۵۹۲۱/۱۲۵۳	۲/۶۹
۰/۰۰۲۷µg/ml	۲۷۸۵۴۹/۹	۱۸۱۵/۶۵۲	۰/۶۵	۲۷۲۲۲۱/۶	۲۲۴۰/۵۸۷	۰/۸۲	۲۸۵۱۴۸	۲۳۰۲/۹۹۶	۰/۸۱
۰/۰۰۳۲۴µg/ml	۳۴۸۳۸۹/۶	۴۴۰۳/۱۹۵	۱/۲۶	۳۲۷۲۵۶/۸	۱۴۱۳/۷۸۶	۰/۴۳	۳۳۹۶۴۵/۸	۴۲۱۸/۹۳۷	۱/۲۴

جدول ۸. درصد انحراف استاندارد سه روز تزریق متوالی

TOTAL RSD%	MET			LINA		
	۰/۴۴	۰/۵۵	۰/۶۶	۰/۰۰۲۱۶	۰/۰۰۲۷	۰/۰۰۳۲۴
	۱/۲۶	۰/۷۷	۰/۶۰	۱/۵۸	۰/۷۷	۰/۷۶

جدول ۹. نتایج حاصل از تزریق ورکینگ استاندارد متفورمین و لیناگلیپتین

Std Injection	metformin		Linagliptin	
No.	RT	Area	RT	Area
۱	۲/۲۰۳	۱۹۸۶۴۴۱۹	۳/۷	۲۸۳۷۰۲
۲	۲/۲۱۲	۱۹۸۶۲۹۷۳	۳/۷	۲۸۳۷۴۶
۳	۲/۲۲۳	۱۹۸۶۳۰۳۱	۳/۷	۲۸۳۶۹۵
غلظت (mg/ml)	۰/۵۶		۰/۰۰۲۷	
میانگین	۲/۲۱	۱۹۸۶۳۴۷۴	۳/۷۴	۲۸۳۷۱۴
انحراف معیار	۰/۰۱	۸۱۸/۶۲	۰/۰	۲۷/۶۵
RSD	۰/۵	۰/۰	۰/۱	۰/۰

جدول ۱۰. نتایج حاصل از تزریق نمونه قرص متفورمین و لیناگلیپتین جهت تعیین Assay

sample No.	Metformin			linagliptin		
	RT	Area	Result (%)	RT	Area	Result (%)
۱	۲/۲۱۹	۱۹۹۸۴۲۶۷	۹۸/۸	۳/۷۳۹	۲۸۹۵۴۶	۹۸/۴
۲	۲/۲۲۳	۱۹۷۹۴۳۴۳	۷۹/۹	۳/۷۴۲	۲۸۶۶۷۶	۹۷/۴
۳	۲/۲۲۳	۱۹۹۶۲۶۷۳	۹۸/۷	۳/۷۴۲	۲۹۰۱۳۷	۹۸/۶
غلظت (mg/ml)		۰/۵۷			۰/۰۰۲۸	
Assay (%)		۹۸/۵			۹۸/۲	

با نسبت ۱۰:۳۵:۵۵، pH برابر ۴/۶، سرعت جریان ۱ میلی‌لیتر بر دقیقه و طول موج ۲۱۸ نانومتر حاصل شد. خطی بودن روش با استفاده از پنج غلظت مختلف در سه تکرار بررسی شد. محدوده خطی برای متفورمین ۰/۱۱ تا ۰/۶۶ میکروگرم بر میلی‌لیتر و

[Downloaded from tmuj.iautmu.ac.ir on 2026-10-11]
[DOR: 20.1001.1.10235922.1405.36.3.5.2]
[DOI: 10.66224/iau.36.3.302]

برای لیناگلیپتین ۰/۰۰۰۵۴ تا ۰/۰۰۳۲۴ میکروگرم بر میلی‌لیتر در نظر گرفته شد. نتایج حاصل از تزریق غلظت‌های مختلف متفورمین و لیناگلیپتین به‌ترتیب در جدول‌های ۱ و ۲ ارائه شده و منحنی‌های کالیبراسیون مربوطه در نمودارهای ۱ و ۲ نشان داده شده‌اند. کروماتوگرام‌های حاصل از تزریق متفورمین و لیناگلیپتین در غلظت‌های مختلف نیز بررسی شدند. کروماتوگرام‌های مربوط به غلظت‌های ۰/۴۴، ۰/۵۵ و ۰/۶۶ میکروگرم بر میلی‌لیتر متفورمین و ۰/۰۰۲۱۶، ۰/۰۰۲۷ و ۰/۰۰۳۲۴ میکروگرم بر میلی‌لیتر لیناگلیپتین به‌ترتیب در شکل‌های ۱ تا ۳ ارائه شده‌اند. در بررسی صحت روش، درصد بازیابی و RSD در غلظت‌های مختلف ارزیابی شد. برای متفورمین، در غلظت ۰/۴۴ میکروگرم بر میلی‌لیتر، میانگین سطح پیک ۱۷۳۵۱۴۵۰/۵۶ و RSD برابر با ۱/۶۹ درصد گزارش شد و درصد بازیابی ۱۱۱۰۵/۱۱ درصد به‌دست آمد. در غلظت ۰/۵۵ میکروگرم بر میلی‌لیتر نیز میانگین سطح پیک ۲۰۳۱۶۸۳۴/۳۳ و RSD برابر با ۱/۲۸ درصد گزارش شد. نتایج مربوط به سایر غلظت‌ها در جدول ۳ ارائه شده است. برای لیناگلیپتین نیز صحت روش در غلظت‌های تعیین‌شده بررسی شد. در غلظت ۰/۰۰۲۱۶ میکروگرم بر میلی‌لیتر، میانگین سطح ۲۷۸۵۴۹/۸۸۸۹، RSD برابر با ۰/۹۷ درصد و درصد بازیابی ۹۸/۰۶ درصد گزارش شد. در غلظت ۰/۰۰۲۷ میکروگرم بر میلی‌لیتر نیز میانگین سطح پیک و RSD برابر با ۹۵/۰ درصد و درصد بازیابی ۹۸/۰۶ درصد به‌دست آمد. نتایج مربوط به سایر تزریق‌ها در جدول ۴ ارائه شده است. دقت روش در یک روز با تهیه و تزریق سه غلظت از هر آنالیت بررسی شد. برای متفورمین، غلظت‌های ۰/۴۴، ۰/۵۵ و ۰/۶۶ میکروگرم بر میلی‌لیتر و برای لیناگلیپتین غلظت‌های ۰/۰۰۲۱۶، ۰/۰۰۲۷ و ۰/۰۰۳۲۴ میکروگرم بر میلی‌لیتر مورد بررسی قرار گرفتند. هر غلظت سه مرتبه تهیه و هر نمونه سه بار تزریق شد. مقادیر RSD به‌دست‌آمده برای متفورمین در این غلظت‌ها به‌ترتیب ۱/۶۹، ۱/۲۸ و ۰/۸۹ درصد و برای لیناگلیپتین به‌ترتیب ۰/۹۷، ۰/۶۵ و ۱/۲۶ درصد بود. نتایج کامل این بررسی در جدول ۵ ارائه شده است. دقت روش در روزهای متوالی نیز با بررسی سه غلظت از هر آنالیت طی سه روز متفاوت ارزیابی شد. در هر روز، هر نمونه سه بار تزریق و RSD مربوط به هر روز محاسبه شد. برای متفورمین، مقادیر RSD روزانه در غلظت‌های ۰/۴۴، ۰/۵۵ و ۰/۶۶ میکروگرم بر میلی‌لیتر در محدوده گزارش‌شده جدول ۶ قرار داشتند. برای لیناگلیپتین نیز در غلظت‌های ۰/۰۰۱۲۶، ۰/۰۰۲۷ و ۰/۰۰۳۲۴ میکروگرم بر میلی‌لیتر، مقادیر RSD روزانه مطابق جدول ۷ به‌دست آمد. در بررسی کلی سه‌روزه، درصد RSD کل برای غلظت‌های مورد بررسی گزارش شد. مقادیر RSD کل برای غلظت‌های مورد مطالعه در جدول ۸ ارائه شده‌اند که برای متفورمین و لیناگلیپتین به‌ترتیب در محدوده ۰/۶۰ تا ۱/۲۶ درصد و ۰/۷۶ تا ۱/۵۸ درصد گزارش شده‌اند. حد تشخیص (LOD) روش بر اساس نسبت سیگنال به نویز ۳ به ۱ و حد تعیین مقدار (LOQ) بر اساس نسبت سیگنال به نویز ۱۰ به ۱ تخمین زده شد. استحکام روش با بررسی اثر تغییر سرعت جریان، ترکیب فاز متحرک و افزودن معرف یونی ارزیابی شد. بر اساس داده‌های به‌دست‌آمده، روش مورد نظر از استحکام قابل قبولی برخوردار بود. پایداری قرص حاوی ۵۰۰ میلی‌گرم متفورمین و ۲/۵ میلی‌گرم لیناگلیپتین نیز بررسی شد و نتایج حاصل در جدول ۹ ارائه شده است. در بررسی تزریق ورکینگ استاندارد، میانگین زمان بازداری متفورمین ۲۱/۲ دقیقه و میانگین سطح پیک آن ۱۹۸۶۳۴۷۴ گزارش شد. برای لیناگلیپتین نیز میانگین زمان بازداری ۳/۷۴ دقیقه و میانگین سطح پیک ۲۸۳۷۱۴ به‌دست آمد. مقادیر RSD زمان بازداری و سطح پیک نیز در جدول ۹ گزارش شده‌اند. در نهایت، نمونه قرص حاوی متفورمین و لیناگلیپتین مورد آنالیز قرار گرفت و مقدار هر دو ماده مؤثره با استفاده از روش پیشنهادی تعیین شد. نتایج حاصل از تعیین مقدار (Assay) نمونه‌های قرص در جدول ۱۰ ارائه شده است. بر اساس مقدار نهایی گزارش‌شده در جدول، Assay متفورمین ۹۸/۵ درصد و لیناگلیپتین ۹۸/۲ درصد به‌دست آمد. در مجموع، نتایج حاصل از بررسی خطی بودن، صحت، دقت، حد تشخیص، حد تعیین مقدار، استحکام و آزمون نمونه قرص نشان داد که روش توسعه‌یافته قابلیت استفاده برای اندازه‌گیری همزمان متقورمین و لیناگلیپتین را دارد.

بحث

وضوح، یک شاخص مهم HPLC است که معمولاً با سرعت جریان، طول موج و چگونگی هدف قرار دادن کامل اجزای یک نمونه در هنگام عبور از ستون فاز معکوس ارزیابی می‌شود. عوامل متعددی وجود دارد که می‌تواند بر وضوح تأثیر بگذارد. رایج ترین آن‌ها اجزای نمونه، انتخاب فاز متحرک و غلظت دو حلال و بافر و معرف یونی، عملکرد آشکارساز و... است. در این پروسه پژوهشی نیز متاسفانه با مشکلاتی غیرقابل پیش‌بینی از جمله Overlap شدن دنباله یا Tailing و حتی Fronting و Splitting یا شکافتگی در پیک‌های کروماتوگرافی که باعث بهم خوردن تقارن پیک می‌شد، مواجه شدیم. به‌علاوه، جهت رویت پیک‌های شارپ متفورمین و لیناگلیپتین با وضوح و

[Downloaded from tmuj.iautmu.ac.ir on 2026-10-11]
[DOR: 20.1001.1.10235922.1405.36.3.5.2]
[DOI: 10.66224/iau.36.3.302]

رزولوشن بالا از تغییر پارامترهایی همچون تغییر سرعت جریان به ۱ میلی‌لیتر بر دقیقه و همچنین تغییر فاز متحرک و تغییر درصد استونیتریل به ۳۵٪ بهره گرفتیم. جهت بهبود پایداری و شرایط جداسازی و اندازه‌گیری سطح زیر پیک متفورمین و ممانعت از پدیدار شدن پیک متفورمین روی پیک blank و جابه‌جایی پیک متفورمین در شرایطی که نمایان شدن پیک لیناگلیپتین به‌طور کامل حفظ و کنترل‌شده است، از تکنیک Ion Pair Reagent یا کروماتوگرافی تبادل یونی به منظور جلوگیری از بروز عوامل مخل استفاده کردیم. IC می‌تواند چندین یون را جدا کرده و با استفاده از یک آشکارساز رسانایی آن‌ها را شناسایی کند. در این میان، جهت کمک به حفظ گونه‌های یونی از SLS به‌عنوان معرف یونی به فاز متحرک استفاده شد. در واقع، افزودن آن با غلظت کم ۰/۰۰۰۵ مولار به فاز متحرک تعادل کامل را برقرار کرده و درنتیجه، زمان بازداری مناسبی نیز ایجاد کرد. همچنین جهت دستیابی به حالت اپتیمم و نتایج مطلوب طول موج نهایی، نقطه تلاقی قله لیناگلپتین و دره متفورمین در طیف حداکثری یعنی ۲۱۸ نانومتر در نظر گرفته شد.توسعه روش پیشنهادی مطابق با دستورالعمل‌های انجمن (ICH) و بنا به ارزیابی دقت، صحت، اختصاصی بودن، خطی بودن، حد تشخیص (LOD) و حد کمی (LOQ) و استحکام مورد تایید واقع شد که از نتایج قابل قبولی برخوردار بود، در نتیجه روش معتبر می‌باشد.بنا به کارآزمایی‌های بالینی انجام‌شده نسبت به ارزیابی اثربخشی و ایمنی درمان ترکیبی لیناگلیپتین و متفورمین در دیابت نوع ۲، نتایج حاکی از آن است که ترکیب این دو ماده موثره در کاهش سطح HbA1c و بهبود کنترل قندخون نسبت به هریک از داروها به تنهایی برتری دارد. به‌علاوه، هیچ عارضه جانبی جدی و قابل توجهی گزارش نشده است. همچنین طبق مشاهدات صورت‌گرفته در این مطالعه، اندازه‌گیری همزمان لیناگلیپتین و متفورمین در قرص با روش پیشنهادشده معتبر، ارزان، آسان و دقیق می‌باشد و می‌تواند به‌عنوان یک روش موثر در اندازه‌گیری این دو API در دارو درنظر گرفته شود.

REFERENCES

1. Lajara R. Use of the dipeptidyl peptidase-4 inhibitor linagliptin in combination therapy for type 2 diabetes. Expert Opin Pharmacother 2012; 13: 2663-71.

2. Barnett AH. Linagliptin: a novel dipeptidyl peptidase 4 inhibitor with a unique place in therapy. Adv Ther 2011; 28: 447-59.

3. Giannarelli R, Aragona M, Coppelli A, Del Prato S. Reducing insulin resistance with metformin: the evidence today. Diabetes Metab 2003; 29: S628–35.

4. Haak T. Combination of linagliptin and metformin for the treatment of patients with Type 2 diabetes. Clin Med Insights Endocrinol Diabetes 2015; 8: 1-6.

5. Aschner P, Kipnes MS, Lunceford JK, Sanchez M, Mickel C, Williams-Herman DE, et al. Effect of the dipeptidyl peptidase-4 inhibitor sitagliptin as monotherapy on glycemic control in patients with Type 2 diabetes. Diabetes Care 2006; 29: 2632-37.

6. Lv Q, Shen J, Miao L, Ye B, Schepers C, Plat A, et al. Early combination therapy with linagliptin and metformin in people with Type 2 diabetes improves glycemic control to HbA1c $\leq$ 6.5% without increasing hypoglycemia: pooled analysis of two randomized clinical trials. Diabetes Ther 2020; 11: 1317-30.

7. Gallwitz B, Rosenstock J, Rauch T, Bhattacharya S, Patel S, von Eynatten M, et al. 2-year efficacy and safety of linagliptin compared with glimepiride in patients with type 2 diabetes inadequately controlled on metformin: a randomized, double-blind non-inferiority trial. Lancet 2012; 380: 475-83.

8. Scheen AJ. Efficacy and safety of Jentadueto® (linagliptin plus metformin). Expert Opin Drug Saf 2013; 12: 275-89.

9. Sortino MA, Sinagra T, Canonico PL. Linagliptin: A thorough Characterization beyond Its Clinical Efficacy. Front Endocrinol (Lausanne) 2013; 4: 16.

10. Siavash M, Tabbakhian M, Sabzghabaee AM, Razavi N. Severity of gastrointestinal Side Effects of metformin Tablet Compared to Pharm Pract 2017; 6: 73-76.

11. Inzucchi SE, Bergenstal RM, Buse JB, Diamant M, Ferrannini E, Nauck M, et al. Management of hyperglycemia in Type 2 diabetes: A patient-centered approach: position statement of the American Diabetes Association (ADA) and the European Association for the Study of Diabetes (EASD). Diabetes Care 2012; 35: 1364-79.

12. Christian Ebere E, Obinna Isiuku B, Andrew Wirnkor V. Applications of column, paper, thin layer and ion exchange chromatography in purifying samples: mini review. SF J. Pharm Anal Chem. 2019; 2: 1-6.

[Downloaded from tmuj.iautmu.ac.ir on 2026-10-11]
[DOR: 20.1001.1.10235922.1405.36.3.5.2]
[DOI: 10.66224/iau.36.3.302]

13. Mlik G, Beyazaslan F, Bilakaya B, Degim IT. Simultaneous Determination of Linagliptin and Metformin by Reverse Phase-High Performance Liquid Chromatography Method: An Application in Quantitative Analysis of Pharmaceutical Dosage Forms. Austin Chromatogr 2023; 8: 1055.

14. Akay C, Değim IT, Sayal A, Aydin A, Özkan Y, Gül H. Rapid and simultaneous determination of acetylsalicylic acid, paracetamol,and their degradation and toxic impurity products by HPLC in pharmaceutical dosage forms. Turk J Med Sci 2008; 38: 167-73.

15. Değim T, Akay C, Büyükafşar K, Cevheroğlu S. Simultaneous determination of codeine and ethyl morphine HCL in tablet formulations using LC. J Pharm Biomed Anal 2001; 26: 15-21.

16. Kowalska M, Woźniak M, Kijek M, Mitrosz P, Szakiel J, Turek P. Management of validation of HPLC method for determination of acetylsalicylic acid impurities in a new pharmaceutical product. Sci Rep 2022; 12: 1.

17. Guideline IHT. Impurities in new drug substances, Q3A. International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use; 2008. Available from: https://database.ich.org/sites/default/files/Q3A%28R2%29%20Guideline.pdf

18. Guideline IHT. Impurities in new drug products, Q3B (R2). International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use; 2006. Available from: https://database.ich.org/sites/default/files/Q3B%28R2%29%20Guideline.pdf

19. Liu DQ, Wu L, Sun M, MacGregor PA. On-line H/D exchange LC– MS strategy for structural elucidation of pharmaceutical impurities. J Pharm Biomed Anal 2007; 44: 320–9.

20. Uslu B, Özkan SA. Determination of Lamivudine and Zidovudine in binary mixtures using first derivative spectrophotometric, first derivative of the ratio-spectra and high-performance liquid chromatography–UV methods. Anal Chim Acta 2002; 466: 175- 85.

21. Ozkan SA, Uslu B. Rapid HPLC assay for lamivudine in pharmaceuticals and human serum. J Liq Chromatogr Relat Technol 2002; 25: 1447-56.

22. Pham-Huy C, Stathoulopoulou F, Sandouk P, Scherrmann JM, Palombo S, Girre C. Rapid determination of valaciclovir and acyclovir in human biological fluids by high-performance liquid chromatography using isocratic elution. J Chromatogr B Biomed Sci Appl 1999; 732: 47-53.

23. Guideline IHT. Validation of analytical procedures, Q2. In: International conference of harmonization. Geneva, Switzerland. 2022; R1. Available from: https://database.ich.org/sites/default/files/Q2%28R1%29%20Guideline.pdf

24. Hacıoğlu A, Çıtlak A, Karakuş S. Development and Validation of HPLC Method for Determination of Nateglinide in Drug Substances. J Res Pharm 2015;19:103-108.

[Downloaded from tmuj.iautmu.ac.ir on 2026-10-11]

[DOR: 20.1001.1.10235922.1405.36.3.5.2]

[DOI: 10.66224/iau.36.3.302]