

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

Melika Bagheri¹, Ensieh Ghasemi²

¹ Department of Pharmaceutical Chemistry, TeMS.C., Islamic Azad University, Tehran, Iran

² Associate Professor, Department of Pharmaceutical Chemistry, TeMS.C., Islamic Azad University, Tehran, Iran

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

توسعه و معتبرسازی روش کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا (HPLC) به منظور
اندازه گیری همزمان لیناگلیپتین و متفورمین در قرصملیکا باقری^۱، انسبیه 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 طراحی شده 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 ۳۵:۵۵:۱۰، 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 اعتبارسنجی شده 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

لیناگلیپتین و متفورمین دو داروی ضد دیابت هستند که اغلب به صورت ترکیبی برای درمان دیابت نوع ۲ استفاده می‌شوند (۱). لیناگلیپتین، مهارکننده دی‌پپتیدیل پپتیداز-۴ (DPP-4) است که سطح هورمون‌های اینکرتین را افزایش می‌دهد و ترشح انسولین را تحریک می‌کند (۲). متفورمین نوعی بیگوانید 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،

انسبیه 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

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 لیناگلیپتین 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 (۱۷-۱۹).

لیناگلیپتین و متفورمین 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 دایچونگ و ۵۵٪ مابقی شامل بافر ۰/۰۲ مولار پتاسیم دی هیدروژن فسفات از برند دکتر مجلی که با ۳۷٪ HCl ۰/۱ نرمال از برند مرک به حجم رسانده‌ایم را با ۰/۰۰۵ 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 تأمین شده بود.

شرایط ابزارآلات و کروماتوگرافی

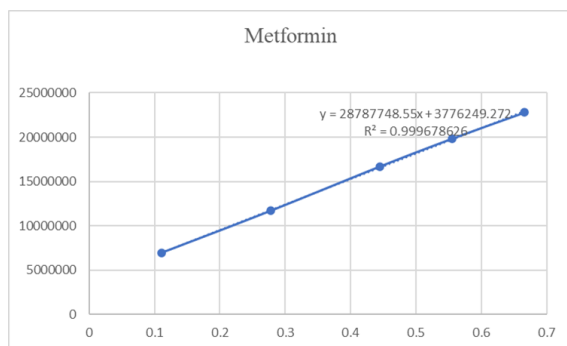
علاوه بر ابزار معمول آزمایشگاه مثل بشر، بالن حجمی، پیپت پاستور، سرنگ، ارلن مایر، فیلتر سرنگی ۰/۴۵μm، سرسمپلر و ...، این تحقیق به روش کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا (HPLC) با استفاده از دستگاه Waters مدل ۲۶۹۴ ساخت کشور آمریکا با یک سیستم کواترنری، تزریق آن توسط اتوسمپلر و پمپ اختلاط فشار پایین و گاززدایی خلاء Inline و دتکتور PDA مدل ۹۹۶ که آشکارسازی با حد تشخیص ۱۰۰ pg 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 370 ultra ساخت شرکت الگا لب محصول UK خالص‌سازی شد. PH متر مورد استفاده در این تحقیق ۷۳۱۰ Inolab تولید شرکت دبلوتی دلبیو 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

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 تعیین شده متفورمین

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

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 لیناگلپتین در جدول ۲ ارائه شده است.

جدول ۲. نتایج حاصل از تزریق غلظت‌های تعیین شده لیناگلپتین

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

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 شکل های ۱ تا ۳ نشان داده شده‌اند.

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 (RPM ۱۰۰۰۰) ساخت شرکت ایرانی ارمغان طب ایرانیان بهره گرفتیم. تحقیق در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد با سرعت جریان ۱ ml/min و طول موج ۲۱۸ نانومتر جهت دستیابی به حالت ایتیم و رویت پیک‌هایی با رزولوشن بالا انجام شد.

تهیه محلول استوک استاندارد متفورمین

۱۱ میلی گرم 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، ۴ و ۵/۹ میلی لیتر از محلول استوک برداشته و در بالن ۱۰ توسط ۰/۰۱ N HCl به حجم رسانده تا غلظت‌های ۰/۱۱، ۰/۲۷۵، ۰/۴۴، ۰/۵۵ و ۰/۶۶ μg/ml ساخته شود.

تهیه محلول استوک استاندارد لیناگلپتین: ۰/۰۰۵۴ میلی گرم از استاندارد لیناگلپتین 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 لیناگلپتین: جهت تهیه محلول استاندارد لیناگلپتین به ترتیب ۱، ۲/۵، ۴ و ۵/۹ میلی لیتر از محلول استوک برداشته و در بالن ۱۰ توسط ۰/۰۱ N HCl به حجم رسانده تا غلظت‌های ۰/۰۰۰۵۴، ۰/۰۰۱۳۵، ۰/۰۰۲۱۶، ۰/۰۰۲۷، ۰/۰۰۳۲۴ ساخته شود.

تهیه محلول نمونه

۲۰ عدد قرص حاوی ۵۰۰ میلی گرم متفورمین و ۲/۵ میلی گرم لیناگلپتین جداگانه وزن گردید. قرص‌ها را پودر کرده و از پودر یکنواخت شده حاصل، معادل وزن یک قرص برداشته و سپس در بالن ۱۰ میلی‌لیتری با حلال‌های فاز متحرک به حجم رسانده و به کمک سونیکتور 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 ۰/۰۰۲۱۶-۰/۰۰۳۲۴ میکروگرم بر میلی‌لیتر برای متفورمین جهت ۰/۰۰۰۵۴-۰/۰۰۳۲۴ میکروگرم بر میلی‌لیتر آزمایش ارزیابی شود. جهت

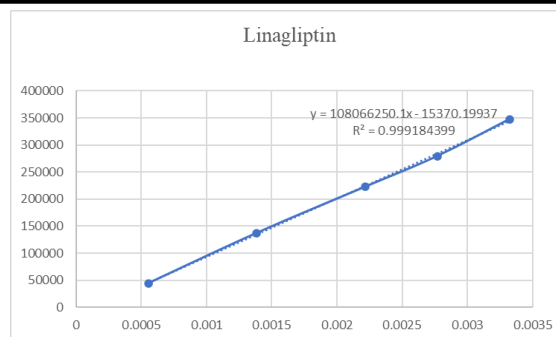
صحت باید با استفاده از حداقل ۹ آزمایش روی حداقل ۳ غلظت که بازه مدنظر را پوشش می‌دهند، بررسی شود (۳ غلظت که برای هرکدام از آن‌ها تمام پروسه آزمایش آنالیز ۳ بار تکرار شده باشد). صحت باید با تعیین غلظت نمونه‌ای که مقدار معینی دارو به آن اضافه شده است یا با محاسبه تفاوت بین میانگین و مقدار واقعی پذیرفته 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

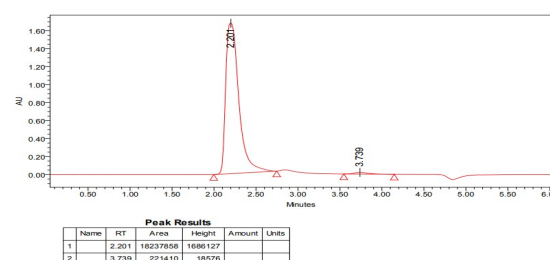
Accuracy of Metformin					
غلظت	محدوده پیک نمونه	میانگین	RSD(%)	% Recovery	
۰/۴۴ μg/ml	۱	۱۷۷۳۷۸۵۸	۱۷۳۵۱۴۵۰/۵۶	۱/۶۹	۱۰۵/۱۱
	۲	۱۷۶۳۰۱۰۰			
	۳	۱۷۷۳۷۳۲۲			
	۴	۱۷۲۳۷۵۸۵			
	۵	۱۷۲۶۴۵۶۹			
	۶	۱۷۳۶۰۸۹۲			
	۷	۱۷۰۲۳۵۶۹			
	۸	۱۷۰۶۵۹۹۳			
	۹	۱۷۰۷۴۸۹۴			
۰/۵۵ μg/ml	۱	۱۹۸۵۵۶۲۶	۲۰۳۱۶۸۳۴/۳۳	۱/۲۸	۱۰۳/۴۶
	۲	۱۹۹۴۰۵۳۴			
	۳	۲۰۳۶۷۲۲۶			
	۴	۲۰۲۹۸۱۸۸			
	۵	۲۰۳۲۴۴۲۱			
	۶	۲۰۳۹۴۵۷۰			
	۷	۲۰۲۹۸۱۸۸			
	۸	۲۰۳۲۴۴۲۱			
	۹	۲۰۳۹۴۵۷۰			
۰/۶۶ μg/ml	۱	۲۲۵۰۹۲۴۹	۲۲۳۰۷۹۱۳/۴۴	۰/۸۹	۹۷/۰۶
	۲	۲۲۵۰۹۲۴۹			
	۳	۲۲۵۰۹۲۴۹			
	۴	۲۲۰۵۹۰۶۹			
	۵	۲۲۳۰۲۶۵۳			
	۶	۲۲۳۰۷۳۲۳			
	۷	۲۲۴۵۶۹۸۵			
	۸	۲۲۴۶۵۹۸۶			
	۹	۲۲۴۹۸۷۳۶			

دقت

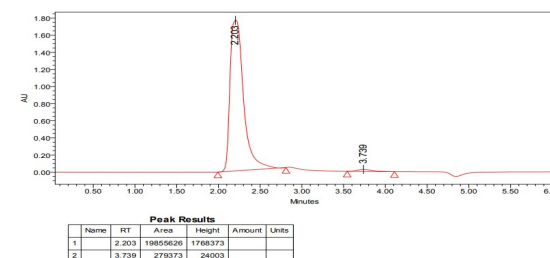
دقت یک روش آنالیز (که با انحراف استاندارد یا انحراف استاندارد نسبی اندازه‌گیری می‌شود)، درجه توافق بین نتایج



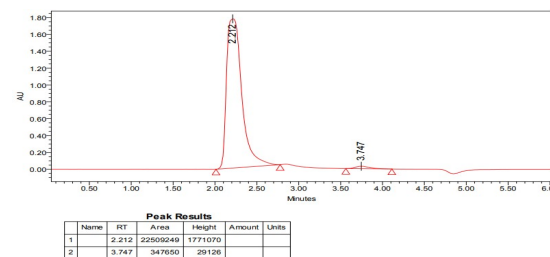
نمودار ۲. نمودار منحنی کالیبراسیون لیناگلیپتین



شکل ۱. کروماتوگرام حاصل از تزریق متفورمین لیناگلیپتین به ترتیب با غلظت ۰/۴۴ و ۰/۰۲۱۶ μg/ml



شکل ۲. کروماتوگرام حاصل از تزریق متفورمین لیناگلیپتین به ترتیب با غلظت ۰/۵۵ و ۰/۰۲۷ μg/ml



شکل ۳. کروماتوگرام حاصل از تزریق متفورمین لیناگلیپتین به ترتیب با غلظت ۰/۶۶ و ۰/۰۳۲۴ μg/ml

صحت

صحت یک روش تحلیلی ممکن است به صورت نزدیک بودن نتایج آزمون به دست‌آمده از روش به مقدار واقعی تعریف شود. اندازه‌گیری صحت روش تحلیلی به عنوان درصد بازیابی یا سنجش مقدار معین آنالیت در محدوده خطی بیان می‌شود.

جدول ۵. نتایج حاصل از تزریق متفورمین و لیناگلپتین در یک روز

Precision Interday			
	غلظت	میانگین	انحراف معیار
Met	۰/۴۴ μg/ml	۱۷۳۵۱۴۵۰/۶	۲۹۲۸۱۴/۳۵۲
	۰/۵۵ μg/ml	۲۰۳۱۶۸۳۴	۲۵۹۰۷۷/۴
	۰/۶۶ μg/ml	۲۲۳۰۷۹۱۳	۱۹۹۰۸۷/۷۵
Lin	۰/۰۰۲۱۶ μg/ml	۲۲۰۷۶۶/۵۵۵۶	۲۱۳۱/۱۷۵۴۴۵
	۰/۰۰۲۷ μg/ml	۲۷۸۵۴۹/۹	۱۸۱۵/۶۵۲
	۰/۰۰۳۲۴ μg/ml	۳۴۸۳۸۹/۶	۴۴۰۳/۱۹۵

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 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 میلی گرم لیناگلپتین و**۵۰۰ میلی گرم متفورمین**

در جدول ۹ نتایج آن آمده است.

تزریق نمونه قرص متفورمین و لیناگلپتین

در جدول ۱۰ یافته‌ها را مشاهده می‌کنید.

یافته‌ها

در این مطالعه، روش کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا (HPLC) برای اندازه‌گیری همزمان متفورمین و لیناگلپتین 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

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 برای لیناگلپتین در یک روز طی ۳ مرتبه تهیه و هرکدام ۳ بار تزریق شده و انحراف استاندارد نسبی نیز برای برای داده‌های به‌دست آمده در یک روز محاسبه شد. نتایج حاصل از تزریق غلظت‌های معین لیناگلپتین در جدول ۴ ارائه شده است.

جدول ۴. نتایج حاصل از تزریق غلظت‌های معین از لیناگلپتین

Accuracy of Linagliptin			
	غلظت	محدوده نمونه	میانگین
		پیک	
۰/۰۰۲۱۶ μg/ml	۱	۲۲۱۴۳۵	۲۲۰۷۶۶/۵۵۵۶
	۲	۲۲۱۸۴۶	
	۳	۲۲۳۸۶۹	
	۴	۲۲۴۱۱۰	
	۵	۲۱۹۰۲۰	
	۶	۲۱۹۳۶۰	
	۷	۲۱۹۱۲۵	
	۸	۲۱۹۴۵۷	
	۹	۲۱۸۶۵۹	
۰/۰۰۲۷ μg/ml	۱	۲۷۹۳۷۳	۲۷۸۵۴۹/۸۸۸۹
	۲	۲۷۹۷۶۲	
	۳	۲۸۰۱۷۸	
	۴	۲۷۴۵۹۴	
	۵	۲۷۶۸۱۳	
	۶	۲۷۹۷۹۲	
	۷	۲۷۷۹۸۶	
	۸	۲۷۸۹۶۵	
	۹	۲۷۹۴۸۶	
۰/۰۰۳۲۴ μg/ml	۱	۳۴۷۶۵۰	۳۴۸۳۸۹/۵۵۵۶
	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.

جدول ۶. نتایج حاصل از تزریق متفورمین در روز های متوالی

Precision Intraday of Metformin									
Concentration	1 st Day			2 nd Day			3 rd 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

جدول ۷. نتایج حاصل از تزریق لیناگلیپتین در روز های متوالی

Precision Interday of Linagliptin									
Concentratio	1 st Day			2 nd Day			3 rd 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	
	RT	Area	RT	Area
No. 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		

استفاده از پنج غلظت مختلف در سه تکرار بررسی شد. محدوده خطی برای متفورمین ۰/۱۱ تا ۰/۶۶ میکروگرم بر میلی لیتر و

با نسبت ۳۵:۵۵، pH برابر ۴/۶، سرعت جریان ۱ میلی لیتر بر دقیقه و طول موج ۲۱۸ نانومتر حاصل شد. خطی بودن روش با

غلظت‌های مورد بررسی گزارش شد. مقادیر RSD کل برای غلظت‌های مورد مطالعه در جدول ۸ ارائه شده‌اند که برای متفورمین و لیناگلیپتین به ترتیب 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 میلی گرم متفورمین و ۲/۵ میلی گرم 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 گزارش شده 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 متفورمین 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 متأسفانه 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

برای لیناگلیپتین ۰/۰۰۵۴ تا ۰/۰۳۲۴ میکروگرم بر میلی‌لیتر در نظر گرفته شد. نتایج حاصل از تزریق غلظت‌های مختلف متفورمین و لیناگلیپتین به ترتیب 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 ۰/۰۲۷، ۰/۰۲۱۶ و ۰/۰۳۲۴ میکروگرم بر میلی‌لیتر لیناگلیپتین به ترتیب 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 ۰/۰۲۱۶ میکروگرم بر میلی‌لیتر، میانگین سطح ۲۷۸۵۴۹/۸۸۸۹ و RSD برابر با ۰/۹۷ درصد و درصد بازیابی ۹۸/۰۶ درصد گزارش شد. در غلظت ۰/۰۲۷ 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 ۰/۰۲۱۶، ۰/۰۲۷ و ۰/۰۳۲۴ 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 به ترتیب ۱/۶۹، ۱/۲۸ و ۰/۸۹ درصد و برای لیناگلیپتین به ترتیب ۰/۶۵، ۰/۹۷ 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 گزارش شده جدول ۶ قرار داشتند. برای لیناگلیپتین نیز در غلظت‌های ۰/۰۱۲۶، ۰/۰۲۷ و ۰/۰۳۲۴ میکروگرم بر میلی‌لیتر، مقادیر RSD روزانه مطابق جدول ۷ به‌دست آمد. در بررسی کلی سه‌روزه، درصد RSD کل برای

رزولوشن بالا از تغییر پارامترهایی همچون تغییر سرعت جریان به ۱ میلی لیتر بر دقیقه و همچنین تغییر فاز متحرک و تغییر درصد استونیتریل به ۳۵٪ بهره گرفتیم. جهت بهبود پایداری و شرایط جداسازی و اندازه گیری سطح زیر پیک متفورمین و ممانعت از پدیدار شدن پیک متفورمین روی پیک blank و جابه جایی پیک متفورمین در شرایطی که نمایان شدن پیک لیناگلیپتین به طور کامل حفظ و کنترل شده است، از تکنیک Ion Pair Reagent یا کروماتوگرافی تبادل یونی به منظور جلوگیری از بروز عوامل مخل استفاده کردیم. IC می تواند چندین یون را جدا کرده و با استفاده از یک آشکارساز رسانایی آن ها را شناسایی کند. در این میان، جهت کمک به حفظ گونه های یونی از SLS به عنوان معرف یونی به فاز متحرک استفاده شد. در واقع، افزودن آن با غلظت کم ۰/۰۰۵ مولار به فاز متحرک تعادل کامل را برقرار کرده و در نتیجه، زمان بازداری مناسبی نیز ایجاد کرد. همچنین جهت دستیابی به حالت اپتیمم و نتایج مطلوب طول موج نهایی، نقطه تلاقی قله

لیناگلیپتین و دره متفورمین در طیف حداکثری یعنی ۲۱۸ نانومتر در نظر گرفته شد. توسعه روش پیشنهادی مطابق با دستورالعمل های 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 می باشد. بنا به کارآزمایی های بالینی انجام شده 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. به علاوه، هیچ عارضه جانبی جدی و قابل توجهی گزارش نشده است. همچنین طبق مشاهدات صورت گرفته در این مطالعه، اندازه گیری همزمان لیناگلیپتین و متفورمین در قرص با روش پیشنهاد شده معتبر، ارزان، آسان و دقیق می باشد و می تواند به عنوان یک روش موثر در اندازه گیری این دو API در دارو در نظر 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, Luncford 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, Sabzghabae 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.

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, Büyükaşar 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.