

T.C.
KIRKLARELİ ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
KİMYA ANA BİLİM DALI

SİTAGLİBTİN FOSFAT MONOHİDRAT VE METFORMİN
HİDROKLORÜR ETKEN MADDELERİNİN SIVI
KROMATOĞRAFİSİ İLE MİKTAR TAYİNİ METOT
VALİDASYONU ÇALIŞMASI

YÜKSEK LİSANS TEZİ
Gökhan ÇOLAKOĞLU

Mayıs, 2025

T.C.
KIRKLARELİ ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
KİMYA ANA BİLİM DALI

**SİTAGLİBTİN FOSFAT MONOHİDRAT VE METFORMİN
HİDROKLORÜR ETKEN MADDELERİNİN SIVI
KROMATOĞRAFİSİ İLE MİKTAR TAYİNİ METOT
VALİDASYONU ÇALIŞMASI**

YÜKSEK LİSANS TEZİ
Gökhan ÇOLAKOĞLU

Tez Danışmanı: Prof. Dr. Cemile ÖZCAN

Mayıs, 2025

ETİK BEYAN

“Kırklareli Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Tez ve Dönem Projesi Yazım Kurallarına uygun olarak hazırladığım bu tez çalışmasında; tez içinde sunduğum bilgileri, verileri ve dokümanları, değişik sonuç verebilecek şekilde araştırma araç gereçleri kullanmadan, işlem veya kayıt sonuçlarını değiştirmeden akademik ve etik kurallar çerçevesinde bizzat elde ettiğimi, bilimsel etik ve ahlak kurallarına uygun olarak sunduğumu, tez çalışmasında yararlandığım eserlerin tümüne uygun atıfta bulunarak kaynak gösterdiğimi, bu tezde sunduğum çalışmanın özgün olduğunu bildirir, aksi bir durumda aleyhime doğabilecek tüm hak kayıplarını kabullendiğimi beyan ederim.”

Gökhan ÇOLAKOĞLU

23/05/2025

İmza

ÜRETKEN YAPAY ZEKÂ ETİK BEYANI

Tezde Üretken Yapay Zeka araçlarını araştırma yöntemi, örneklem büyüklüğü tespiti/güç analizi yapılması, veri analizi, veri toplama, veri depolama ve paylaşımı (federatif veri paylaşım/kullanım sistemleri dahil), literatür taraması, kaynakların düzenlenmesi, dil bilgisi ve yazım kontrolü, çeviri gibi işlerde kullandığımı; bu süreçlerde yaptırılan işleri dikkat ve özenle gözden geçirerek maddi hataları ve taraflı ya da yazılımsal/algortmik ya da olgusal/yorumsal hataları tespit ederek düzelttiğimi, bağlamsal tutarlılığı sağladığımı ve ortaya çıkan ürünün (metin, resim, ses, görüntü, kod, karar, sonuç) yasal ve etik açıdan doğabilecek tüm sorumluluğunu üstlendiğimi beyan ederim.

Gökhan ÇOLAKOĞLU

23/05/2025

İmza

TEZ ONAYI

“Kırklareli Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Kimya Anabilim Dalı, Kimya Programında Yüksek Lisans öğrencisi Gökhan ÇOLAKOĞLU tarafından. Prof. Dr. Cemile ÖZCAN ’nın danışmanlığında hazırlanan “Sitagliptin Fosfat Monohidrat ve Metformin Hidroklorür Etken Maddelerinin Sıvı Kromatografisi ile Miktar Tayini Metot Validasyonu Çalışması” başlıklı tez aşağıdaki jüri üyeleri tarafından 23/05/2025 tarihinde yapılan Tez Savunma Sınavında oy birliği ile başarılı bulunmuş ve Yüksek Lisans olarak kabul edilmiştir.”

Tez Danışmanı:

Prof. Dr. Cemile ÖZCAN
Kırklareli Üniversitesi

Jüri Üyeleri:

Doç. Dr. Nurdan KURNAZ YETİM **Prof. Dr. Dilek BAKIRCIOĞLU**
Kırklareli Üniversitesi Trakya Üniversitesi

Tez Savunma Tarihi: 23/05/2025

ÖN SÖZ

Bu çalışmada desteğini esirgemeyen değerli danışman hocam Prof. Dr. Cemile ÖZCAN “Kırklareli Üniversitesi Kimya Bölümü” sonsuz teşekkürlerimi sunarım. Ayrıca çalışmanın yürütülmesinde katkıda bulunan desteğini hiçbir zaman esirgemeyen Dr. Cem SARIOĞLU “Deva Holding Ar-Ge Müdürü” ile analitik Gamze DEMİRCAN “Deva Holding Ar-Ge Analitik Geliştirme Müdür Yardımcısı” teşekkür ederim.

Gökhan ÇOLAKOĞLU

Mayıs, 2025

İÇİNDEKİLER

ÖN SÖZ.....	vi
İÇİNDEKİLER.....	vii
SEMBOLLER VE KISALTMALAR	ix
TABLolar LİSTESİ.....	xi
ŞEKİLLER LİSTESİ.....	xiii
ÖZET	xiv
ABSTRACT	xv
1. GİRİŞ	1
2. ARAŞTIRMA METODOLOJİSİ	4
2.1 Sitagliptin fosfat monohidrat	4
2.2 Metformin hidroklorür	5
2.3 Sitagliptin ve metformin hidroklorür kombinasyonunun tip II diyabet tedavisindeki yeri	6
2.4 Literatür araştırması.....	8
2.5 Analitik metot validasyonu	11
2.5.1 Doğruluk	12
2.5.2 Kesinlik.....	12
2.5.3 Seçicilik	12
2.5.4 Doğrusallık ve çalışma aralığı.....	13
2.5.5 Sağlamlık	13
3. MATERYAL VE METOT	15
3.1 Kullanılan ekipmanlar, standartlar ve reaktifler.....	15
3.2 Validasyon çalışmaları	20

3.2.1	Seçicilik	20
3.2.2	Sistem uygunluk	22
3.2.3	Doğrusallık ve çalışma aralığı.....	23
3.2.4	Doğruluk	28
3.2.5	Kesinlik.....	31
3.2.6	Sağlamlık	33
3.2.7	Gerçek rnek alışması.....	37
4.	BULGULAR VE TARTIŞMA.....	40
5.	SONUÇ VE ÖNERİLER	62
	KAYNAKÇA.....	65

SEMBOLLER VE KISALTMALAR

Bu çalışmada kullanılmış simgeler ve kısaltmalar, açıklamaları ile birlikte aşağıda sunulmuştur. Açıklamalar bir satırdan uzun olmamalıdır ve kısaltmalar alfabetik sırayla verilmelidir.

Semboller Açıklamalar

dk : Dakika

g : Gram

mg : Miligram

mL : Mililitre

µL : Mikrolitre

M : Molarite

Kısaltmalar Açıklamalar

ACN : Asetonitril

DAD : Fotodiyot array dedektör

DM : Diyabet mellitus

DPP-4 : Dipeptidil peptidaz

GIP : Glokoza bağımlı insülinotropik polipeptit

GLP-1 : Glukogen benzeri peptit

HCl : Hidroklorür

HPLC : Yüksek performanslı sıvı kromatografisi

IC50 : Yarı maksimum inhibitör konsantrasyonu

MK-0431 : Sitagliptin

UV : Ultraviyole



TABLÖLER LİSTESİ

Tablo 2. 1. Analitik validasyon sırasında dikkate alınması gereken özellikler.....	14
Tablo 3. 1. Sitagliptin/metformin HCl 100/1000 tablet miktar tayini için kullanılan analitik koşullar ve metot parametreleri.....	16
Tablo 4. 1. Seçicilik için veriler	42
Tablo 4. 2. Metformin HCl için sistem uygunluk verileri	48
Tablo 4. 3. Sitagliptin için sistem uygunluk verileri	48
Tablo 4. 4. Metformin HCl için doğrusallık verileri	49
Tablo 4. 5. Sitagliptin için doğrusallık verileri	50
Tablo 4. 6. Metformin HCl için uygulama aralığı verileri.....	52
Tablo 4. 7. Sitagliptin için uygulama aralığı verileri.....	52
Tablo 4. 8. Metformin HCl için doğruluk verileri.....	53
Tablo 4. 9. Sitagliptin için doğruluk verileri.....	54
Tablo 4. 10. Metformin HCl için sistem kesinliği verileri.....	54
Tablo 4. 11. Sitagliptin için sistem kesinliği verileri.....	55
Tablo 4. 12. Metformin HCl için yöntem kesinliği ve laboratuvar içi kesinlik verileri	55
Tablo 4. 13. Metformin HCl için iki analizci sonuçları arasındaki fark.....	56
Tablo 4. 14. Sitagliptin için yöntem kesinliği ve laboratuvar içi kesinlik verileri	56
Tablo 4. 15. Sitagliptin için iki analizci sonuçları arasındaki fark.....	57
Tablo 4. 16. Metformin HCl standardı için akış hızı değişimi sağlamlık verileri.....	57
Tablo 4. 17. Metformin HCl numunesi için akış hızı değişimi sağlamlık verileri.....	57
Tablo 4. 18. Sitagliptin standardı için akış hızı değişimi sağlamlık verileri.....	57
Tablo 4. 19. Sitagliptin numunesi için akış hızı değişimi sağlamlık verileri.....	58
Tablo 4. 20. Metformin HCl standardı için kolon fırını sıcaklık değişimi sağlamlık verileri	58
Tablo 4. 21. Metformin HCl numunesi için kolon fırını sıcaklık değişimi sağlamlık verileri	58
Tablo 4. 22. Sitagliptin standardı için kolon fırını sıcaklık değişimi sağlamlık verileri	58

Tablo 4. 23. Sitagliptin numunesi için kolon fırını sıcaklık değişimi sağlamlık verileri	58
Tablo 4. 24. Metformin HCl için çözelti stabilitesi verileri.....	60
Tablo 4. 25. Sitagliptin için çözelti stabilitesi verileri.....	60
Tablo 4. 26. Metformin HCl için gerçek örnek verileri.....	61
Tablo 4. 27. Sitagliptin için gerçek örnek verileri.....	61
Tablo 4. 28. Sitagliptin/Metformin HCl 100/1000 tablet için HPLC’de uygulanan optimum kromatografik koşullar	61



ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 2. 1. Sitagliptin fosfat monohidrat kimyasal yapısı	5
Şekil 2. 2. Metformin hidroklorür kimyasal yapısı	6
Şekil 4. 1. Metformin HCl UV-DAD dalya boyu taraması kromatogramı.....	41
Şekil 4. 2. Sitagliptin UV-DAD dalya boyu taraması kromatogramı.....	41
Şekil 4. 3. Blank çözeltisi HPLC kromatogramı	42
Şekil 4. 4. Matriks çözeltisi HPLC kromatogramı	42
Şekil 4. 5. Göl suyu matriks çözeltisi HPLC kromatogramı.....	43
Şekil 4. 6. Elma suyu matriks çözeltisi HPLC kromatogramı	43
Şekil 4. 7. Standart çözeltisi HPLC kromatogramı	43
Şekil 4. 8. Metformin HCl numune çözeltisi HPLC kromatogramı.....	44
Şekil 4. 9. Sitagliptin Numune Çözeltisi HPLC Kromatogramı	44
Şekil 4. 10. Göl suyu ile hazırlanan metformin HCl numune çözeltisi HPLC kromatogramı	44
Şekil 4. 11. Göl suyu ile hazırlanan sitagliptin numune çözeltisi HPLC kromatogramı	45
Şekil 4. 12. Elma suyu ile hazırlanan metformin HCl numune çözeltisi HPLC kromatogramı	45
Şekil 4. 13. Elma suyu ile hazırlanan sitagliptin numune çözeltisi HPLC kromatogramı	45
Şekil 4. 14. Metformin HCl standart çözeltisi pik saflığı	46
Şekil 4. 15. Sitagliptin standart çözeltisi pik saflığı	46
Şekil 4. 16. Metformin HCl numune çözeltisi pik saflığı	47
Şekil 4. 17. Sitagliptin numune çözeltisi pik saflığı	47
Şekil 4. 18. Metformin HCl için doğrusallık çalışması kalibrasyon grafiği.....	49
Şekil 4. 19. Sitagliptin için doğrusallık çalışması kalibrasyon grafiği.....	50
Şekil 4. 20. Doğrusallık çalışması derişim seviyelerinin pik taraması	51
Şekil 4. 21. pH 5 tamponu ile çalışılan analiz kromatogramı	59
Şekil 4. 22. pH 3 tamponu ile çalışılan analiz kromatogramı	59

ÖZET

Sitagliptin Fosfat Monohidrat ve Metformin Hidroklorür Etkin Maddelerinin Sıvı Kromatografisi ile Miktar Tayini Metot Validasyonu Çalışması

Sitagliptin fosfat monohidrat/ metformin hidroklorür, tip II diyabetli yetişkinlerde kandaki glikoz (şeker) seviyelerini kontrol etmek için kullanılan bir ilaçtır. Sitagliptin Fosfat Monohidrat, DPP-4 (dipeptidil peptidaz-4) adlı enzimi engeller ve vücudumuzun yemekten sonra ürettiği insülin seviyelerini düzenler. Metformin Hidroklorür ise biguanid sınıfı bir ilaç olup karaciğerdeki glikoz (şeker) üretimini azaltır ve bağırsaklar tarafından glikoz emilimini düşürerek tip II diyabeti (Tip II şeker hastalığı) olan hastalarda kan şekeri seviyelerini kontrol altında tutmak için kullanılır. Sitagliptin Fosfat Monohidrat ve Metformin Hidroklorür, tip 2 diyabetli yetişkinlerde kan şekeri kontrolünü iyileştirmek için diyet ve egzersizle birlikte kullanılan bir kombinasyon ilacıdır.

Bu çalışmanın amacı, Sitagliptin fosfat monohidrat ve metformin hidroklorür için HPLC-DAD-UV ile yeni bir metot validasyonu ve optimizasyon çalışması yapmaktır. Sitagliptin Fosfat Monohidrat ve Metformin Hidroklorür için yöntem doğrulaması, doğrusalılık, kesinlik, doğruluk, sağlamlık, çözelti stabilitesi ve seçicilik çalışmaları yapılmıştır.

Anahtar Kelimeler: Tip II diyabet, insülin, sitagliptin fosfat monohidrat, metformin hidroklorür, HPLC.

ABSTRACT

Method Validation of The Active Ingredients Sitagliptin Phosphate Monohydrate and Metformin Hydrochloride by Liquid Chromatography

Sitagliptin phosphate monohydrate/metformin hydrochloride is a medication used to control blood glucose (sugar) levels in adults with type II diabetes. Sitagliptin phosphate monohydrate blocks an enzyme called DPP-4 (dipeptidyl peptidase-4) and regulates the insulin levels that our bodies produce after meals. Metformin hydrochloride is a biguanide medication that reduces glucose (sugar) production in the liver and is used to control blood sugar levels in patients with type II diabetes by reducing glucose absorption by the intestines. Sitagliptin Phosphate Monohydrate and Metformin Hydrochloride is a combination medication used with diet and exercise to improve blood sugar control in adults with type 2 diabetes.

The objective of the present study is to develop and optimize a novel analytical method for the simultaneous determination of sitagliptin phosphate monohydrate and metformin hydrochloride using HPLC-DAD-UV. Method validation, linearity, precision, accuracy, robustness, solution stability and selectivity studies were performed for sitagliptin phosphate monohydrate and metformin hydrochloride.

Keywords: *Type II diabetes*, insulin, sitagliptin phosphate monohydrate, metformin hydrochloride, HPLC.

1. GİRİŞ

Diyabetes mellitus, kan şekerinin (glikoz) kronik olarak yüksek seviyelere ulaşmasıyla karakterize edilen bir metabolik hastalıktır. Diyabet, vücudun insülin üretme kapasitesindeki eksiklik veya insüline karşı gelişen direnç nedeniyle ortaya çıkar [1,2]. Diyabetes mellitusun (DM) küresel yaygınlığı hızla artmaktadır ve diyabet komplikasyonlarındaki artış, artan yayılım ve ölümlere yol açmaktadır [2]. DM, küresel olarak sağlık sistemlerine artan bir maliyet yüklemektedir ve diyabet komplikasyonlarını azaltmak için terapötik stratejileri gerekli kılmaktadır [3]. Diyabet (Diabetes mellitus), kan şekerinin (glikoz) normalden daha fazla yükselmesine neden olan bir rahatsızlık olarak bilinir, tedavi olmadığında hipergliseminin varlığıyla karakterize bir metabolik bozukluklar grubudur [1,2]. Hiperglisemi, doktorların yüksek kan şekerini tanımlamak için kullandıkları terimdir [1,2]. Yediğinizde vücudunuz yiyecekleri glikoza parçalar ve kana gönderir. Pankreasınızda üretilen bir hormon olan insülin, glikozun kanınızdan kan hücrelerinize enerji için yakıt olarak taşınmasına yardımcı olur. Tüm diyabet formlarında ortak olan temel özellik, pankreas beta hücrelerinin işlev bozukluğu veya yıkımıdır [4]. Bu hücreler yenilenmez, çünkü insan pankreası 30 yaşından sonra beta hücrelerini yenilemekten aciz görünmektedir. Birçok mekanizma, beta hücrelerinin işlevinde düşüşe veya tamamen yıkımına yol açabilir. Bu mekanizmalar arasında genetik yatkınlık ve anormallikler, epigenetik süreçler, insülin direnci, otoimmünite, eşzamanlı hastalıklar, inflamasyon ve çevresel faktörler bulunur [5,6]. Diyabet üç ana başlık altında incelenmektedir. Bunlar, tip II diyabet, tip I diyabet ve gebelik diyabetidir [7,8]. Tip 1 diyabet (T1DM), diyabetli tüm hastaların yaklaşık %5-10'unu oluşturur ve esas olarak pankreasın beta hücrelerinin otoimmün yıkımından kaynaklanır [9]. Gebelik diyabeti, esas olarak periferik dokularda hormonal kaynaklı insülin direnci yoluyla hamile kadınlarda oluşan diğer DM türüdür [10]. Bunlardan karşımıza çokça çıkanı ise vücudumuzun gerekli miktarda insülin üretemediği ve üretilen insülinin olması gerektiği gibi etki gösteremediği Tip II diyabet hastalığıdır [9,11]. Tip 2 diyabet (T2DM), diyabetli hastaların yaklaşık %90-95'ini oluşturan en yaygın diyabet türüdür ve esas olarak periferik dokularda insüline yetersiz yanıt ve insülin direncinden kaynaklanır

[9,11,12]. Tip 2 diyabet, insülin direnci ve relatif insülin eksikliği ile karakterize, ilerleyici bir metabolik hastalıktır [1]. Hastalığın vaka sayısı tüm dünyada hızla artmakta ve artan yaşam süresi, obezite ve hareketsiz yaşam tarzı bu artışta önemli rol oynamaktadır. Tedavi edilmediğinde ciddi mikrovasküler ve makrovasküler komplikasyonlara yol açabilen Tip 2 diyabet, bireylerin yaşam kalitesini olumsuz etkilemesinin yanı sıra sağlık sistemleri üzerinde de önemli bir ekonomik yük oluşturmaktadır. Vücudunuz çok fazla şeker de üretebilir. Bu durumda şeker (glikoz) kanınızda birikir ve kalp hastalığı, böbrek hastalığı, körlük ve amputasyon (organ kesilmesi, organ kopması) gibi ciddi tıbbi sorunlara yol açabilir. Metformin ve sitagliptin kombinasyonu, tip 2 diyabetin neden olduğu yüksek kan şekeri seviyelerini tedavi etmek için kullanılır [13-15]. Metformin, mideden şeker emilimini azaltır, karaciğerden depolanan şekerin salınımını azaltır ve vücudunuzun şekeri daha iyi kullanmasına yardımcı olur, periferik dokularda, özellikle kas hücrelerinde insülinin etkisini artırarak glikozun hücre içine girmesini kolaylaştırır. [13,16]. Sitagliptin, pankreasın daha fazla insülin salgılamasını sağlayan vücuttaki maddeleri artırarak kan şekeri seviyelerini kontrol etmeye yardımcı olur. Ayrıca kanda çok fazla şeker olduğunda karaciğere şeker (glikoz) üretmeyi durdurması sinyalini verir [13,17,18].

Bu çalışmada, sitagliptin fosfat monohidrat ve metformin hidroklorür etken maddesinin yüksek performanslı sıvı kromatografisi-fotodiyot array dedektörü/ ultraviyole (HPLC-DAD/UV) dedektör kullanılarak metot validasyonu ve optimizasyonu çalışmasının yapılması amaçlanmaktadır.

2. ARAŞTIRMA METODOLOJİSİ

2.1 Sitagliptin fosfat monohidrat

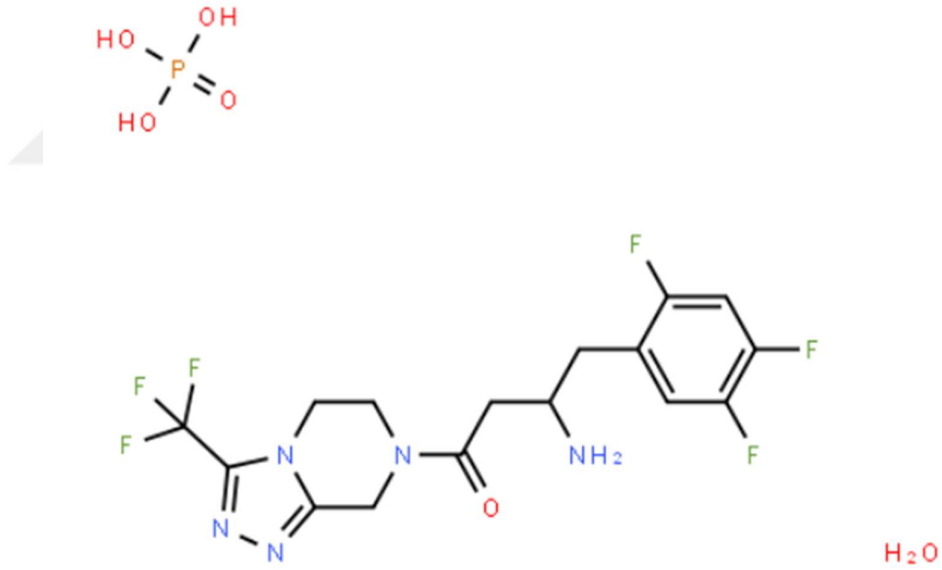
Sitagliptin fosfat monohidrat, Merck tarafından 2006 yılında piyasaya sürülen ve ilk DPP-4 inhibitörü (dipeptidil peptidaz 4) olan ilaçtır (Şekil 2.1.). Tip 2 diyabet (T2DM) tedavisinde kullanılır ve oral yoldan alınan en popüler ve güvenli ilaçlardan biri haline gelmiştir. DPP-4 inhibitörleri, vücutta GLP-1 (glukagon benzeri peptit-1) seviyelerini artırarak kan şekeri seviyelerini düzenler ve insülin salınımını artırır. Sitagliptin, kan şekeri kontrolünü iyileştirmek için etkili bir tedavi seçeneği olarak kabul edilmektedir [19,20]. Sitagliptin, dipeptidil peptidaz-4'ün (DPP-4) oldukça güçlü ve seçici bir inhibitörüdür. Pazarlama izni alan ilk DPP-4 inhibitörüdür [21]. Yetişkin hastalarda tip 2 diyabetin tedavisi için monoterapi olarak ve diğer antihiperglisemik ilaçlarla kombinasyon halinde kullanılır ve bu hastalarda iyi tolere edilir. Sitagliptin, günde bir kez uygulanmasının kolaylığı, iyi etkinliği ve güvenlik profili nedeniyle tip 2 diyabetin yönetiminde önemli bir seçenektir. Ayrıca, hipoglisemiye neden olma potansiyeli çok düşük olduğundan farmakokinetik ilaç-ilaç etkileşimlerine eğilimi düşüktür [22]. Sitagliptin, membran hücre sinyalizasyonu ve çözünür N-terminal prolin peptidaz aktivitesine sahip bir serin proteaz olan dipeptidil peptidaz 4'ün (DPP4) β -amino asit türevidir [21,23].

Sitagliptin, tip 2 diyabetli hastalarda inkretin hormonlarının inaktivasyonunu yavaşlatarak etkilerini gösterdiğine inanılan bir DPP-4 inhibitörüdür. Sitagliptin, glukagon benzeri peptit-1 (GLP-1) ve glukozaya bağımlı insülinotropik polipeptit (GIP) düzeylerinin artmasına, glukagon düzeylerinin azalmasına ve glukozaya karşı daha güçlü bir insülin yanıtına yol açan DPP-4'ü inhibe eder [19,20]. İlaç, dipeptidil peptidaz 4 (DPP-4) adlı bir protein/enzimi rekabetçi bir şekilde inhibe ederek aktif inkretinlerin (GLP-1 ve GIP) miktarının artmasına, glukagon salınımının azalmasına (salınımını azaltır) ve insülin salınımının artmasına neden olur [23,24].

Sitagliptin bir inkretin güçlendiricidir ve gliptin sınıfına ait ilk pazarlanan ilaçtır. Sitagliptin (MK-0431), kimyasal olarak (2R)-4-Okso-4-[3(triflorometil)-5,6 dihidro[1,2,4]triazolo[4,3-a]pirazin-7(8H)-il]-1-(2,4,5-triflorofenil)bütan-2-amin

yapısında 18 Nm’lik bir IC50 ile DPP-4’e karşı çok yüksek bir seçiciliğe sahiptir. (3R)-3-amino-1-[3-(trifluoromethyl)-6,8-dihydro-5H-[1,2,4]triazolo[4,3a]pyrazin-7-yl]-4-(2,4,5-trifluorophenyl)butan-1-one ise IUPAC göre isimlendirilmesidir [21,24]. Sitagliptin oral yoldan %87 oranında biyoyararlanıma sahiptir ve aç veya tok karnına alınması farmakokinetiğini etkilemez. Sitagliptin 2 saat içinde maksimum plazma derişimine ulaşır. Sitagliptinin yaklaşık %79’u değişmeden ana bileşik olarak idrarla vücuttan uzaklaşır. Ayrıca, dozun %87’si idrarla, %13’ü ise dışkıyla atıldığı bildirirmiştir [25].

Sonuç olarak sitagliptin, insülin üretimini ve kan glikoz derişimini düzenleyen endojen glukagon benzeri peptid-1 (GLP-1) gibi inkretinlerin in vivo bozunmasını inhibe eder[26].

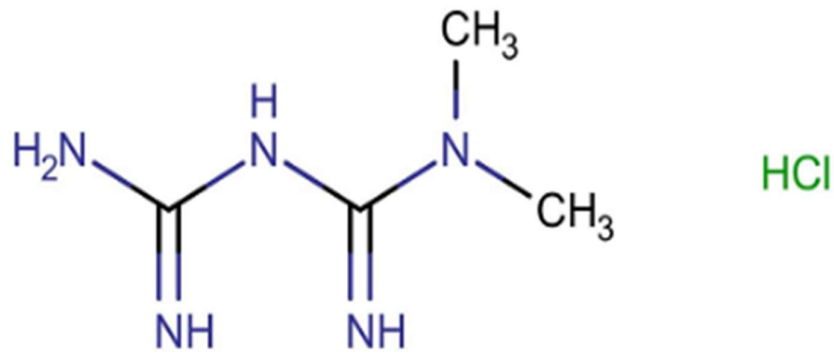


Şekil 2. 1. Sitagliptin fosfat monohidrat kimyasal yapısı

2.2 Metformin hidroklorür

Metformin (dimetilbiguanid) artık diyabet tedavisinde en yaygın olarak reçete edilen ajan olarak bilinmektedir (Şekil 2.2). Tarihi, Orta Çağ Avrupa'sında Galega officinalis Linn'in bitkisel ilaç olarak kullanılmasına kadar uzanmaktadır [27-30]. Metformin'in ana etki mekanizması karaciğer üzerinde glukoz üretimini inhibe etmesidir. Normalde,

karaciğer, glukoneogenez yoluyla kana glikoz salar. Metformin, bu süreci engelleyerek, karaciğerin aşırı glukoz üretimini durdurur. Metformin, AMP-aktivasyonlu protein kinazı (AMPK) aktive eder. AMPK, hücrede enerji dengesini düzenleyen bir enzimdir ve glukoneogenez için gerekli olan bazı enzimlerin sentezini inhibe eder. Bu süreç, karaciğerin glukoz üretimini azaltır ve hiperglisemiye kontrol eder [31]. Metformin, kas hücrelerinde insülin duyarlılığını artırarak, glikozun hücre içine alınmasını teşvik eder. Bu, özellikle kaslar ve yağ dokusundaki glikoz alımını artırarak, kan şekerinin düşmesine yardımcı olur. Bu etki, AMPK aracılığıyla gerçekleştirilir. AMPK'nin aktivasyonu, insülinin etkilerini artırarak hücrelerdeki glikoz taşıyıcılarını (özellikle GLUT4) uyarır ve glikozun hücrelere girişini hızlandırır [32]. Metformin, insülin salınımını doğrudan etkilemez, yani pankreasta insülin üretimini artırmaz. Bununla birlikte, insülinin hücrelerdeki etkisini artırır, böylece insülin salınımının etkinliği dolaylı yoldan güçlenir. Ayrıca, metformin hipoglisemiye yol açma olasılığını düşük tutar, çünkü sadece insülin duyarlılığını artırır, ancak insülin salınımını artırmaz [30,33]. Metformin 50 yıldan uzun süredir piyasada bulunmaktadır ve tip 2 diyabetin tedavisinde birinci basamak tercih edilen ilaç olarak kabul edilmektedir. Bu bağlamda, Amerikan Diyabet Derneği ve Avrupa Diyabet Çalışmaları Derneği tarafından yayınlanan ortak kılavuzlar, bu ajanın tip 2 diyabet tanısında yaşam tarzı değişikliğiyle birlikte kullanılması gerektiğini güçlü ve tekrarlı bir şekilde önermektedir [28-30].



Şekil 2. 2. Metformin hidroklorür kimyasal yapısı

2.3 Sitagliptin ve metformin hidroklorür kombinasyonunun tip II diyabet tedavisindeki yeri

Tip II diyabet hastalarında glisemik kontrolü düzenleyen birbirini tamamlayan mekanizmalara sahip iki antihiperglisemik ajanın kombinasyonu olan sitagliptin, dipeptidil peptidaz-4 (DPP-4) inhibitörü ve biguanid sınıfının bir üyesi olan metformin hidroklorürdür [34]. Tip 2 diyabet tedavisinde kullanılan sitagliptin, dipeptidil peptidaz enziminin (DPP-4) oral yolla yüksek, güçlü ve aktif düzeyde seçici bir inhibitörüdür [21]. DPP-4 inhibitörleri sindirim sisteminden salınan ve kan şekeri düzeylerini düzenlemeye yardımcı olan hormon (inkretin) güçlendiriciler olarak etki gösteren bir ajan sınıfıdır. DPP-4 enzimini inhibe ederek sitagliptin bilinen iki aktif inkretin hormonun düzeylerini yükseltir: glukagon benzeri peptid-1 (GLP-1) ve glukoz bağımlı insülinotropik polipeptid (GIP). İnkretinler glukoz homeostazının fizyolojik regülasyonundan sorumlu olan endojen sistemin bir parçasıdır [35]. Kandaki glukoz konsantrasyonları normal olduğunda veya yükseldiğinde, GLP-1 ve GIP pankreasın beta hücrelerinden insülin sentezini ve salınımını artırır. GLP-1 pankreasın alfa hücrelerinden glukagon sekresyonunu da azaltarak karaciğerde glukoz üretiminin azalmasına yol açar. Kandaki glukoz düzeyleri düştüğünde, insülin salınımı artmaz ve glukagon sekresyonu baskılanmaz. Sitagliptin DPP-4 enziminin güçlü ve yüksek düzeyde seçici bir inhibitörüdür ve terapötik konsantrasyonlarda, çok benzer yapıdaki DPP-8 veya DPP-9 enzimlerini inhibe etmez [21]. Sitagliptin kimyasal yapı ve farmakolojik etki bakımından GLP-1 analogları, insülin, sülfonilüreler veya meglitinidler, biguanidler, peroksizom proliferatörüyle aktifleşen reseptör gama (PPAR γ) agonistleri, alfa glukozidaz inhibitörleri ve amilin analoglarından farklıdır. Sağlıklı bireylerdeki iki günlük çalışmada, tek başına sitagliptin GLP-1 konsantrasyonunu artırırken, tek başına metformin aktif ve total GLP-1 konsantrasyonlarını benzer oranda arttırmıştır. Sitagliptin ve metforminin GLP-1 konsantrasyonları üzerinde aditif etkisi bulunmuştur. Sitagliptin GIP konsantrasyonlarını artırırken, metformin artırmamaktadır. Genel olarak, monoterapi veya kombinasyon tedavisi şeklinde kullanılan sitagliptin glisemik kontrolü iyileştirmiştir [21].

Bu bulgular, sitagliptin ve metforminin glisemik kontrol üzerindeki etkilerinin farklı mekanizmalarla desteklendiğini göstermektedir. Sitagliptin, DPP-4 enzimini inhibe ederek GLP-1 ve GIP seviyelerini artırırken, bu inkretin hormonlarının etkisiyle insülin salınımını artırır ve glukagon sekresyonunu azaltır. Özellikle sitagliptinin

GLP-1 üzerindeki etkisi, pankreas beta hücrelerinden insülin salınımını tetikleyerek postprandiyal (yemek sonrası) kan şekeri düzeylerini düşürür [35].

Metformin ise, karaciğerin glukoz üretimini inhibe ederek ve kas hücrelerinde insülin duyarlılığını artırarak kan şekeri seviyelerinin düşmesine yardımcı olur. Metforminin GLP-1 konsantrasyonları üzerinde belirgin bir etkisi bulunmasa da, insülin direncini azaltarak kan şekeri düzeylerinin kontrolüne katkıda bulunur. Bu nedenle, her iki ilaç da farklı etki mekanizmaları ile glisemik kontrolü iyileştirmekte olup, birlikte kullanıldığında sinerjik bir etki yaratabilir [36].

Kombinasyon tedavisi, özellikle insülin sekresyonunu ve insülin duyarlılığını iyileştiren bir yaklaşım olarak, daha etkin bir glisemik kontrol sağlar. Klinik çalışmalar, sitagliptin ve metformin kombinasyonunun, özellikle tek başına tedaviye kıyasla daha fazla glisemik iyileşme sağladığını göstermektedir. Ayrıca, her iki ilaç da hipoglisemi riskini düşük tutarken, kilo kazancını sınırlı tutarak hastalar için güvenli bir tedavi seçeneği sunmaktadır [37,38].

Sonuç olarak, sitagliptin ve metformin kombinasyonu, tip 2 diyabet tedavisinde etkili ve iyi tolere edilen bir strateji sunmaktadır ve tedaviye uygun hastalar için önemli bir seçenek teşkil etmektedir [1,38].

2.4 Literatür araştırması

Bhende ve arkadaşları çalışmada, sitagliptin fosfat ve metformin hidroklorürün eşzamanlı tayini için RP-HPLC yöntemi geliştirilmiştir. Analiz, XTerra C8 kolonu ($4,6 \times 100$ mm, $3 \mu\text{m}$) ile yapılmış bununla birlikte hareketli faz olarak pH 9 fosfat tamponu, asetonitril ve metanol (35:45:20) kullanılmıştır. Sitagliptin ve metformin için sırasıyla 3,056 ve 2,420 dakikalık alıkonma süreleri elde edilmiştir. Yöntem, 50-150 ppm aralığında doğrusal olup, geri kazanım oranları sitagliptin için %99,5 ve metformin için %100,4 olarak raporlanmıştır [39].

Ramalingam Peraman ve arkadaşları çalışmada, sitagliptin ve metformin kombinasyon tabletleri için stabilite gösteren bir RP-HPLC yöntemi geliştirilmiş ve valide edilmiştir. Analiz, C8 (250 mm $\times$ $4,6$ mm, $5 \mu\text{m}$) kolon ile çalışılmış ve hareketli faz olarak pH 3,0 tamponu, metanol ve su 45:55 % (v/v) içinde 0.2 % (w/v) n-heptansülfonik asit

and 0,2 % (v/v) trietilamin oranında kullanılmıştır. Akış hızı 1,0 mL/dakika ve tespit etme dalga boyu 267 nm olarak seçildi. Metformin ve sitagliptin için doğrusal regresyon katsayıları ve derişim lineerite aralıkları da sırasıyla 0,9998 ve 0,9996, ve 50-450 ve 10-150 µg/mL olarak tespit edildi [40].

Kadım ve arkadaşları çalışmada, sitagliptin, metformin ve empagliflozin içeren tablet formülasyonları için RP-HPLC yöntemi geliştirilmiştir. Analiz, C18 dolgu maddesine sahip X-bridge kolon (250 mm×4,6 mm, 5 µm) ile çalışılmış ve hareketli faz olarak % 0,1 triflorasetik asit tamponu, metanol ve asetonitril (40:40:20) kullanılmıştır. Sitagliptin, metformin ve empagliflozin için sırasıyla 6,429, 3,383 ve 5,571 dakikalık alıkonma süreleri elde edilmiştir. Yöntem, %98,0 – %102,0 aralığında geri kazanım oranları göstermiştir [41].

Karimulla ve arkadaşları, 2013 yılında yayımladıkları çalışmada, sitagliptin ve metformin'in bulk ve tablet formülasyonlarındaki birlikte belirlenmesi için basit, doğru ve hassas bir ters faz yüksek performanslı sıvı kromatografi (RP-HPLC) yöntemi geliştirmiş ve valide etmişlerdir. Sitagliptin ve Metformin'in eşzamanlı tayini için ters faz HPLC yöntemiyle basit, doğru ve kesin bir analiz yöntemi geliştirilmiştir. Bu analizde, Hypersil BDS C18 (100x4,6 mm, 5 µm partikül boyutu) kolonu ve 215 nm dalga boyunda ölçüm yapan, potasyum dihidrojen ortofosfat ve metanol (50:50, v/v) karışımından oluşan, pH'sı ortofosforik asitle 8,5'e ayarlanmış bir hareketli faz ile çalışılmıştır. Hareketli fazın kolondan geçiş hızı dakikada 1,0 mL olarak belirlenmiştir. Sitagliptin ve metforminin tutunma (retention) süreleri 2,3 dakika ve 46 dakika olarak bulunmuştur. Geliştirilen yöntem, ICH yönergelerine uygun olarak valide edilmiştir [42]

Sankar ve arkadaşları çalışmada, sitagliptin fosfat ve metformin hidroklorürün farmasötik dozaj formlarında eşzamanlı tayini için basit, doğru, özgül ve güvenilir bir ters faz yüksek performanslı sıvı kromatografi (RP-HPLC) yöntemi geliştirilmiş ve Uluslararası Uyumlaştırma Konseyi (ICH) yönergelerine göre valide edilmiştir. Geliştirilen yöntem, sistem uygunluğu, doğrusal aralık, doğruluk, hassasiyet ve dayanıklılık açısından valide edilmiştir. Metformin hidroklorür için doğrusal aralık 20–120 µg/mL, sitagliptin fosfat için ise 2–12 µg/mL olarak belirlenmiştir. Her iki bileşik için de geri kazanım oranları %99,4 ile %101,35 arasında bulunmuştur. Bu RP-

HPLC yöntemi, sitagliptin fosfat ve metformin hidroklorürün farmasötik dozaj formlarındaki eşzamanlı tayini için etkili bir analiz yöntemi sunmaktadır. Yöntem, kalite kontrol süreçlerinde ve rutin analizlerde kullanılmak üzere uygundur [43].

Hammash ve arkadaşları formın hidroklorür ve sitagliptin fosfatın bulk ve farmasötik dozaj formlarında eşzamanlı tayini için basit, hızlı, doğru ve hassas bir ters faz yüksek performanslı sıvı kromatografi (RP-HPLC) yöntemi geliştirilmiş ve Uluslararası Uyumlaştırma Konseyi (ICH) yönergelerine göre valide edilmiştir. Analiz, Kromasil karbon 18 dolgu maddeli kolonu (250 mm×4,6 mm, 5 µm partikül boyutu) kullanılarak gerçekleştirilmiş ve hareketli faz olarak 0,1% ortofosforik asit ve (40:60, v/v) ACN kullanılmıştır. Akış hızı 1,0 mL/dakika, dalga boyu 254 nm, alıkonma süreleri metformin için 2,443 dakika, sitagliptin için 4,293 dakika'dır. Geliştirilen RP-HPLC yöntemi, metformin hidroklorür ve sitagliptin fosfatın bulk ve tablet formülasyonlarındaki eşzamanlı tayini için etkili bir analiz yöntemi sunmaktadır. Yöntem, kalite kontrol süreçlerinde ve rutin analizlerde kullanılmak üzere uygundur [44].

Sahoo ve arkadaşlarının 2015 yılında yayımladıkları çalışma, metformin hidroklorür (MET) ve pioglitazon hidroklorür (PIO) içeren farmasötik dozaj formlarında her iki ilacın eşzamanlı tayini için basit, hassas ve doğru bir ters faz yüksek performanslı sıvı kromatografi (RP-HPLC) yöntemi geliştirmeyi ve Uluslararası Uyumlaştırma Konseyi (ICH) yönergelerine göre valide etmeyi amaçlamaktadır. Analiz, C18 ters faz kolon (250 mm×4,6 mm, 5 µm partikül boyutu) kullanılarak gerçekleştirilmiş ve mobil faz olarak asetonitril ve potasyum dihidrojen fosfat tamponu (pH 4,5) karışımı (60:40, v/v). Akış hızı 1,0 mL/dakika, dalga boyu 254 nm, alıkonma süreleri metformin için yaklaşık 2,5 dakika, sitagliptin için yaklaşık 5,8 dakika'dır. Doğrusallık Aralıkları, metformin için 100–600 µg/mL, pioglitazon için 15–90 µg/mL'dir. Geliştirilen RP-HPLC yöntemi, metformin hidroklorür ve pioglitazon hidroklorürün farmasötik dozaj formlarındaki eşzamanlı tayini için etkili bir analiz yöntemi sunmaktadır. Yöntem, kalite kontrol süreçlerinde ve rutin analizlerde kullanılmak üzere uygundur [45].

Himabindu ve arkadaşları çalışmada, metformin hidroklorür (MET) ve sitagliptin fosfat (SITA) içeren tablet formülasyonlarında her iki ilacın eşzamanlı tayini için basit, doğru, hassas ve ekonomik bir UV spektrofotometrik yöntem geliştirmeyi ve

Uluslararası Uyumlaştırma Konseyi (ICH) yönergelerine göre valide etmeyi amaçlamaktadır. Analiz, Çift ışınlı UV/Vis spektrofotometre kullanılarak gerçekleştirilmiş ve çözücü olarak metanol kullanılmıştır. Dalga boyları meformin için 232 nm ve sitagliptin için 266 olarak kullanılmıştır. Doğrusallık Aralıkları metformin için 200–400 µg/mL, sitagliptin için 20–45 µg/mL'dır. elıştırılan yöntem, doğruluk, hassasiyet, özgüllük ve tekrarlanabilirlik açısından valide edilmiştir. Her iki ilaç için de geri kazanım oranları %99,5 ile %100,5 arasında bulunmuştur. Yöntem, sistematik hatalardan arındırılmış ve tekrarlanabilir sonuçlar vermiştir. Bu UV spektrofotometrik yöntem, metformin hidroklorür ve sitagliptin fosfatın tablet formülasyonlarındaki eşzamanlı tayini için etkili bir analiz yöntemi sunmaktadır. Yöntem, kalite kontrol süreçlerinde ve rutin analizlerde kullanılmak üzere uygundur [46].

Bhende ve arkadaşlarının yapmış olduğu çalışmada, sitagliptin fosfat ve metformin hidroklorürün tablet formülasyonlarındaki eşzamanlı tayini için yeni bir RP-HPLC yöntemi geliştirilmiştir. Analizler, XTerra karbon 8 dolgu maddeli kolon (100 mm×4,6 mm, 3 µm) kullanılarak uygulanmıştır. Hareketli faz olarak pH 9'da fosfat tampon çözeltisi, asetonitril ve metanol karışımı (35:45:20,h:h:h) uygulanmıştır. Kolonda hareketli faz taşıma hızı 0.6 ml/dakika olarak belirlenmiş ve UV dedektörü 260 nm'de ayarlanmıştır. Sitagliptin fosfatın retansiyon süresi 3,056 dakika, Metformin hidroklorürün ise 2,420 dakika olarak bulunmuştur. Her iki bileşen için doğrusal yanıt 50–150 ppm aralığında elde edilmiştir. Sitagliptin için geri kazanım oranı %99,5, Metformin için ise %100,4 olarak bulunmuştur. Geliştirilen yöntem, hassas, doğru, seçici, sağlam, tekrarlanabilir ve hızlı olup, tablet formülasyonlarında sitagliptin fosfat ve metformin hidroklorürün eşzamanlı tayini için uygun bir yöntem olarak önerilmektedir [47].

2.5 Analitik metot validasyonu

Analitik bir prosedürün doğruluğunu kanıtlamak için yapılan validasyon çalışmaları, laboratuvarında uygulanan prosedürde metot ve yöntem performansına yönelik ihtiyaçların karşılanması için tespit edilen işlemlerdendir. Metot validasyonlarında doğruluk, kesinlik, seçicilik, doğrusallık, çalışma aralığı, sağlamlık, vb. kullanılan validasyon parametreleridir [48,49,50].

2.5.1 Doğruluk

Analitik prosedürün doğruluğu, gerçek değerler ile analitik prosedürden elde edilen test sonuçlarının yakınlığı olarak ifade edilebilmektedir. Analitik prosedürümüzün doğruluğu çalışma aralığına karşı saptanmaktadır. Etken maddenin miktar tayininde doğruluk, analitik prosedürün bilinen saflıktaki analite uygulanmasıyla ya da iyi karakterize edilmiş bir prosedürün sonuçları ile karşılaştırılmasıyla belirlenmektedir. Formülize edilmiş müstahzarda (önceden hazırlanarak eczanelerde satışa sunulan ilaç, hazır ilaç, vs) ise, çalışma aralığına göre, derişimi bilinen etken maddemizin ürün içerisindeki karışıma (matriks) eklenmesiyle belirlenmektedir. Doğruluk, numunede eklenen miktardaki etken maddenin geri kazanımının yüzdesiyle ya da güven aralığı ile birlikte ortalama ve kabul edilen gerçek değer arasındaki farkların hesaplandığı bir validasyondur. Analitik yöntemin doğruluğu için miktar tayini derişimi %100 kabul edilerek %70, %100, %130 olmak üzere 3 derişimde 3 paralel numune hazırlığı yapılarak çalışılmaktadır. Her bir numuneye %100 derişimdeki matriks karışımı ilave edilmektedir. Tüm seviyeler için 3'er numune hazırlanmaktadır. Her numuneden 2'şer enjeksiyon yapılmaktadır [48,50].

2.5.2 Kesinlik

Analitik prosedürün kesinliği seri yapılan ölçümlerin standart sapması ya da relatif Standard sapması (%RSD) olarak ifade edilmektedir. Analitik prosedürün tekrarlanabilirliğinin bir ölçüsü demektir [48].

Uluslararası İnsan Kullanımı Amacıyla İlaçlar İçin Teknik Gereksinimlerin Uyumlaştırılması Konseyi (ICH=International Conference on Harmonisation) dökümanları kesinliğin, prosedürün belirlediği çalışma aralıklarında üçer derişimlerden 3'er tekrar şeklinde ya da % 100 lük test derişiminde 6 tekrar şeklinde değerlendirilmesi ile yapılmaktadır [48,50].

2.5.3 Seçicilik

ICH'e göre seçicilik; safsızlıklar, bozunma ürünleri ve matris bileşenleri gibi mevcut bileşenlerin varlığında analitin kesin olarak değerlendirilme çalışması yapılmaktadır

[61]. Miktar tayini analizlerinde prosedürün, safsızlıkların veya eksipiyenlerin (ilaç katkı maddeleri) varlığından etkilenmediğinin gösterilebilmesi gerekmektedir. Miktar tayini analizleri yapıldığında eklenen maddelerin miktar tayini sonuçlarını etkilemeyecek şekilde etken maddeye ya da ürüne uygun seviyede safsızlık ya da yardımcı madde ilave edilmesiyle yapılmaktadır. Miktar tayini analizlerindeki sonuçlar, kromatografik safsızlık testlerinde ise safsızlık profilleri kıyaslanması yapılmaktadır [48,50].

2.5.4 Doğrusallık ve çalışma aralığı

Analitik prosedürün doğrusallığı, test sonuçlarının verilen aralık içinde, numunedeki etken madde derişimi ile orantılı olması durumudur. Doğrusallık çalışmasında etken madde derişimi ve miktar tayini sonuçları lineer bir ilişki içinde olmaktadır. Analitik prosedürün çalışma aralığı uygun kesinlik, doğrusallık ve doğruluk verileri kullanılarak elde edilen veriler etken maddenin en yüksek ve en düşük seviye aralığı olarak tanımlanmaktadır. Doğrusallık analitik prosedürün çalışma aralığına karşı saptanır. Numunedeki etken madde derişimine karşı dedektör sinyalinin çizildiği grafiklerdir. Eğer etken madde derişimi ile detektörden elde edilen sinyal doğrusal ilişkiliyse test sonuçları uygun istatistik metotlarla belirlenmektedir (regresyon doğrusunun hesabı en küçük kareler yöntemiyle yapılmaktadır) [48]. Çalışma aralığı uygulanabilmesi için en az beş derişim kullanılmalıdır [48]. ICH in önerdiği çalışma aralıkları [50]:

- Miktar tayini için: Test derişimi %80 ile %120'si,
- İlgili bileşikler için: kabul kriterinin %50 si ile %120'si,
- İçerik tekdüzeliği için: Test derişimi %70'i ile %130'u,
- Dissolüsyon için: Tanımlı aralığın $\pm$ %20'si.

2.5.5 Sağlamlık

Analitik bir prosedürün sağlamlığı, prosedür parametrelerindeki küçük değişikliklerden etkilenmeme kapasitesinin bir ölçüsüdür. Tipik parametreler, çözelti

stabilitesi, farklı ekipman ve farklı analizci olarak sıralanabilmektedir. Likit kromatografide ise tipik parametreler mobil faz derişimi, stabilitesi, pH'ı, farklı lot numaralı kolon, sıcaklık ve akış hızıdır olmaktadır [49].

Farklı türde analitik prosedürler kullanılırken dikkate alınması gereken özellikler (testler dahil) Tablo 2.1'de özetlenmektedir.

Tablo 2. 1. Analitik validasyon sırasında dikkate alınması gereken özellikler [51]

Parametreler	Tanıma	Tayin testleri	Limit testleri	Miktar Tayini
Doğruluk	-	✓	-	✓
Kesinlik				
Tekrarlanabilirlik	-	✓	-	✓
Ara kesinlik ^a	-	✓	-	✓
Seçicilik	✓	✓	✓	✓
Doğrusallık	-	✓	-	✓
Çalışma aralığı	-	✓	-	✓

*Yapılması zorunlu değil
 -Değerlendirilmez
 ✓Değerlendirilir

Çalışmamızda ise sitagliptin fosfat monohidrat ve metformin hidroklorür bileşeni için hızlı, doğruluğu ve kesinliği yüksek, seçici, düşük RSD yüzdesi ve kısa sürede analizi yapılabilen bir teknik geliştirmek amaçlanmaktadır. Bu çalışma ile metot validasyonu, geliştirilmesi ve iyi tekrarlanabilirlik sağlanması hedeflenmiştir. Ayrıca optimize edilen koşullar gerçek örneklere uygulanmıştır.

3. MATERYAL VE METOT

3.1 Kullanılan ekipmanlar, standartlar ve reaktifler

Sitagliptin fosfat monohidrat ve metformin hidroklorür bileşeninin metot validasyonu ve optimizasyonu Shimadzu marka Prominence LC-20A Modüler HPLC sistemi kullanılarak HPLC-DAD/UV sistemi ile yapıldı. Standartların ve numunelerin hazırlanmasında ultrasonik banyo (Bandelin RK 1050 CH, RR.20762 modeli), terazi (Mettler Toledo, MX5 ve XP205), pH metre (Mettler Toledo) kullanıldı.

Sitagliptin fosfat monohidrat standardı (Lot R17170, %96,40 saflıkta) USP referans standardı kullanıldı. Metformin hidroklorür standardı (Lot PHR1084, %98,65 saflıkta) Sigma-Aldrich'in Supelco ikincil standardı kullanıldı. Kullanılan diğer reaktifler de HPLC kullanımına uygun saflıkta ve Sigma- Aldrich veya muadiliydi. Çalışmamızda kimyasal madde olarak asetonitril (ACN) (JT Baker, Lot 2124405860), potasyum monohidrojen difosfat (KH_2PO_4) (Merck, Lot B2037170), fosforik asit (H_3PO_4) (MERCK, Lot K44422173) kullanıldı.

Sitagliptin/metformin HCl 100/1000 tablet miktar tayini validasyonu için oluşturulurken kullanılan HPLC/DAD cihazındaki kromatografik koşullar Tablo 3.1'de sunulmuştur.

Tablo 3. 1. Sitagliptin/metformin HCl 100/1000 tablet miktar tayini için kullanılan analitik koşullar ve metot parametreleri

Paremetreler	Analitik Koşullar
Dedektör	:Tek boylu veya değiştirilebilir dalga boylu DAD/UV Dedektör
Pompa	:Dörtlü gradient pompa/İzokratik Akış
Kolon	:Phenomenex Kinetex EVO C18
Kolon tipi	:C18
Kolon uzunluğu	:250 mm
Kolon partikül boyutu	:5 µm
Kolon çapı	:4,6 mm
Kolon fırın sıcaklığı	:40°C
Numune bölme sıcaklığı	:25°C
Çalışma dalga boyu	:205 nm
Enjeksiyon hacmi	:5 µL
Akış hızı	:0,7 mL/dakika
Analiz süresi	:15 dakika
Metformin HCl pik alıkonma süresi	: ~3,4 dakika
Sitagliptin pik alıkonma süresi	: ~8,9 dakika

Kullanılan çözücüler : pH 4,0 fosfat tamponu, asetonitril (ACN), orto-fosforik asit, ultra saf su (DIW)

Çözücü : DIW/ACN (80:20, h:h)

Hareketli faz: pH 4,0 fosfat tamponu/ACN (80:20, h:h)

Çözeltilerin hazırlanması:

Tampon çözeltisi hazırlığı: 6,8045 gram potasyum dihidrojen fosfat (KH₂PO₄), 1000,0 mL DIW (ultra saf su) içinde çözülerek hazırlanır. pH'ı 4,0±0,05'e ayarlamak için fosforik asit kullanılır.

Hareketli faz hazırlığı: pH 4,0 fosfat tamponu/ACN (80:20, h:h) oranında karıştırılır.

Çözücü hazırlığı (Blank): DIW/ACN (80:20, h:h) oranında karıştırılır.

Stok-1 sitagliptin standart çözeltisi hazırlığı: Yaklaşık 64,3 mg sitagliptin fosfat monohidrat standardı (yaklaşık olarak 50,0 mg sitagliptin) tartılarak, hacmi 100,0 mL olan bir balon jojeye aktarılır. Çözünmesi için 50,0 mL çözücü ilave edilerek, 5 dakika ultrasonik banyoda tutulur. Hacim çizgisine gelene kadar çözücü eklenir ve kapağı sıkıca kapatılır (C_{Sitagliptin}: 0,5 mg/mL).

Stok-2 metformin HCl standart çözeltisi hazırlığı: Yaklaşık 50,0 mg metformin hidroklorür standardı tartılarak, hacmi 100,0 mL olan bir balon jojeye aktarılır. Çözünmesi için 50,0 mL çözücü ilave edilerek, 5 dakika ultrasonik banyoda tutulur. Hacim çizgisine gelene kadar çözücü eklenir ve kapağı sıkıca kapatılır ($C_{\text{Metformin HCl}}$: 0,5 mg/mL).

Standart çözeltisi hazırlığı: İçerisinde 10,0 mL çözücü bulunan 25,0 mL'lik balon joje içerisine 2,5 mL Stok-1 çözeltisinden ve 2,5 mL Stok-2 çözeltisinden eklenir. Hacim çizgisine gelene kadar çözücü eklenir ve kapağı sıkıca kapatılır. RC 0,45 µm filtreden süzülerek HPLC vialine aktarılır ve kapağı kapatılır ($C_{\text{Sitagliptin}}$: 0,05 mg/mL, $C_{\text{Metformin HCl}}$: 0,05 mg/mL).

Stok-1 sitagliptin kontrol standart çözeltisi hazırlığı: Yaklaşık 64,3 mg sitagliptin fosfat monohidrat standardı (yaklaşık olarak 50,0 mg sitagliptin) tartılarak, hacmi 100,0 mL olan bir balon jojeye aktarılır. Çözünmesi için 50,0 mL çözücü ilave edilerek, 5 dakika ultrasonik banyoda tutulur. Hacim çizgisine gelene kadar çözücü eklenir ve kapağı sıkıca kapatılır ($C_{\text{Sitagliptin}}$: 0,5 mg/mL).

Stok-2 metformin HCl kontrol standart çözeltisi hazırlığı: Yaklaşık 50,0 mg metformin hidroklorür standardı tartılarak, hacmi 100,0 mL olan bir balon jojeye aktarılır. Çözünmesi için 50,0 mL çözücü ilave edilerek, 5 dakika ultrasonik banyoda tutulur. Hacim çizgisine gelene kadar çözücü eklenir ve kapağı sıkıca kapatılır ($C_{\text{Metformin HCl}}$: 0,5 mg/mL).

Kontrol standart çözeltisi hazırlığı: İçerisinde 10,0 mL çözücü bulunan 25,0 mL'lik balon joje içerisine 2,5 mL Stok-1 çözeltisinden ve 2,5 mL Stok-2 çözeltisinden eklenir. Hacim çizgisine gelene kadar çözücü eklenir ve kapağı sıkıca kapatılır. RC 0,45 µm filtreden süzülerek HPLC vialine aktarılır ve kapağı kapatılır ($C_{\text{Sitagliptin}}$: 0,05 mg/mL, $C_{\text{Metformin HCl}}$: 0,05 mg/mL).

Numune çözeltisi hazırlığı: Ortalama tablet ağırlığı almak üzere 20 tablet tartılır. Bu tabletler havanda iyice ezilerek toz karışım haline getirilir. Bu toz karışımdan yaklaşık 145,4 mg tartılır, (10,0 mg sitagliptin ve 100,0 mg metformin HCl'ye denk) hacmi 25,0 mL olan balon jojeye aktarılır. Çözünmesi için 5,0 mL çözücü ilave edilerek 5

dakika ultrasonik banyoda tutulur. Hacim çizgisine gelene kadar çözücü eklenir ve kapağı sıkıca kapatılır. Bu çözeltiden 2,5 mL alınarak 20,0 mL'lik balon joje içerisine aktarılır, hacmine çözücüsü ile tamamlanarak sitagliptin numune derişimi hazırlanır. Bu çözeltiden 1,0 mL alınarak 10,0 mL'lik balon jojeye aktarılır ve hacmine çözücü ile tamamlandığında ise metformin HCl numune derişimi hazırlanır. Hazırlanan numune çözeltileri RC 0,45 µm filtrelerden süzülerek HPLC viallerine aktarılır ve kapağı kapatılır ($C_{\text{Sitagliptin}}$: 0,05 mg/mL, $C_{\text{Metformin HCl}}$: 0,05 mg/mL).

Yöntem Seçimi

HPLC sistemi kullanıma başlamadan önce 4'lü gradient pompadan, pompa temizleme programı, kolon şartlanması için baseline düzelene kadar mobil faz akışı verilir. ICH' in önerdiği prosedüre göre aşağıdaki işlemler sırasıyla uygulanır:

- Çözücü' den 1 enjeksiyon yapılır.
- Standart çözeltisinden 6 enjeksiyon yapılır.
- Kontrol standart çözeltisinden 2 enjeksiyon yapılır.
- Numune çözeltisinden, 2 adet hazırlanarak , numunelerin herbirinden 2'ser enjeksiyon yapılır.
- Her 12 numune enjeksiyonundan sonra standart çözeltisinden ara standart olarak 2 enjeksiyon yapılır.
- Analiz sonunda standart çözeltisinden son standart olarak 2 enjeksiyon yapılır.

ICH' in önerdiği prosedüre göre sistem uygunluk parametreleri aşağıdaki şekilde sıralanmıştır:

- Standart çözeltisinin ardışık 6 enjeksiyonu arasındaki sitagliptin ve metformin HCl pikleri için ayrı ayrı % Bağıl Standart Sapma (%RSD) $\leq$ %2,0 olmalıdır.
- Kontrol Standart çözeltisi ile standart çözeltisi arasındaki uyum % 98 - %102 arasında olmalıdır.

- Ara Standart çözeltisi ve son standart çözeltisi ile standart çözeltisi arasındaki uyum % 98 - %102 olmalıdır.
- Standart çözeltisindeki sitagliptin ve metformin HCl pikleri için simetri faktörü en fazla 2,0 olmalıdır.
- Standart çözeltisindeki sitagliptin ve metformin HCl pikleri için teorik plaka sayısı (N) en fazla 2000 olmalıdır.
- Sitagliptin ve metformin HCl pikleri arası rezolüsyon (Rs) 1,5'ten büyük olmalıdır.

Sitagliptin miktarı hesaplanırken aşağıdaki denklem kullanıldı;

$$\% \text{ Sitagliptin} = \frac{A_N}{A_S} \times \frac{W_S}{100} \times \frac{2.5}{25} \times \frac{P}{100} \times \frac{407.314}{523.32} \times \frac{25}{W_n} \times \frac{20}{2.5} \times \frac{W_{ort}}{L} \times 100$$

A_N : Numune çözeltisine ait kromatogramdaki sitagliptin pik alanı

A_S : Standart çözeltisine ait kromatogramdaki sitagliptin pik alanı

W_S : Sitagliptin çalışma standardı tartım miktarı (mg)

P : Sitagliptin çalışma standardı potensi (% 96,60)

W_N : Numune tartım miktarı (mg)

W_{ort} : Ortalama tablet ağırlığı (mg)

L : Etiket değeri (100)

$\frac{407.314}{523.32}$: Sitagliptin çevrim faktörü katsayısı

Metformin HCl miktarı hesaplanırken aşağıdaki denklem kullanıldı;

$$\% \text{ Metformin HCl} = \frac{A_N}{A_S} \times \frac{W_S}{100} \times \frac{2.5}{25} \times \frac{P}{100} \times \frac{25}{W_n} \times \frac{200}{2.5} \times \frac{W_{ort}}{L} \times 100$$

A_N : Numune çözeltisine ait kromatogramdaki metformin HCl pik alanı

A_S : Standart çözeltisine ait kromatogramindeki metformin HCl pik alanı

W_S : Metformin HCl çalışma standardı tartım miktarı (mg)

P : Metformin HCl çalışma standardı potensi (% 98,65)

W_N : Numune tartım miktarı (mg)

W_{ort} : Ortalama tablet ağırlığı (mg)

L : Etiket değeri (1000)

Sonuçların Raporlandırılması:

Miktar tayini sonuçları virgülden sonra 2 basamak olarak raporlandırılır.

Kabul kriterleri:

Serbest bırakma ve raf ömrü %100,00 olan ürün için kabul kriteri % 95,00 - % 105,00 aralığında kabul edilmektedir.

3.2 Validasyon çalışmaları

Miktar belirleme analizlerinde, yönteminin geçerliliğinin doğrulanması için seçicilik, doğrusallık, sağlamlık, doğruluk, kesinlik, çözelti stabilitesi ve çalışma aralığı modellemeleri HPLC sisteminde çalışıldı. Belirtilen modellemeler, çalışılan koşullar ve kabul kriterlerine uygunluğu değerlendirilerek yöntemin geçerliliğinin doğrulanması yapıldı.

3.2.1 Seçicilik

Piklerin tanımlanması, blank ve matriks etkisi

Tanımlama: Çözücü (blank), standart ve numune çözeltileri analiz edilerek herbirinden gelen pikler tespit edildi.

Çözelti hazırlığı

Blank çözeltisi: Çözücü, 500,0 mL’lik hacimsel balona DIW/ACN (80:20, h:h) oranında alınarak karıştırıldı. RC 0,45 µm filtreden süzülerek HPLC vialine aktarıldı ve kapağı kapatıldı.

Matriks çözeltisi hazırlığı: Toz haldeki matriks karışımından 326,0 mg tartılır, hacmi 25,0 mL olan balon jojeye aktarılır. Çözünmesi için 5,0 mL çözücü ilave edilerek 5 dakika ultrasonik banyoda tutulur. Hacim çizgisine gelene kadar çözücü eklenir ve kapağı sıkıca kapatılır. RC 0,45 µm filtreden süzülerek HPLC vialine aktarılır ve kapağı kapatılır.

Stok-1 sitagliptin standart çözeltisi hazırlığı: Yaklaşık 64,3 mg sitagliptin fosfat monohidrat standardı (yaklaşık olarak 50,0 mg sitagliptin) tartılarak, hacmi 100,0 mL olan bir balon jojeye aktarıldı. Çözünmesi için 50,0 mL çözücü ilave edilerek, 5 dakika ultrasonik banyoda tutuldu. Hacim çizgisine gelene kadar çözücü eklendi ve kapağı sıkıca kapatıldı ($C_{\text{Sitagliptin}}$: 0,5 mg/mL).

Stok-2 metformin HCl standart çözeltisi hazırlığı: Yaklaşık 50,0 mg metformin hidroklorür standardı tartılarak, hacmi 100,0 mL olan bir balon jojeye aktarıldı. Çözünmesi için 50,0 mL çözücü ilave edilerek, 5 dakika ultrasonik banyoda tutuldu. Hacim çizgisine gelene kadar çözücü eklendi ve kapağı sıkıca kapatıldı ($C_{\text{Metformin HCl}}$: 0,5 mg/mL).

Standart çözeltisi hazırlığı: İçerisinde 10,0 mL çözücü bulunan 25,0 mL’lik balon joje içerisine 2,5 mL Stok-1 çözeltisinden ve 2,5 mL Stok-2 çözeltisinden eklendi. Hacim çizgisine gelene kadar çözücü eklendi ve kapağı sıkıca kapatıldı. RC 0,45 µm filtreden süzülerek HPLC vialine aktarıldı ve kapağı kapatıldı ($C_{\text{Sitagliptin}}$: 0,05 mg/mL, $C_{\text{Metformin HCl}}$: 0,05 mg/mL).

Numune çözeltisi hazırlığı: Ortalama tablet ağırlığı almak üzere 20 tablet tartıldı. Bu tabletler havanda iyice ezilerek toz karışım haline getirildi. Bu toz karışımdan yaklaşık 145,4 mg tartıldı, (10,0 mg sitagliptin ve 100,0 mg metformin HCl’ye denk) hacmi 25,0 mL olan balon jojeye aktarıldı. Çözünmesi için 5,0 mL çözücü ilave edilerek 5 dakika ultrasonik banyoda tutuldu. Hacim çizgisine gelene kadar çözücü eklendi ve kapağı sıkıca kapatıldı. Bu çözeltiden 2,5 mL alınarak 20,0 mL’lik balon joje içerisine

aktarıldı, hacmine çözücüsü ile tamamlanarak sitagliptin numune derişimi hazırlandı. Bu çözeltiden 1,0 mL alınarak 10,0 mL'lik balon jojeye aktarıldı ve hacmine çözücü ile tamamlandığında ise metformin HCl numune derişimi hazırlandı. Hazırlanan numune çözeltileri RC 0,45 µm filtrelerden süzülerek HPLC viallerine aktarılır ve kapağı kapatıldı ($C_{\text{Sitagliptin}}$: 0,05 mg/mL, $C_{\text{Metformin HCl}}$: 0,05 mg/mL).

PDA Tanımlama için: Metotta belirtildiği şekilde blank, standart çözeltisi, kontrol standart çözeltisi ve numune çözeltisi hazırlandı. 1 blank, 1 standart çözeltisi, 1 kontrol standart çözeltisi, 1 numune çözeltisi hazırlığı yapıldı ve blank çözeltisinden 1'er enjeksiyon, standart ve numune enjeksiyonundan 2'şer enjeksiyon yapıldı. 190 nm-800 nm arasında standart ve numune spektrumu taraması yapılır.

Kabul kriterleri ve sonuçlar

- Metotta belirtilen sistem uygunluk parametrelerini sağlamlık,
- Metot yeterli derecede seçici olmalı,
- Aktif madde piki tutunma zamanında çözücü ve diğer maddelerden gelen herhangi bir pik gözlenmemeli,
- Aktif madde piki çözücü piklerinden ayrılmalı,
- Pik saflık sonucu uygun (saf) olmalıdır.

Seçicilik parametre sonuçları "Bulgular ve Tartışma" bölümünde verildi.

3.2.2 Sistem uygunluk

Stok-1 sitagliptin standart çözeltisi hazırlığı: Yaklaşık 64,3 mg sitagliptin fosfat monohidrat standardı (yaklaşık olarak 50,0 mg sitagliptin) tartılarak, hacmi 100,0 mL olan bir balon jojeye aktarıldı. Çözünmesi için 50,0 mL çözücü ilave edilerek, 5 dakika ultrasonik banyoda tutuldu. Hacim çizgisine gelene kadar çözücü eklendi ve kapağı sıkıca kapatıldı ($C_{\text{Sitagliptin}}$: 0,5 mg/mL).

Stok-2 metformin HCl standart çözeltisi hazırlığı: Yaklaşık 50,0 mg metformin hidroklorür standardı tartılarak, hacmi 100,0 mL olan bir balon jojeye aktarıldı.

Çözünmesi için 50,0 mL çözücü ilave edilerek, 5 dakika ultrasonik banyoda tutuldu. Hacim çizgisine gelene kadar çözücü eklendi ve kapağı sıkıca kapatıldı ($C_{\text{Metformin HCl}}$: 0,5 mg/mL).

Standart çözeltisi hazırlığı: İçerisinde 10,0 mL çözücü bulunan 25,0 mL'lik balon joje içerisine 2,5 mL Stok-1 çözeltisinden ve 2,5 mL Stok-2 çözeltisinden eklendi. Hacim çizgisine gelene kadar çözücü eklendi ve kapağı sıkıca kapatıldı. RC 0,45 µm filtreden süzülerek HPLC vialine aktarıldı ve kapağı kapatıldı ($C_{\text{Sitagliptin}}$: 0,05 mg/mL, $C_{\text{Metformin HCl}}$: 0,05 mg/mL).

Kabul kriterleri ve sonuçlar

- Standart çözeltisinin ardışık 6 enjeksiyonu arasındaki sitagliptin ve metformin HCl pikleri için ayrı ayrı % bağıl standart sapma (%RSD) $\leq$ %2,0 olmalıdır.
- Kontrol Standart çözeltisi ile standart çözeltisi arasındaki uyum % 98 - %102 arasında olmalıdır.
- Ara Standart çözeltisi ve son standart çözeltisi ile standart çözeltisi arasındaki uyum % 98 - %102 olmalıdır.
- Standart çözeltisindeki sitagliptin ve metformin HCl pikleri için simetri faktörü en fazla 2,0 olmalıdır.
- Standart çözeltisindeki sitagliptin ve metformin HCl pikleri için teorik plaka sayısı (N) en fazla 2000 olmalıdır.
- Sitagliptin ve metformin HCl pikleri arası rezolüsyon (R_s) 1,5' den büyük olmalıdır.

Sistem uygunluk parametre sonuçları “Bulgular ve Tartışma” bölümünde verildi.

3.2.3 Doğrusallık ve çalışma aralığı

Tanımlama:

Standart çözeltisinin %1 (LOD), %10 (LOQ), %50, %100, %120 ve %150 derişim aralığında olacak şekilde, 7 farklı derişimde standart çözeltisi hazırlanarak analiz edilir ve dedektör yanıtına göre derişim/alan grafiğı çizilerek kabul kriterlerine uygunluğı test edilir. %1(LOD), %10(LOQ), %100 ve %150 standart çözeltilerinden 6'şar enjeksiyon ve diğeri standart çözeltilerden 2'şer enjeksiyon yapılır.

Çözelti Hazırlığı

Blank çözeltisi: Çözücü, 1000,0 mL'lik balon jojeye DIW/ACN (80:20, h:h) oranında alınarak karıştırıldı. RC 0,45 µm filtreden süzülerek HPLC vialine aktarıldı ve kapağı kapatıldı.

Stok-1 sitagliptin standart çözeltisi hazırlığı: Yaklaşık 64,3 mg sitagliptin fosfat monohidrat standardı (yaklaşık olarak 50,0 mg sitagliptin) tartılarak, hacmi 100,0 mL olan bir balon jojeye aktarıldı. Çözünmesi için 50,0 mL çözücü ilave edilerek, 5 dakika ultrasonik banyoda tutuldu. Hacim çizgisine gelene kadar çözücü eklendi ve kapağı sıkıca kapatıldı ($C_{\text{Sitagliptin}}$: 0,5 mg/mL).

Standart 1 (%1-LOD) çözeltisi hazırlığı: 100,0 mL'lik balon jojeye stok-1 sitagliptin standart çözeltisinden 100,0 µL ilave edildi. Hacim çizgisine gelene kadar çözücü eklendi ve kapağı sıkıca kapatıldı. RC 0,45 µm filtreden süzülerek HPLC vialine aktarıldı ve kapağı kapatıldı ($C_{\text{Sitagliptin}}$: 0,0005 mg/mL).

Standart 2 (%10-LOQ) çözeltisi hazırlığı: 100,0 mL'lik balon jojeye stok-1 sitagliptin standart çözeltisinden 1,0 mL ilave edildi. Hacim çizgisine gelene kadar çözücü eklendi ve kapağı sıkıca kapatıldı. RC 0,45 µm filtreden süzülerek HPLC vialine aktarıldı ve kapağı kapatıldı ($C_{\text{Sitagliptin}}$: 0,005 mg/mL).

Standart 3 (%50) çözeltisi hazırlığı: 100,0 mL'lik balon jojeye stok-1 sitagliptin standart çözeltisinden 5,0 mL ilave edildi. Hacim çizgisine gelene kadar çözücü eklendi ve kapağı sıkıca kapatıldı. RC 0,45 µm filtreden süzülerek HPLC vialine aktarıldı ve kapağı kapatıldı ($C_{\text{Sitagliptin}}$: 0,025 mg/mL).

Standart 4 (%80) çözeltisi hazırlığı: 100,0 mL'lik balon jojeye stok-1 sitagliptin standart çözeltisinden 8,0 mL ilave edildi. Hacim çizgisine gelene kadar çözücü

eklendi ve kapağı sıkıca kapatıldı. RC 0,45 µm filtreden süzülerek HPLC vialine aktarıldı ve kapağı kapatıldı ($C_{\text{Sitagliptin}}$: 0,04 mg/mL).

Standart 5 (%100) çözeltisi hazırlığı: 100,0 mL'lik balon jojeye stok-1 sitagliptin standart çözeltisinden 10,0 mL ilave edildi. Hacim çizgisine gelene kadar çözücü eklendi ve kapağı sıkıca kapatıldı. RC 0,45 µm filtreden süzülerek HPLC vialine aktarıldı ve kapağı kapatıldı ($C_{\text{Sitagliptin}}$: 0,05 mg/mL).

Standart 6 (%120) çözeltisi hazırlığı: 100,0 mL'lik balon jojeye stok-1 sitagliptin standart çözeltisinden 12,0 mL ilave edildi. Hacim çizgisine gelene kadar çözücü eklendi ve kapağı sıkıca kapatıldı. RC 0,45 µm filtreden süzülerek HPLC vialine aktarıldı ve kapağı kapatıldı ($C_{\text{Sitagliptin}}$: 0.06 mg/mL).

Standart 7 (%150) çözeltisi hazırlığı: 100,0 mL'lik balon jojeye stok-1 sitagliptin standart çözeltisinden 15,0 mL ilave edildi. Hacim çizgisine gelene kadar çözücü eklendi ve kapağı sıkıca kapatıldı. RC 0,45 µm filtreden süzülerek HPLC vialine aktarıldı ve kapağı kapatıldı ($C_{\text{Sitagliptin}}$: 0,075 mg/mL).

Stok-2 metformin HCl standart çözeltisi hazırlığı: Yaklaşık 50,0 mg metformin hidroklorür standardı tartılarak, hacmi 100,0 mL olan bir balon jojeye aktarıldı. Çözünmesi için 50,0 mL çözücü ilave edilerek, 5 dakika ultrasonik banyoda tutuldu. Hacim çizgisine gelene kadar çözücü eklendi ve kapağı sıkıca kapatıldı ($C_{\text{Metformin HCl}}$: 0,5 mg/mL).

Standart 1 (%1-LOD) çözeltisi hazırlığı: 100,0 mL'lik balon jojeye stok-2 metformin HCl standart çözeltisinden 100,0 µL ilave edildi. Hacim çizgisine gelene kadar çözücü eklendi ve kapağı sıkıca kapatıldı. RC 0,45 µm filtreden süzülerek HPLC vialine aktarıldı ve kapağı kapatıldı ($C_{\text{Metformin HCl}}$: 0,0005 mg/mL).

Standart 2 (%10-LOQ) çözeltisi hazırlığı: 100,0 mL'lik balon jojeye stok-2 metformin HCl standart çözeltisinden 1,0 mL ilave edildi. Hacim çizgisine gelene kadar çözücü eklendi ve kapağı sıkıca kapatıldı. RC 0,45 µm filtreden süzülerek HPLC vialine aktarıldı ve kapağı kapatıldı ($C_{\text{Metformin HCl}}$: 0,005 mg/mL).

Standart 3 (%50) çözeltisi hazırlığı: 100,0 mL'lik balon jojeye stok-2 metformin HCl standart çözeltisinden 5,0 mL ilave edildi. Hacim çizgisine gelene kadar çözücü eklendi ve kapağı sıkıca kapatıldı. RC 0,45 µm filtreden süzülerek HPLC vialine aktarıldı ve kapağı kapatıldı ($C_{\text{Metformin HCl}}$: 0,025 mg/mL).

Standart 4 (%80) çözeltisi hazırlığı: 100,0 mL'lik b balon jojeye alon jojeye stok-2 metformin HCl standart çözeltisinden 8,0 mL ilave edildi. Hacim çizgisine gelene kadar çözücü eklendi ve kapağı sıkıca kapatıldı. RC 0,45 µm filtreden süzülerek HPLC vialine aktarıldı ve kapağı kapatıldı ($C_{\text{Metformin HCl}}$: 0,04 mg/mL).

Standart 5 (%100) çözeltisi hazırlığı: 100,0 mL'lik balon jojeye stok-2 metformin HCl standart çözeltisinden 10,0 mL ilave edildi. Hacim çizgisine gelene kadar çözücü eklendi ve kapağı sıkıca kapatıldı. RC 0,45 µm filtreden süzülerek HPLC vialine aktarıldı ve kapağı kapatıldı ($C_{\text{Metformin HCl}}$: 0,05 mg/mL).

Standart 6 (%120) çözeltisi hazırlığı: 100,0 mL'lik balon jojeye stok-2 metformin HCl standart çözeltisinden 12,0 mL ilave edildi. Hacim çizgisine gelene kadar çözücü eklendi ve kapağı sıkıca kapatıldı. RC 0,45 µm filtreden süzülerek HPLC vialine aktarıldı ve kapağı kapatıldı ($C_{\text{Metformin HCl}}$: 0,06 mg/mL).

Standart 7 (%150) çözeltisi hazırlığı: 100,0 mL'lik balon jojeye stok-2 metformin HCl standart çözeltisinden 8,0 mL ilave edildi. Hacim çizgisine gelene kadar çözücü eklendi ve kapağı sıkıca kapatıldı. RC 0,45 µm filtreden süzülerek HPLC vialine aktarıldı ve kapağı kapatıldı ($C_{\text{Metformin HCl}}$: 0,075 mg/mL).

Kabul kriterleri ve sonuçlar

En küçük kareler yöntemi ile derişime karşı alan grafiğinden regresyon doğrusu çizilir. Korelasyon katsayısı (R) 0,995'dan az olmamalıdır. R² 0,99'dan az olmamalıdır.

$$\frac{Y_{\text{int}}}{\%100'lık\ standart\ alanı} \times 100 \leq \%10,0$$

Öngörülen doğru denklemi: $Y = mX + b$

Y: Alanlar

X: Derişim (mg/mL)

m: Regresyon doğrusunun eğimi

b: Doğrunun Y eksenini kestiği nokta

Metodun geçerli olması için aralığın minimum %10(LOQ) ve maksimum %150 derişimleri aralığında doğrusal olması gerekir.

Uygulama Aralığı

İşlem: Doğrusallık çalışması üst ve alt derişimlerdeki çözeltilerden 6 ölçüm yapıldı ve uygulama aralığı için kullanıldı.

Kabul kriterleri ve sonuçlar: Alt ve üst derişimlerdeki çözeltilerden ardışık 6 enjeksiyonundaki “Sitagliptin Fosfat Monohidrat” piki alanları arasındaki $\%RSD \leq 2,0$ olmalıdır. Alt ve üst derişimlerdeki çözeltilerden ardışık 6 enjeksiyonundaki “Metformin Hidroklorür” piki alanları arasındaki $\%RSD \leq 2,0$ olmalıdır.

Uygulama aralığı parametre sonuçları “Bulgular ve Tartışma” bölümünde verildi.

- Standart çözeltilesindeki “Sitagliptin” pikinin Tailing faktörü 0,8-1,5 arasında olmalıdır.
- Standart çözeltilesindeki “Metformin HCl” pikinin Tailing faktörü 0,8-1,5 arasında olmalıdır.
- Standart çözeltilesindeki “Sitagliptin” pikinin teorik plaka sayısı minimum 2000 olmalıdır.
- Standart çözeltilesindeki “Metformin HCl” pikinin teorik plaka sayısı minimum 2000 olmalıdır.
- Standart çözeltilesindeki “Sitagliptin ve Metformin HCl” pikleri için ayrı ayrı 6 enjeksiyonundan elde edilen $\%RSD$ en fazla % 2,0 olmalıdır.

Sistem uygunluk parametre sonuçları “Bulgular ve Tartışma” bölümünde verildi.

3.2.4 Doğruluk

Tanımlama: Numune çözeltisinin matriks miktarları sabit olacak şekilde, etken madde miktarının %70, %100 ve %130 seviyelerinde sitagliptin fosfat monohidrat ve metformin hidroklorür hammaddesi ilave edilerek her seviye için ayrı 3 paralel numune çözeltisi olacak şekilde toplam 9 numune çözeltisi hazırlanır. Aynı anda hazırlanmış standarda karşı geri kazanım miktarı hesaplanır ve kabul kriterlerine uygunluğu kontrol edilir.

$$\% \text{ Geri Kazanım} = \frac{\text{Deneyisel sonuç}}{\text{Teorik sonuç}} \times 100$$

Çözelti hazırlığı

Blank çözeltisi: Çözücü, 500,0 mL'lik balon jojeye DIW/ACN (80:20, h:h) oranında alınarak karıştırıldı. RC 0,45 µm filtreden süzülerek HPLC vialine aktarıldı ve kapağı kapatıldı.

Stok-1 sitagliptin standart çözeltisi hazırlığı: Yaklaşık 64,3 mg sitagliptin fosfat monohidrat standardı (yaklaşık olarak 50,0 mg sitagliptin) tartılarak, hacmi 100,0 mL olan bir balon jojeye aktarıldı. Çözünmesi için 50,0 mL çözücü ilave edilerek, 5 dakika ultrasonik banyoda tutuldu. Hacim çizgisine gelene kadar çözücü eklendi ve kapağı sıkıca kapatıldı ($C_{\text{Sitagliptin}}$: 0,5 mg/mL).

Stok-2 metformin HCl standart çözeltisi hazırlığı: Yaklaşık 50,0 mg metformin hidroklorür standardı tartılarak, hacmi 100,0 mL olan bir balon jojeye aktarıldı. Çözünmesi için 50,0 mL çözücü ilave edilerek, 5 dakika ultrasonik banyoda tutuldu. Hacim çizgisine gelene kadar çözücü eklendi ve kapağı sıkıca kapatıldı ($C_{\text{Metformin HCl}}$: 0,5 mg/mL).

Standart çözeltisi hazırlığı: İçerisinde 10,0 mL çözücü bulunan 25,0 mL'lik balon joje içerisine 2,5 mL Stok-1 çözeltisinden ve 2,5 mL Stok-2 çözeltisinden eklendi. Hacim çizgisine gelene kadar çözücü eklendi ve kapağı sıkıca kapatıldı. RC 0,45 µm filtreden süzülerek HPLC vialine aktarıldı ve kapağı kapatıldı ($C_{\text{Sitagliptin}}$: 0,05 mg/mL, $C_{\text{Metformin HCl}}$: 0,05 mg/mL).

Stok-1 sitagliptin kontrol standart çözeltisi hazırlığı: Yaklaşık 64,3 mg sitagliptin fosfat monohidrat standardı (yaklaşık olarak 50,0 mg sitagliptin) tartılarak, hacmi 100,0 mL olan bir balon jojeye aktarıldı. Çözünmesi için 50,0 mL çözücü ilave edilerek, 5 dakika ultrasonik banyoda tutuldu. Hacim çizgisine gelene kadar çözücü eklendi ve kapağı sıkıca kapatıldı ($C_{\text{Sitagliptin}}$: 0,5 mg/mL).

Stok-2 metformin HCl kontrol standart çözeltisi hazırlığı: Yaklaşık 50,0 mg metformin hidroklorür standardı tartılarak, hacmi 100,0 mL olan bir balon jojeye aktarıldı. Çözünmesi için 50,0 mL çözücü ilave edilerek, 5 dakika ultrasonik banyoda tutuldu. Hacim çizgisine gelene kadar çözücü eklendi ve kapağı sıkıca kapatıldı ($C_{\text{Metformin HCl}}$: 0,5 mg/mL).

Kontrol standart çözeltisi hazırlığı: İçerisinde 10,0 mL çözücü bulunan 25,0 mL'lik balon joje içerisine 2,5 mL Stok-1 çözeltisinden ve 2,5 mL Stok-2 çözeltisinden eklendi. Hacim çizgisine gelene kadar çözücü eklendi ve kapağı sıkıca kapatıldı. RC 0,45 μm filtreden süzülerek HPLC vialine aktarıldı ve kapağı kapatıldı ($C_{\text{Sitagliptin}}$: 0,05 mg/mL, $C_{\text{Metformin HCl}}$: 0,05 mg/mL).

%70 Standart numune çözeltisi hazırlığı: Yaklaşık 90,0 mg sitagliptin fosfat monohidrat standardı (yaklaşık olarak 70,0 mg sitagliptin) ve 1326,0 mg matriks 200,0 mL'lik balon jojeye tartıldı ve çözünmesi için 100,0 mL çözücü ilave edilerek, 5 dakika ultrasonik banyoda tutuldu. Hacim çizgisine gelene kadar çözücü eklendi. Seyreltik çözeltiden 10,0 mL alınarak 100,0 mL'lik balon jojeye aktarıldı, hacim çizgisine gelene kadar çözücü eklendi ve kapağı sıkıca kapatıldı. RC 0,45 μm filtreden süzülerek HPLC vialine aktarıldı ve kapağı kapatıldı ($C_{\text{Sitagliptin}}$: 0,035 mg/mL).

%100 Standart numune çözeltisi hazırlığı: Yaklaşık 128,5 mg sitagliptin fosfat monohidrat standardı (yaklaşık olarak 100,0 mg sitagliptin) ve 1326,0 mg matriks 200,0 mL'lik balon jojeye tartıldı ve çözünmesi için 100,0 mL çözücü ilave edilerek, 5 dakika ultrasonik banyoda tutuldu. Hacim çizgisine gelene kadar çözücü eklendi. Seyreltik çözeltiden 10,0 mL alınarak 100,0 mL'lik balon jojeye aktarıldı, hacim çizgisine gelene kadar çözücü eklendi ve kapağı sıkıca kapatıldı. RC 0,45 μm filtreden süzülerek HPLC vialine aktarıldı ve kapağı kapatıldı ($C_{\text{Sitagliptin}}$: 0,05 mg/mL).

%130 Standart numune çözeltisi hazırlığı: Yaklaşık 167,1 mg sitagliptin fosfat monohidrat standardı (yaklaşık olarak 130,0 mg sitagliptin) ve 1326,0 mg matriks 200,0 mL’lik balon jojeye tartıldı ve çözünmesi için 100,0 mL çözücü ilave edilerek, 5 dakika ultrosonik banyoda tutuldu. Hacim çizgisine gelene kadar çözücü eklendi. Seyretilik çözeltiden 10,0 mL alınarak 100,0 mL’lik balon jojeye aktarıldı, hacim çizgisine gelene kadar çözücü eklendi ve kapağı sıkıca kapatıldı. RC 0,45 µm filtreden süzülerek HPLC vialine aktarıldı ve kapağı kapatıldı ($C_{\text{Sitagliptin}}$: 0,065 mg/mL).

%70 Standart numune çözeltisi hazırlığı: Yaklaşık 700,0 mg metformin hidroklorür standardı ve 454,0 mg matriks 200,0 mL’lik habalon jojeye tartıldı ve çözünmesi için 100,0 mL çözücü ilave edilerek, 5 dakika ultrosonik banyoda tutuldu. Hacim çizgisine gelene kadar çözücü eklendi ve kapağı sıkıca kapatıldı. Seyretilik çözeltiden 1,0 mL alınarak 100,0 mL’lik balon jojeye aktarıldı, hacim çizgisine gelene kadar çözücü eklendi ve kapağı sıkıca kapatıldı. RC 0,45 µm filtreden süzülerek HPLC vialine aktarıldı ve kapağı kapatıldı ($C_{\text{Metformin HCl}}$: 0,035 mg/mL).

%100 Standart numune çözeltisi hazırlığı: Yaklaşık 1000,0 mg metformin hidroklorür standardı ve 454,0 mg matriks 200,0 mL’lik balon jojeye tartıldı ve çözünmesi için 100,0 mL çözücü ilave edilerek, 5 dakika ultrosonik banyoda tutuldu. Hacim çizgisine gelene kadar çözücü eklendi ve kapağı sıkıca kapatıldı. Seyretilik çözeltiden 1,0 mL alınarak 100,0 mL’lik balon jojeye aktarıldı, hacim çizgisine gelene kadar çözücü eklendi ve kapağı sıkıca kapatıldı. RC 0,45 µm filtreden süzülerek HPLC vialine aktarıldı ve kapağı kapatıldı ($C_{\text{Metformin HCl}}$: 0,05 mg/mL).

%130 Standart numune çözeltisi hazırlığı: Yaklaşık 1300,0 mg metformin hidroklorür standardı ve 454,0 mg matriks 200,0 mL’lik balon jojeye tartıldı ve çözünmesi için 100,0 mL çözücü ilave edilerek, 5 dakika ultrosonik banyoda tutuldu. Hacim çizgisine gelene kadar çözücü eklendi ve kapağı sıkıca kapatıldı. Seyretilik çözeltiden 1,0 mL alınarak 100,0 mL’lik balon jojeye aktarıldı, hacim çizgisine gelene kadar çözücü eklendi ve kapağı sıkıca kapatıldı. RC 0,45 µm filtreden süzülerek HPLC vialine aktarıldı ve kapağı kapatıldı ($C_{\text{Metformin HCl}}$: 0,065 mg/mL).

Kabul kriterleri ve sonuçlar: Doğruluk için aşağıdaki parametreler kabul edilmektedir. Elde edilen sonuçlar “Bulgular ve Tartışma” bölümünde verilmiştir.

- Geri kazanım her bir seviye için %98,0 - %102,0 arasında olmalıdır.
- Geri kazanımın her bir seviye için sonuçları arasındaki $RSD \leq \% 2,0$ olmalıdır.

3.2.5 Kesinlik

Sistem Kesinliği

Tanımlama: Standart çözeltisi metotta belirtildiği şekilde hazırlanır. Standart çözeltisi için ardışık 6 enjeksiyonyapılır. Sistem uygunluk parametreleri kontrol edilir. Sonuçlar, yöntem kesinliği çalışmasından alınmıştır.

Stok-1 sitagliptin standart çözeltisi hazırlığı: Yaklaşık 64,3 mg sitagliptin fosfat monohidrat standardı (yaklaşık olarak 50,0 mg sitagliptin) tartılarak, hacmi 100,0 mL olan bir balon jojeye aktarıldı. Çözünmesi için 50,0 mL çözücü ilave edilerek, 5 dakika ultrasonik banyoda tutuldu. Hacim çizgisine gelene kadar çözücü eklendi ve kapağı sıkıca kapatıldı ($C_{\text{Sitagliptin}}$: 0,5 mg/mL).

Stok-2 metformin HCl standart çözeltisi hazırlığı: Yaklaşık 50,0 mg metformin hidroklorür standardı tartılarak, hacmi 100,0 mL olan bir balon jojeye aktarıldı. Çözünmesi için 50,0 mL çözücü ilave edilerek, 5 dakika ultrasonik banyoda tutuldu. Hacim çizgisine gelene kadar çözücü eklendi ve kapağı sıkıca kapatıldı ($C_{\text{Metformin HCl}}$: 0,5 mg/mL).

Standart çözeltisi hazırlığı: İçerisinde 10,0 mL çözücü bulunan 25,0 mL'lik balon joje içerisine 2,5 mL Stok-1 çözeltisinden ve 2,5 mL Stok-2 çözeltisinden eklendi. Hacim çizgisine gelene kadar çözücü eklendi ve kapağı sıkıca kapatıldı. RC 0,45 μm filtreden süzülerek HPLC vialine aktarıldı ve kapağı kapatıldı ($C_{\text{Sitagliptin}}$: 0,05 mg/mL, $C_{\text{Metformin HCl}}$: 0,05 mg/mL).

Kabul kriterleri ve sonuçlar: Sistem kesinliği için aşağıdaki parametreler kabul edilmektedir. Elde edilen sonuçlar “Bulgular ve Tartışma” bölümünde verilmiştir.

- Standart çözeltisinin ardışık 6 enjeksiyonu arasındaki “Sitagliptin ve Metformin Hidroklorür” pikleri için ayrı ayrı $\%RSD \leq 2,0$ olmalı.

- Standart çözeltisindeki “Sitagliptin ve Metformin Hidroklorür” pikleri için ayrı ayrı kuyruklanma faktörü en fazla 2,0 olmalı.
- Standart çözeltisindeki “Sitagliptin ve Metformin Hidroklorür” pikleri için ayrı ayrı teorik plaka sayısı en az 2000 olmalı.

Yöntem kesinliği

Tanımlama: Sitagliptin/Metformin HCl 100/1000 tablet ürünü kullanılarak yöntem kesinliği çalışması yapılır. Yöntem kesinliği çalışması için metotta belirtildiği standart çözeltisi, kontrol standart çözeltisi ve 6 farklı numune çözeltisi hazırlanır ve analiz edilir. Kabul kriterlerine uygunluğu incelenir.

Çözelti hazırlığı

Blank çözeltisi: Çözücü, 500,0 mL’lik balon jojeye DIW/ACN (80:20, h:h) oranında alınarak karıştırıldı. RC 0,45 µm filtreden süzülerek HPLC vialine aktarıldı ve kapağı kapatıldı.

Stok-1 sitagliptin standart çözeltisi hazırlığı: Yaklaşık 64,3 mg sitagliptin fosfat monohidrat standardı (yaklaşık olarak 50,0 mg sitagliptin) tartılarak, hacmi 100,0 mL olan bir balon jojeye aktarıldı. Çözünmesi için 50,0 mL çözücü ilave edilerek, 5 dakika ultrasonik banyoda tutuldu. Hacim çizgisine gelene kadar çözücü eklendi ve kapağı sıkıca kapatıldı ($C_{\text{Sitagliptin}}$: 0,5 mg/mL).

Stok-2 metformin HCl standart çözeltisi hazırlığı: Yaklaşık 50,0 mg metformin hidroklorür standardı tartılarak, hacmi 100,0 mL olan bir balon jojeye aktarıldı. Çözünmesi için 50,0 mL çözücü ilave edilerek, 5 dakika ultrasonik banyoda tutuldu. Hacim çizgisine gelene kadar çözücü eklendi ve kapağı sıkıca kapatıldı ($C_{\text{Metformin HCl}}$: 0,5 mg/mL).

Standart çözeltisi hazırlığı: İçerisinde 10,0 mL çözücü bulunan 25,0 mL’lik balon joje içerisine 2,5 mL Stok-1 çözeltisinden ve 2,5 mL Stok-2 çözeltisinden eklendi. Hacim çizgisine gelene kadar çözücü eklendi ve kapağı sıkıca kapatıldı. RC 0,45 µm filtreden süzülerek HPLC vialine aktarıldı ve kapağı kapatıldı ($C_{\text{Sitagliptin}}$: 0,05 mg/mL, $C_{\text{Metformin HCl}}$: 0,05 mg/mL).

Numune çözeltisi hazırlığı: Ortalama tablet ağırlığı almak üzere 20 tablet tartıldı. Bu tabletler havanda iyice ezilerek toz karışım haline getirildi. Bu toz karışımdan yaklaşık 145,4 mg tartıldı, (10,0 mg sitagliptin ve 100,0 mg metformin HCl'ye denk) hacmi 25,0 mL olan balon jojeye aktarıldı. Çözünmesi için 5,0 mL çözücü ilave edilerek 5 dakika ultrasonik banyoda tutuldu. Hacim çizgisine gelene kadar çözücü eklendi ve kapağı sıkıca kapatıldı. Bu çözeltiden 2,5 mL alınarak 20,0 mL'lik balon joje içerisine aktarıldı, hacmine çözücüsü ile tamamlanarak sitagliptin numune derişimi hazırlandı. Bu çözeltiden 1,0 mL alınarak 10,0 mL'lik balon jojeye aktarıldı ve hacmine çözücü ile tamamlandığında ise metformin HCl numune derişimi hazırlandı. Hazırlanan bu numune çözeltileri RC 0,45 µm filtrelerden süzülerek HPLC viallerine aktarılır ve kapağı kapatıldı ($C_{\text{Sitagliptin}}$: 0,05 mg/mL, $C_{\text{Metformin HCl}}$: 0,05 mg/mL).

Kabul Kriterleri ve Sonuçlar: Yöntem kesinliği için aşağıdaki parametreler kabul edilmektedir. Elde edilen sonuçlar “Bulgular ve Tartışma” bölümünde verilmiştir.

- Ardışık 6 numunenin analiz sonucunun $RSD \leq 2,0$ olmalıdır,
- Tüm sonuçlar limit içi olmalıdır,
- % 95 güven aralığı hesaplanmalıdır.

$$\text{Güven Aralığı} = \bar{X} \pm t \cdot 2 \cdot \frac{s}{\sqrt{N}} (3,3)$$

$\bar{X}$: Ortalama değer

N : Numunesayısı

s : Standart sapma

t : Güvenilirlik katsayısı

3.2.6 Sağlamlık

Metot stabilitesi

Tanımlama: Metot parametrelerinde akış hızı, ve kolon sıcaklığı değişimi etkisi dikkate alınarak bu değişikliklerin sistem uygunluk parametreleri ve numune sonuçları üzerinde etkisi incelenir.

Akış hızı değişimi etkisi: Akış hızı 0,7 mL/dk iken, 0,6 mL/dk ve 0,8 mL/dk olarak değiştirildi. Çözücü, standart çözeltisi ve numune çözeltisi metotta belirtildiği şekilde hazırlandı ve analiz edildi.

Kolon sıcaklığı değişimi etkisi: Kolon sıcaklığı 40°C iken, 38°C ve 42°C olarak değiştirildi. Çözücü, standart çözeltisi ve numune çözeltisi metotta belirtildiği şekilde hazırlandı ve analiz edildi.

Tampon pH değişimi etkisi: Tampon pH'ı 4,0 iken, pH 3,0 ve pH 5,0 olarak değiştirildi. Çözücü, standart çözeltisi ve numune çözeltisi metotta belirtildiği şekilde hazırlandı ve analiz edildi.

Çözelti hazırlığı

Blank çözeltisi: Çözücü, 1000,0 mL'lik balon jojeye DIW/ACN (80:20, h:h) oranında alınarak karıştırıldı. RC 0,45 µm filtreden süzülerek HPLC vialine aktarıldı ve kapağı kapatıldı.

Stok-1 sitagliptin standart çözeltisi hazırlığı: Yaklaşık 64,3 mg sitagliptin fosfat monohidrat standardı (yaklaşık olarak 50,0 mg sitagliptin) tartılarak, hacmi 100,0 mL olan bir balon jojeye aktarıldı. Çözünmesi için 50,0 mL çözücü ilave edilerek, 5 dakika ultrasonik banyoda tutuldu. Hacim çizgisine gelene kadar çözücü eklendi ve kapağı sıkıca kapatıldı ($C_{\text{Sitagliptin}}$: 0,5 mg/mL).

Stok-2 metformin HCl standart çözeltisi hazırlığı: Yaklaşık 50,0 mg metformin hidroklorür standardı tartılarak, hacmi 100,0 mL olan bir balon jojeye aktarıldı. Çözünmesi için 50,0 mL çözücü ilave edilerek, 5 dakika ultrasonik banyoda tutuldu. Hacim çizgisine gelene kadar çözücü eklendi ve kapağı sıkıca kapatıldı ($C_{\text{Metformin HCl}}$: 0,5 mg/mL).

Standart çözeltisi hazırlığı: İçerisinde 10,0 mL çözücü bulunan 25,0 mL'lik balon joje içerisine 2,5 mL Stok-1 çözeltisinden ve 2,5 mL Stok-2 çözeltisinden eklendi. Hacim

çizgisine gelene kadar çözücü eklendi ve kapağı sıkıca kapatıldı. RC 0,45 µm filtreden süzülerek HPLC vialine aktarıldı ve kapağı kapatıldı ($C_{\text{Sitagliptin}}$: 0,05 mg/mL, $C_{\text{Metformin HCl}}$: 0,05 mg/mL).

Numune çözeltisi hazırlığı: Ortalama tablet ağırlığı almak üzere 20 tablet tartıldı. Bu tabletler havanda iyice ezilerek toz karışım haline getirildi. Bu toz karışımdan yaklaşık 145,4 mg tartıldı, (10,0 mg sitagliptin ve 100,0 mg metformin HCl'ye denk) hacmi 25,0 mL olan balon jojeye aktarıldı. Çözünmesi için 5,0 mL çözücü ilave edilerek 5 dakika ultrasonik banyoda tutuldu. Hacim çizgisine gelene kadar çözücü eklendi ve kapağı sıkıca kapatıldı. Bu çözeltiden 2,5 mL alınarak 20,0 mL'lik balon joje içerisine aktarıldı, hacmine çözücüsü ile tamamlanarak sitagliptin numune derişimi hazırlandı. Bu çözeltiden 1,0 mL alınarak 10,0 mL'lik balon jojeye aktarıldı ve hacmine çözücü ile tamamlandığında ise metformin HCl numune derişimi hazırlandı. Hazırlanan bu numune çözeltileri RC 0,45 µm filtrelerden süzülerek HPLC viallerine aktarılır ve kapağı kapatıldı ($C_{\text{Sitagliptin}}$: 0,05 mg/mL, $C_{\text{Metformin HCl}}$: 0,05 mg/mL).

Kabul kriterleri ve sonuçlar: Sağlamlıkta metot stabilitesi için aşağıdaki parametreler kabul edilmektedir:

- Standart çözeltisinin ardışık 6 enjeksiyonu arasındaki sitagliptin ve metformin hidroklorür pikleri için ayrı ayrı % bağıl standart sapma (%RSD) $\leq$ %2,0 olmalıdır.
- Kontrol standart çözeltisi ile standart çözeltisi arasındaki uyum % 98 - %102 arasında olmalıdır.
- Ara standart çözeltisi ve son standart çözeltisi ile standart çözeltisi arasındaki uyum % 98 - %102 olmalıdır.
- Standart çözeltisindeki sitagliptin ve metformin hidroklorür pikleri için simetri faktörü en fazla 2,0 olmalıdır.
- Standart çözeltisindeki sitagliptin ve metformin hidroklorür pikleri için teorik plaka sayısı (N) en fazla 2000 olmalıdır.

- Sitagliptin ve metformin hidroklorür pikleri arası rezolüsyon (R_s) 1,5'ten büyük olmalıdır.

Sağlamlıkta önemli parametrelerden olan metot stabilitesi için hareketli fazın sürüklenme hızı (0,6 mL/dk, 0,7 mL/dk ve 0,8 mL/dk), kolon fırını sıcaklığı (38 °C, 40 °C ve 42 °C) ve tampon pH değişimi etkisi (3,4 ve 5) parametreleri çalışıldı. Elde edilen sonuçlar “Bulgular ve Tartışma” bölümünde verilmiştir.

Çözelti stabilitesi

Tanımlama: Standart çözeltisi ve Sitagliptin/Metformin HCl 100/1000 tablet için numune çözeltisi hazırlanarak +25°C’ de belli zaman aralıklarında 60 saat boyunca analizlenir ve sonuçlar arasındaki % relatif değişim hesaplanır.

Çözelti hazırlığı

Blank çözeltisi: Çözücü, 500,0 mL’lik hacimsel balona DIW/ACN (80:20, h:h) oranında alınarak karıştırıldı. RC 0,45 µm filtreden süzülerek HPLC vialine aktarıldı ve kapağı kapatıldı.

Stok-1 sitagliptin standart çözeltisi hazırlığı: Yaklaşık 64,3 mg sitagliptin fosfat monohidrat standardı (yaklaşık olarak 50,0 mg sitagliptin) tartılarak, hacmi 100,0 mL olan bir balon jöjeye aktarıldı. Çözünmesi için 50,0 mL çözücü ilave edilerek, 5 dakika ultrasonik banyoda tutuldu. Hacim çizgisine gelene kadar çözücü eklendi ve kapağı sıkıca kapatıldı ($C_{\text{Sitagliptin}}$: 0,5 mg/mL).

Stok-2 metformin HCl standart çözeltisi hazırlığı: Yaklaşık 50,0 mg metformin hidroklorür standardı tartılarak, hacmi 100,0 mL olan bir balon jöjeye aktarıldı. Çözünmesi için 50,0 mL çözücü ilave edilerek, 5 dakika ultrasonik banyoda tutuldu. Hacim çizgisine gelene kadar çözücü eklendi ve kapağı sıkıca kapatıldı ($C_{\text{Metformin HCl}}$: 0,5 mg/mL).

Standart çözeltisi hazırlığı: İçerisinde 10,0 mL çözücü bulunan 25,0 mL’lik balon jöje içerisine 2,5 mL Stok-1 çözeltisinden ve 2,5 mL Stok-2 çözeltisinden eklendi. Hacim çizgisine gelene kadar çözücü eklendi ve kapağı sıkıca kapatıldı. RC 0,45 µm filtreden

süzülerek HPLC vialine aktarıldı ve kapağı kapatıldı ($C_{\text{Sitagliptin}}$: 0,05 mg/mL, $C_{\text{Metformin HCl}}$: 0,05 mg/mL).

Numune çözeltisi hazırlığı: Ortalama tablet ağırlığı almak üzere 20 tablet tartıldı. Bu tabletler havanda iyice ezilerek toz karışım haline getirildi. Bu toz karışımdan yaklaşık 145,4 mg tartıldı, (10,0 mg sitagliptin ve 100,0 mg metformin HCl'ye denk) hacmi 25,0 mL olan balon jojeye aktarıldı. Çözünmesi için 5,0 mL çözücü ilave edilerek 5 dakika ultrasonik banyoda tutuldu. Hacim çizgisine gelene kadar çözücü eklendi ve kapağı sıkıca kapatıldı. Bu çözeltiden 2,5 mL alınarak 20,0 mL'lik balon joje içerisine aktarıldı, hacmine çözücüsü ile tamamlanarak sitagliptin numune derişimi hazırlandı. Bu çözeltiden 1,0 mL alınarak 10,0 mL'lik balon jojeye aktarıldı ve hacmine çözücü ile tamamlandığında ise metformin HCl numune derişimi hazırlandı. Hazırlanan bu numune çözeltileri RC 0,45 µm filtrelerden süzülerek HPLC viallerine aktarılır ve kapağı kapatıldı ($C_{\text{Sitagliptin}}$: 0,05 mg/mL, $C_{\text{Metformin HCl}}$: 0,05 mg/mL).

Kabul kriterleri ve sonuçlar: Sağlamlık çözelti stabilitesi için başlangıç alan değerine göre % relatif değişim %98,0-%102,0 arasında olacağı kabul edilmektedir. Çalışma sonucunda elde edilen veriler “Bulgular ve Tartışma” bölümünde verilmiştir.

3.2.7 Gerçek örnek çalışması

Çözelti hazırlığı

Blank çözeltisi hazırlığı: Çözücü, 500,0 mL'lik hacimsel balona DIW/ACN (80:20, h:h) oranında alınarak karıştırıldı. RC 0,45 µm filtreden süzülerek HPLC vialine aktarıldı ve kapağı kapatıldı.

Stok-1 sitagliptin standart çözeltisi hazırlığı: Yaklaşık 64,3 mg sitagliptin fosfat monohidrat standardı (yaklaşık olarak 50,0 mg sitagliptin) tartılarak, hacmi 100,0 mL olan bir balon jojeye aktarıldı. Çözünmesi için 50,0 mL çözücü ilave edilerek, 5 dakika ultrasonik banyoda tutuldu. Hacim çizgisine gelene kadar çözücü eklendi ve kapağı sıkıca kapatıldı ($C_{\text{Sitagliptin}}$: 0,5 mg/mL).

Stok-2 metformin HCl standart çözeltisi hazırlığı: Yaklaşık 50,0 mg metformin hidroklorür standardı tartılarak, hacmi 100,0 mL olan bir balon jojeye aktarıldı.

Çözünmesi için 50,0 mL çözücü ilave edilerek, 5 dakika ultrasonik banyoda tutuldu. Hacim çizgisine gelene kadar çözücü eklendi ve kapağı sıkıca kapatıldı ($C_{\text{Metformin HCl}}$: 0,5 mg/mL).

Standart çözeltisi hazırlığı: İçerisinde 10,0 mL çözücü bulunan 25,0 mL'lik balon joje içerisine 2,5 mL Stok-1 çözeltisinden ve 2,5 mL Stok-2 çözeltisinden eklendi. Hacim çizgisine gelene kadar çözücü eklendi ve kapağı sıkıca kapatıldı. RC 0,45 µm filtreden süzülerek HPLC vialine aktarıldı ve kapağı kapatıldı ($C_{\text{Sitagliptin}}$: 0,05 mg/mL, $C_{\text{Metformin HCl}}$: 0,05 mg/mL).

Göl suyu ile matriks çözeltisi hazırlığı: İçerisinde 10,0 mL göl suyu bulunan 25,0 mL'lik balon jojeye toz halindeki matriks karışımından 326,0 mg tartılarak balon joje içine ekildi. Çözünmesi için üzerine 5,0 mL ACN ilave edilerek 5 dakika ultrasonik banyoda tutuldu ve hacim çizgisine gelene kadar ultra saf su ile tamamlandı. RC 0,45 µm filtreden süzülerek HPLC vialine aktarılır ve kapağı kapatıldı.

Göl suyu ile numune çözeltisi hazırlığı: Ortalama tablet ağırlığı almak üzere 20 tablet tartıldı. Bu tabletler havanda iyice ezilerek toz karışım haline getirildi. Bu toz karışımdan yaklaşık 145,4 mg tartılarak, (10,0 mg sitagliptin ve 100,0 mg metformin HCl'ye denk) hacmi 25,0 mL olan balon jojeye aktarıldı. Çözünmesi için 5,0 mL çözücü ilave edilerek 5 dakika ultrasonik banyoda tutuldu. Hacim çizgisine gelene kadar çözücüsü ile tamamlandı. Bu çözeltiden 2,5 mL alınarak içerisinde 10,0 mL göl suyu bulunan 20,0 mL'lik balon jojeye ekildi ve hacmine çözücü(blank) ile tamamlanarak sitagliptin numune derişimi hazırlandı. Bu çözeltiden 1,0 mL alınarak içerisinde 5,0 mL göl suyu bulunan 10,0 mL'lik balon jojeye ekildi ve hacmine çözücü(blank) ile tamamlanarak metformin HCl numune derişimi hazırlandı. Hazırlanan bu numune çözeltileri RC 0,45 µm filtrelerden süzülerek HPLC viallerine aktarıldı ve kapağı kapatıldı ($C_{\text{Sitagliptin}}$: 0,05 mg/mL, $C_{\text{Metformin HCl}}$: 0,05 mg/mL).

Elma suyu ile matriks çözeltisi hazırlığı: İçerisinde 10,0 mL elma suyu bulunan 25,0 mL'lik balon jojeye toz halindeki matriks karışımından 326,0 mg tartılarak balon joje içine ekildi. Çözünmesi için üzerine 5,0 mL ACN ilave edilerek 5 dakika ultrasonik banyoda tutuldu ve hacim çizgisine gelene kadar ultra saf su ile tamamlandı. RC 0,45 µm filtreden süzülerek HPLC vialine aktarılır ve kapağı kapatıldı.

Elma suyu ile numune çözeltisi hazırlığı: Ortalama tablet ağırlığı almak üzere 20 tablet tartıldı. Bu tabletler havanda iyice ezilerek toz karışım haline getirildi. Bu toz karışımdan yaklaşık 145,4 mg tartılarak, (10,0 mg sitagliptin ve 100,0 mg metformin HCl'ye denk) hacmi 25,0 mL olan balon jojeye aktarıldı. Çözünmesi için 5,0 mL çözücü ilave edilerek 5 dakika ultrasonik banyoda tutuldu. Hacim çizgisine gelene kadar çözücüsü ile tamamlandı. Bu çözeltiden 2,5 mL alınarak içerisinde 10,0 mL elma suyu bulunan 20,0 mL'lik balon jojeye ekildi ve hacmine çözücü (blank) ile tamamlanarak sitagliptin numune derişimi hazırlandı. Bu çözeltiden 1,0 mL alınarak içerisinde 5,0 mL elma suyu bulunan 10,0 mL'lik balon jojeye ekildi ve hacmine çözücü (blank) ile tamamlanarak metformin HCl numune derişimi hazırlandı. Hazırlanan bu numune çözeltileri RC 0,45 µm filtrelerden süzülerek HPLC viallerine aktarıldı ve kapağı kapatıldı ($C_{\text{Sitagliptin}}$: 0,05 mg/mL, $C_{\text{Metformin HCl}}$: 0,05 mg/mL).

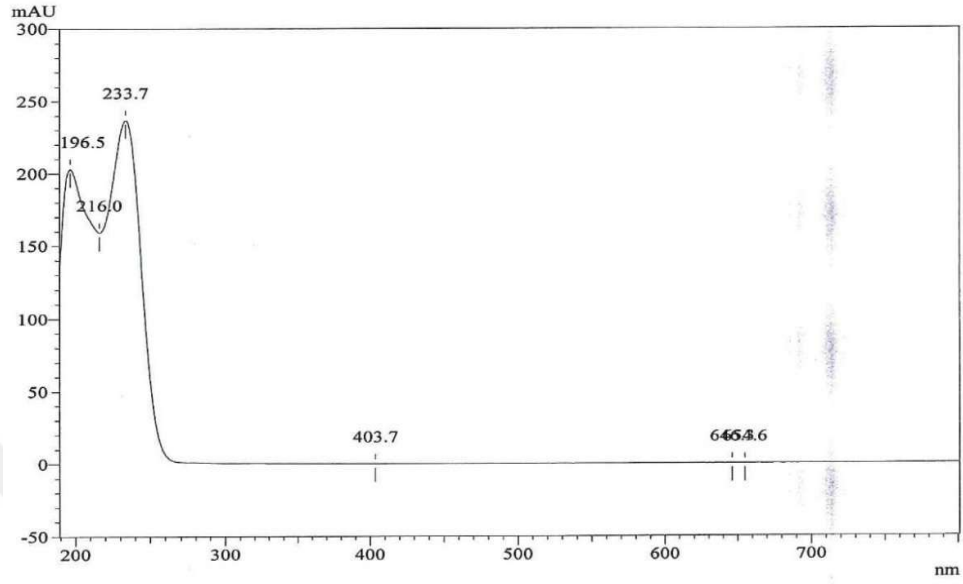
Çalışma sonucunda elde edilen veriler “Bulgular ve Tartışma” bölümünde verilmiştir.

4. BULGULAR VE TARTIŞMA

Çalışmada öncelikle Sitagliptin/Metformin HCl için metot validasyonu ve optimizasyon çalışması yapıldı. HPLC cihazı ile dalga boyu taraması, seçicilik, doğrusallık, doğruluk, kesinlik, sağlamlık, gerçek numune çalışmaları yapıldı. Valide edilen sonuçlar Tablo 3- aralığında, kromatogramlar ise Şekil 3-18 aralığında verilmiştir.

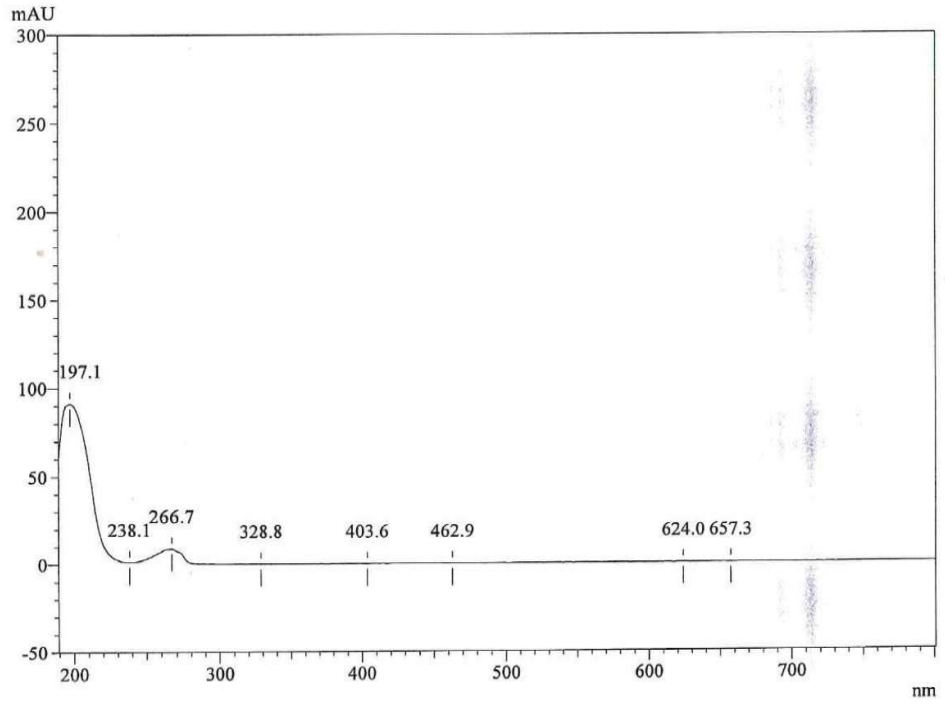
- Seçicilik sonuçları Tablo 4.1’de verilmiştir.
- HPLC’den alınan metformin HCl çözeltisi için dalga boyu taraması için kromatogram Şekil 4.1’de, sitagliptin çözeltisi için dalga boyu taraması kromatogramı Şekil 4.2’de verilmiştir.
- Blank çözeltisi için kromatogram Şekil 4.3’de, matriks çözeltisi için kromatogram Şekil 4.4’te, göl suyu matriksi için kromatogram Şekil 4.5’de, elma suyu matriks çözeltisi kromatogramı Şekil 4.6’da, standart çözeltisi kromatogramı Şekil 4.7’de, metformin HCl numune çözeltisi kromatogramı Şekil 4.8’de, sitagliptin numune çözeltisi kromatogramı Şekil 4.9’da, göl suyu ile hazırlanan numune çözeltisi kromatogramları Şekil 4.10- 4.11’de ve elma suyu ile hazırlanan numune çözeltisi kromatogramları Şekil 4.12- 4.13’de verilmiştir.
- Standart çözeltisi için pik saflığı Şekil 4.14- 4.15’de, numune çözeltisi için pik saflığı Şekil 4.16- 4.17’ de verilmiştir.

Retention Time : 3.355
Compound Name : METFORMIN-HCl
Spectrum Operation : None



Şekil 4. 1. Metformin HCl UV-DAD dalya boyu taraması kromatogramı

Retention Time : 8.905
Compound Name : SITAGLIPTIN
Spectrum Operation : None

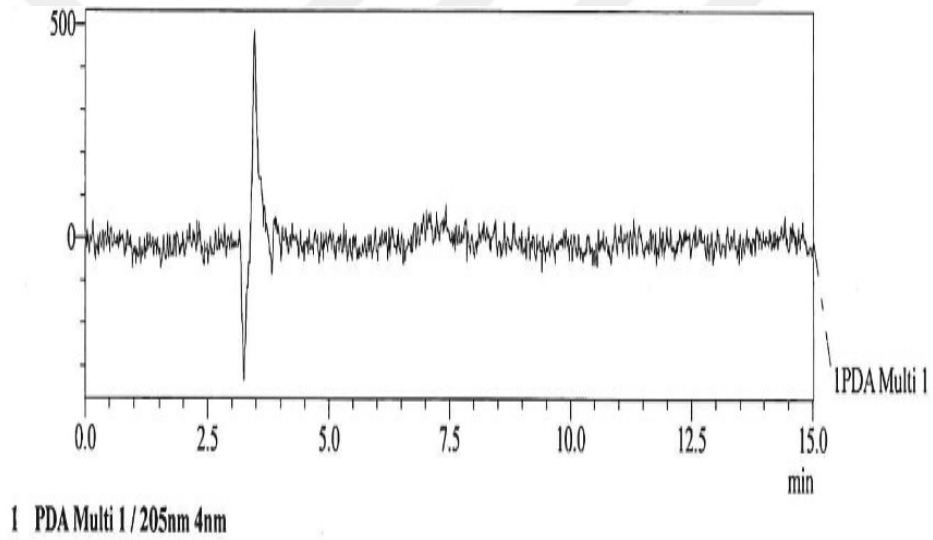


Şekil 4. 2. Sitagliptin UV-DAD dalya boyu taraması kromatogramı

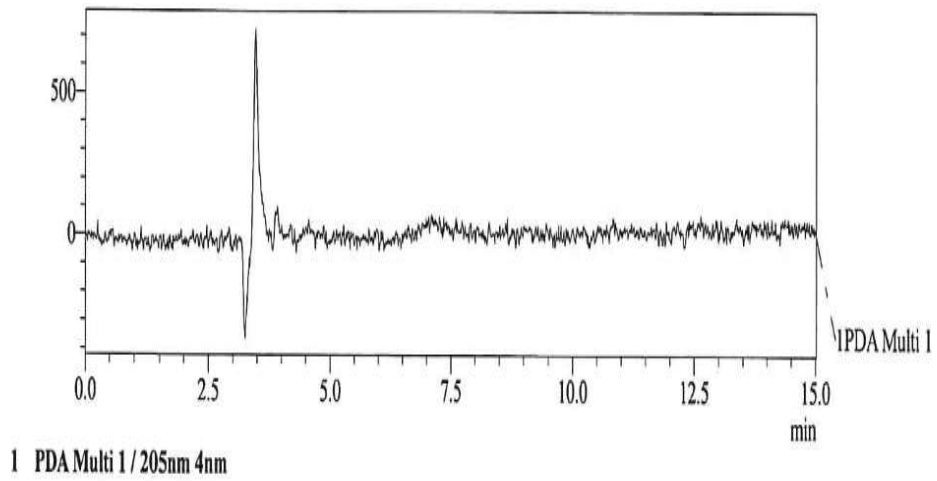
Tablo 4. 1. Seçicilik için veriler

Numune Adı	Alıkonma Zamanı (dk)	Pik Saflığı
Blank	T.E.*	T.E.
Matriks	T.E.	T.E.
Metformin HCl Standart Çözeltisi	3,36	1,000000
Sitagliptin Standart Çözeltisi	8,92	1,000000
Metformin HCl Numune Çözeltisi	3,37	1,000000
Sitagliptin Numune Çözeltisi	8,93	0,999999

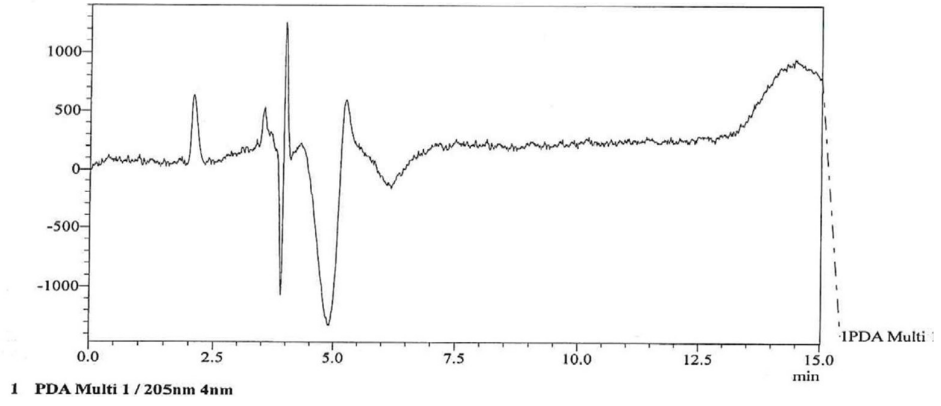
*T.E.: Tespit edilemedi



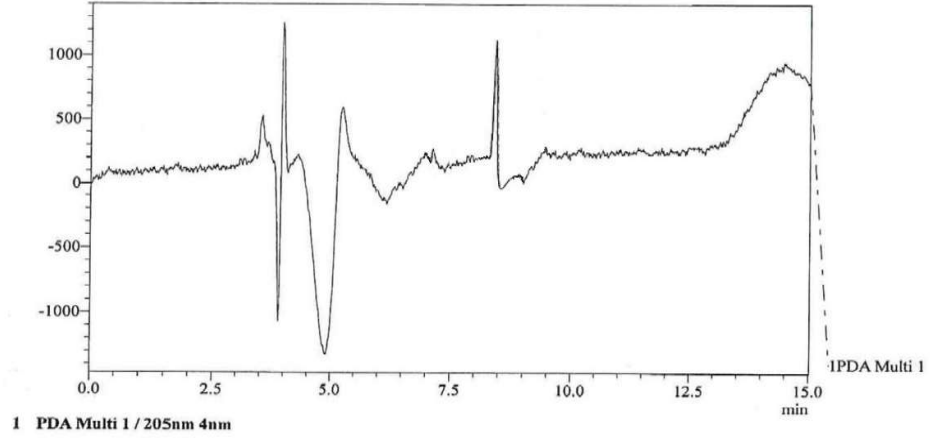
Şekil 4. 3. Blank çözeltisi HPLC kromatogramı



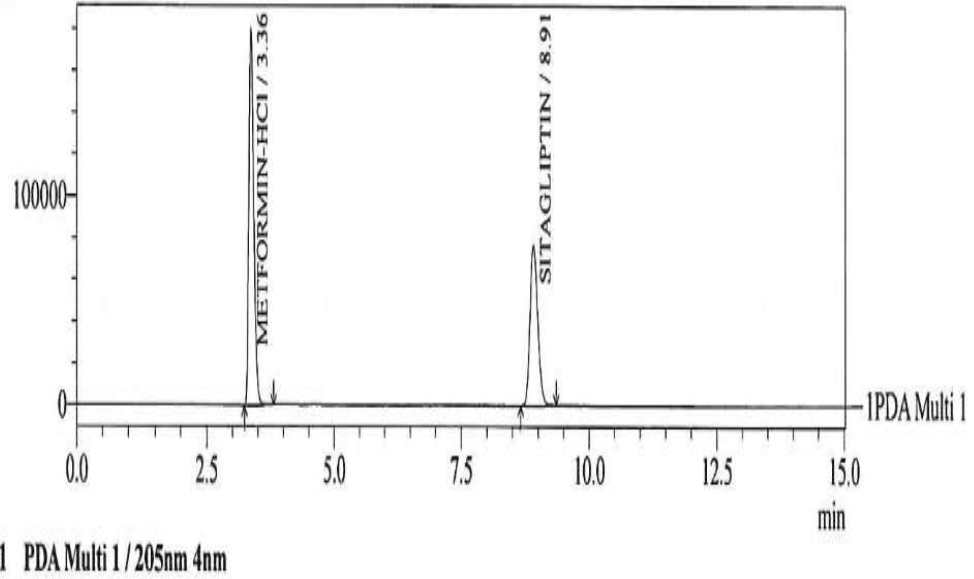
Şekil 4. 4. Matriks çözeltisi HPLC kromatogramı



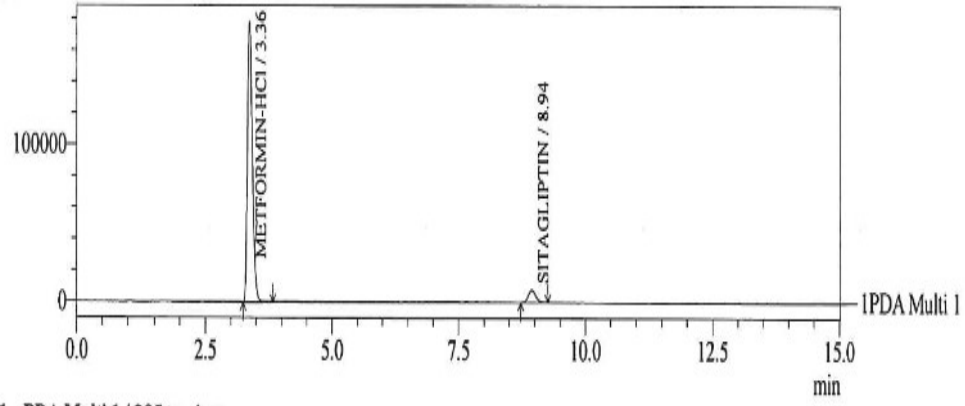
Şekil 4. 5. Göl suyu matris çözeltisi HPLC kromatogramı



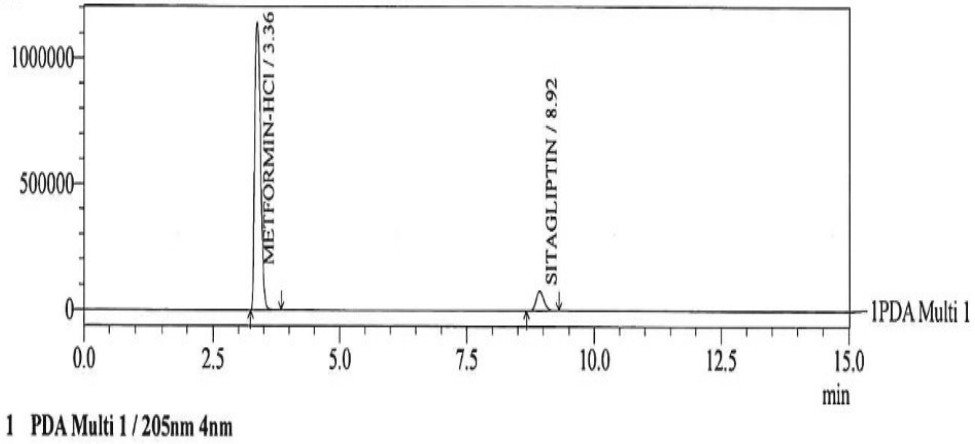
Şekil 4. 6. Elma suyu matris çözeltisi HPLC kromatogramı



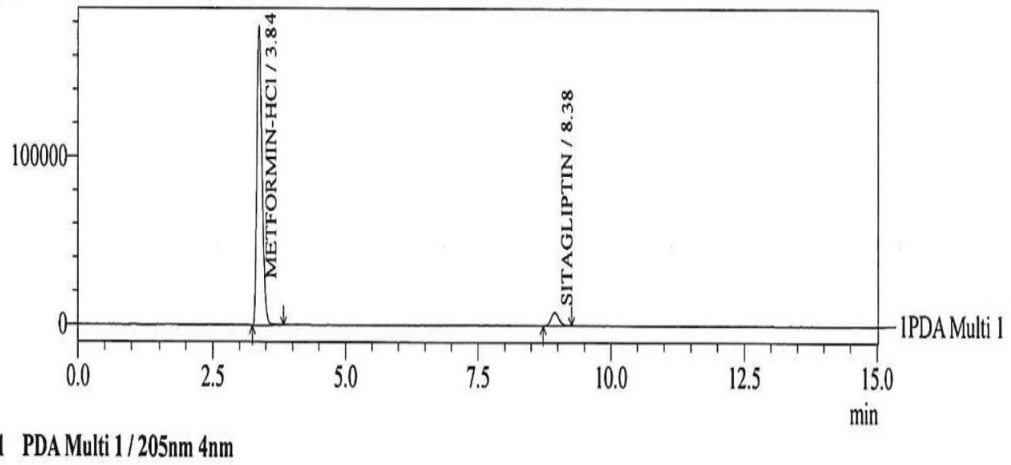
Şekil 4. 7. Standart çözeltisi HPLC kromatogramı



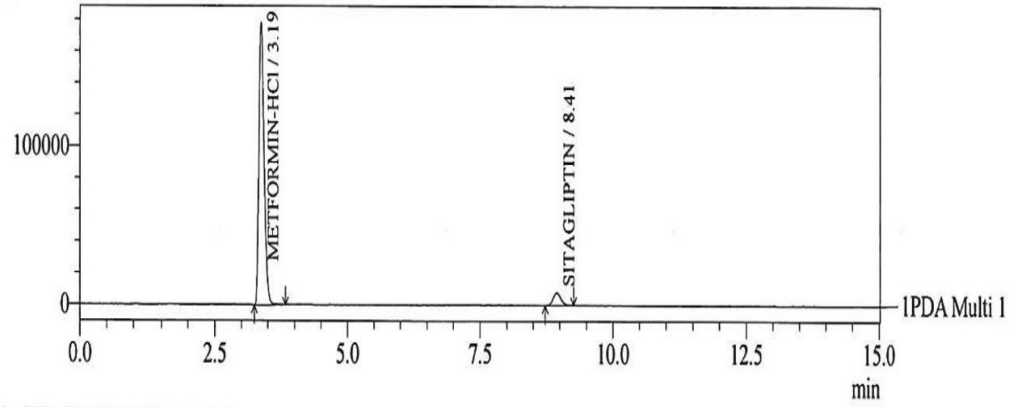
Şekil 4. 8. Metformin HCl numune çözeltisi HPLC kromatogramı



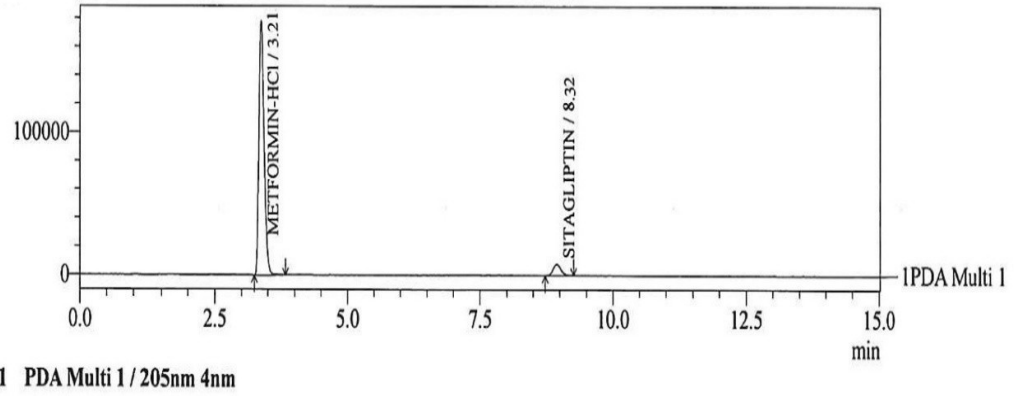
Şekil 4. 9. Sitagliptin numune çözeltisi HPLC kromatogramı



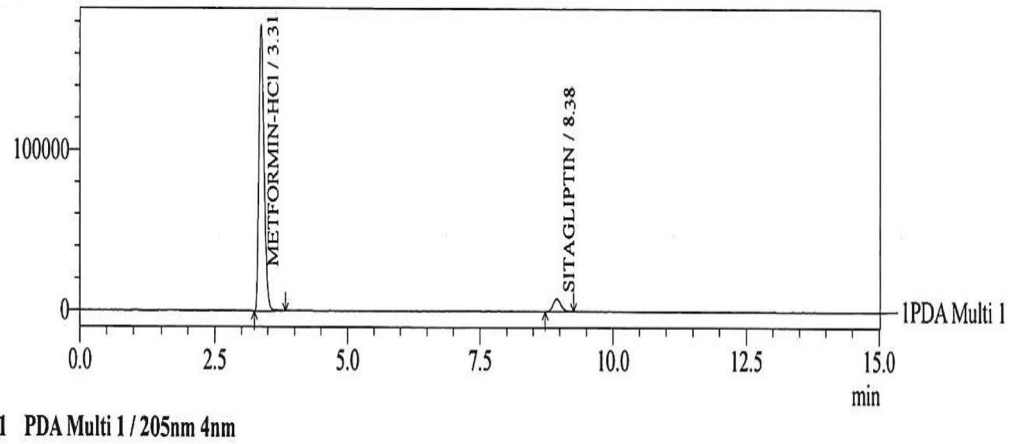
Şekil 4. 10. Göl suyu ile hazırlanan metformin HCl numune çözeltisi HPLC kromatogramı



Şekil 4. 11. Göl suyu ile hazırlanan sitagliptin numune çözeltisi HPLC kromatogramı

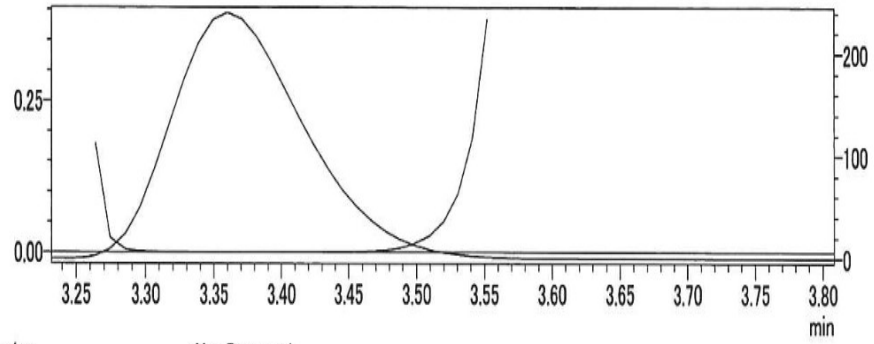


Şekil 4. 12. Elma suyu ile hazırlanan metformin HCl numune çözeltisi HPLC kromatogramı



Şekil 4. 13. Elma suyu ile hazırlanan sitagliptin numune çözeltisi HPLC kromatogramı

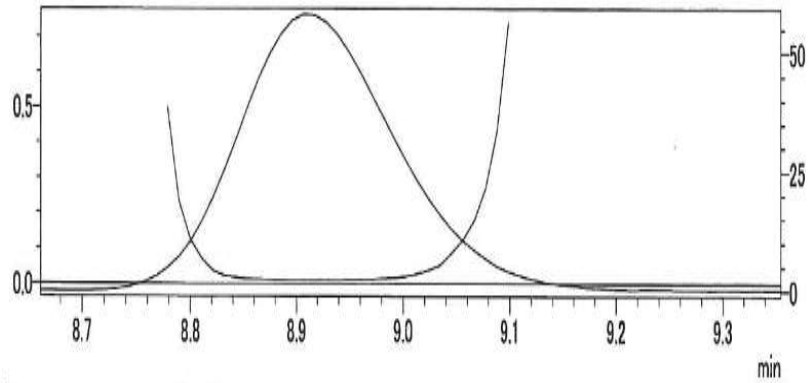
ID# : 1
Retention Time : 3.355
Compound Name : METFORMIN-HCl



Impurity :Not Detected
Peak purity index : 1.000000
Single point threshold : 0.999892
Minimum peak purity index : 108

Şekil 4. 14. Metformin HCl standart çözeltisi pik saflığı

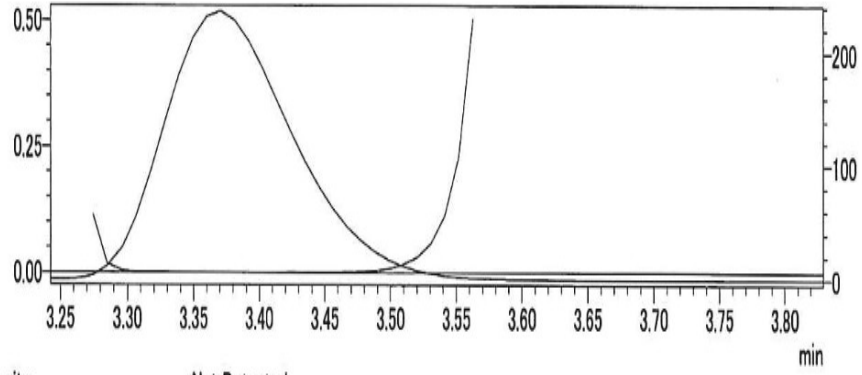
ID# : 2
Retention Time : 8.905
Compound Name : SITAGLIPTIN



Impurity :Not Detected
Peak purity index : 1.000000
Single point threshold : 0.991873
Minimum peak purity index : 8126

Şekil 4. 15. Sitagliptin standart çözeltisi pik saflığı

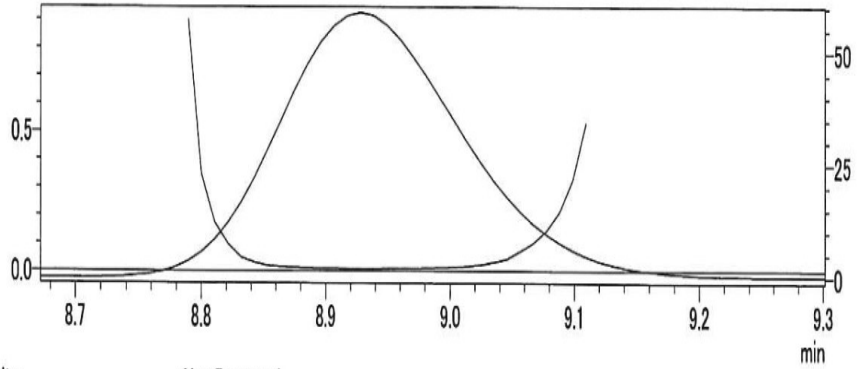
ID# : 1
Retention Time : 3.364
Compound Name : METFORMIN-HCl



Impurity : Not Detected
Peak purity index : 1.000000
Single point threshold : 0.999889
Minimum peak purity index : 110

Şekil 4. 16. Metformin HCl numune çözeltisi pik saflığı

ID# : 2
Retention Time : 8.922
Compound Name : SITAGLIPTIN



Impurity : Not Detected
Peak purity index : 0.999999
Single point threshold : 0.992087
Minimum peak purity index : 7911

Şekil 4. 17. Sitagliptin numune çözeltisi pik saflığı

Metformin HCl ve sitagliptin için sistem uygunluk verileri Tablo 4.2-4.3'te yer almaktadır.

Tablo 4. 2. Metformin HCl için sistem uygunluk verileri

Enjeksiyon Sayısı	Metformin HCl Alanı	Alıkonma zamanı, dk	Teorik plaka sayısı	Kuyruklanma faktörü
1	1248825	3,36	4569	1,45
2	1245936	3,37	4594	1,45
3	1245755	3,36	4478	1,44
4	1246921	3,37	4600	1,44
5	1247535	3,35	4561	1,44
6	1246809	3,36	4543	1,44
Ortalama	1246964	3,36	4558	1,44
Standart sapma	1126	0,008	44	0,004
%RSD	0,090	0,149	0,971	0,186

Tablo 4. 3. Sitagliptin için sistem uygunluk verileri

Enjeksiyon Sayısı	Sitagliptin Alanı	Alıkonma zamanı, dk	Teorik plaka sayısı	Kuyruklanma faktörü
1	805428	8,91	15428	1,25
2	803071	8,92	15503	1,24
3	805122	8,92	1552	1,24
4	805716	8,93	15548	1,24
5	805302	8,92	15519	1,24
6	805203	8,93	15478	1,24
Ortalama	804973	8,92	15505	1,24
Standart sapma	955	0,01	47	0,004
%RSD	0,119	0,097	0,300	0,154

Analiz neticesinde Tablo 4.2 ve 4.3'te sunulan sistem uygunluk verileri değerlendirildiğinde kabul kriterlerine uygun olduğu ve metformin HCl için %RSD 0,090, sitagliptin fosfat monohidrat için 0,119 olduğu belirlenmiştir.

Metformin HCl teorik plaka değeri 4558 ve sitagliptin teorik plaka değeri 15505 olduğu görülmektedir.

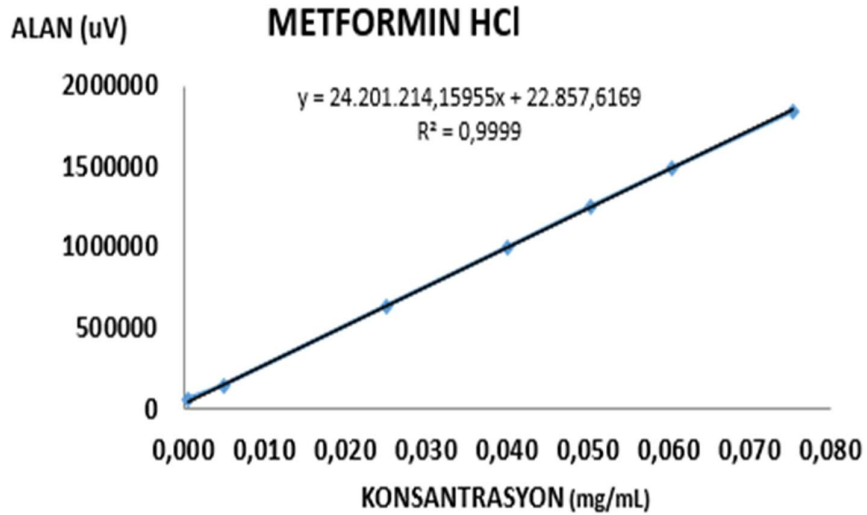
Metformin HCl için Tablo 4.4'te doğrusallık verileri, Şekil 4.18'de ise doğrusallık çalışması kalibrasyon grafiği verilmiştir.

Tablo 4. 4. Metformin HCl için doğrusallık verileri

Standart Derişim Seviyesi (%)	Derişim (mg/mL)	Alan ortalaması (Y-1)	Hesaplanan alan* (Y-2)*	Fark (Y1-Y2)	Farkların karesi (Y1-Y2) ²
1(LOD)	0,000503	54389	35031	19358	374738836
10(LOQ)	0,005020	140875	144348	3473	12059729
50	0,025100	630161	630308	147	21636
80	0,040160	996794	994778	2016	4062734
100	0,050300	1246225	1240179	6046	3655787
120	0,060360	1485551	1483643	1908	3640832
150	0,075450	1842489	1848839	6350	40325361
				RSS**	96668166

*Hesaplanan Alan: Derişim değerlerinin doğru formülünde ($y=mx \pm n$) "x" yerine konulması ile hesaplanan alan değerleridir.

**RSS: Farkların Karesinin Toplamı



Şekil 4. 18. Metformin HCl için doğrusallık çalışması kalibrasyon grafiği

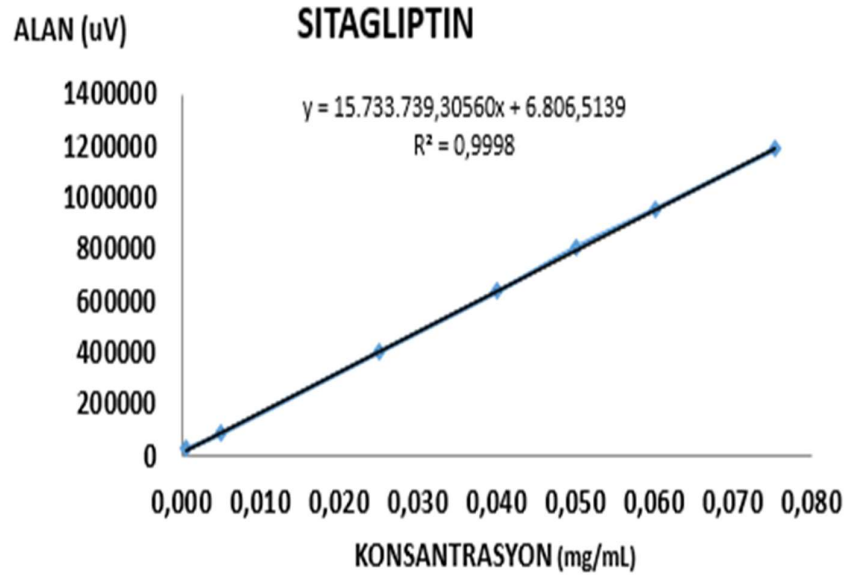
Sitagliptin için doğrusallık verileri Tablo 4.5’de, Şekil 4.19’da ise doğrusallık çalışması kalibrasyon grafiği sunulmuştur.

Tablo 4. 5. Sitagliptin için doğrusallık verileri

Standart Derişim Seviyesi (%)	Derişim (mg/mL)	Alan ortalaması (Y-1)	Hesaplanan alan* (Y-2)*	Fark (Y1-Y2)	Farkların karesi (Y1-Y2) ²
1(LOD)	0,000502	25356	14705	8651	74836713
10(LOQ)	0,005020	84185	85793	1608	2586177
50	0,025101	400408	401740	1332	1773534
80	0,040162	635437	638700	3263	10645063
100	0,050202	807608	79667	10935	119574922
120	0,060242	955978	954646	1332	1773534
150	0,075303	1185542	1191606	6064	36774464
				RSS**	173127694

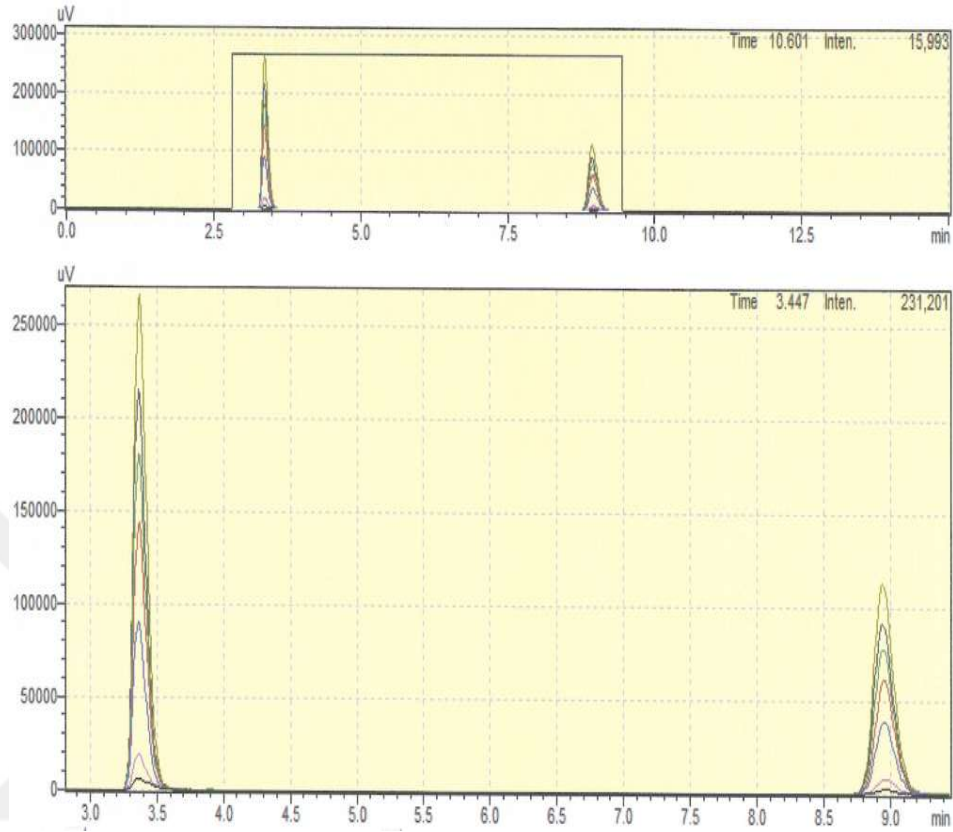
*Hesaplanan Alan: Derişim değerlerinin doğru formülünde ($y=mx \pm n$) “x” yerine konulması ile hesaplanan alan değerleridir.

**RSS: Farkların Karesinin Toplamı



Şekil 4. 19. Sitagliptin için doğrusallık çalışması kalibrasyon grafiği

Doğrusallık çalışması pik çakışması Şekil 4.20’de verilmiştir.



Şekil 4. 20. Doğrusallık çalışması derişim seviyelerinin pik taraması

Doğrusallık kalibrasyon grafiğı Şekil 4.18- 4.19’da, doğrusallık çalışması derişim seviyelerinin pik taraması Şekil 4.20’ de verilmiştir. Doğrusallık için yapılan analizler sonunda, elde edilen veriler kabul kriterlerine uygundur. Sonuç olarak; metformin HCl ve sitagliptin için %10 ve %150 derişim aralığındaki derişime bağılı olarak alan değışiminin doğrusal oldukları kanıtlandı (Şekil 4.18-4.19). Ayrıca doğrusallık parametrelerinden olan korelasyon değıerlerinin metformin HCl için 0,9999 ve sitagliptin için 0,9998 olduğı belirlendi.

Metformin HCl için uygulama aralığı verileri Tablo 4.6’da yer almaktadır.

Tablo 4. 6. Metformin HCl için uygulama aralığı verileri

Enjeksiyon Sayısı	%10 standart Alanı	%150 standart Alanı
1	141501	1840835
2	141970	1844161
3	139327	1840835
4	140674	1842744
5	142204	1843624
6	139575	1842732
Ortalama	140875	1842489
Standart sapma	1223	1391
%RSD	0,868	0,076

Standart çözeltisinde ardışık 6 enjeksiyonundaki Metformin HCl piki alanları arasındaki %RSD $\leq 2,0$ olmalı genel kabulü dikkate alındığında uygulama aralığı Tablo 4.6’da görüldüğü gibi alt ve üst derişim %RSD değerlerinin sırasıyla 0,868 ile 0,076 olduğu hesaplanmıştır. Elde edilen sonuçların kabul kriterlerine uygun olduğu belirlenmiştir.

Sitagliptin için uygulama aralığı verileri Tablo 4.7’de yer almaktadır.

Tablo 4. 7. Sitagliptin için uygulama aralığı verileri

Enjeksiyon Sayısı	%10 standart Alanı	%150 standart Alanı
1	83452	1186987
2	84408	1184720
3	83672	1183813
4	83730	1187094
5	85172	1183666
6	84676	1186970
Ortalama	84185	1185542
Standart sapma	674	1657
%RSD	0,801	0,140

Standart çözeltisinde ardışık 6 enjeksiyonundaki sitagliptin piki alanları arasındaki %RSD $\leq 2,0$ olmalı genel kabulü dikkate alındığında uygulama aralığı Tablo 4.7’de görüldüğü gibi alt ve üst derişim %RSD değerlerinin sırasıyla 0,801 ile 0,140 olduğu hesaplanmıştır. Elde edilen sonuçların kabul kriterlerine uygun olduğu belirlenmiştir.

Metformin HCl için %70, %100, ve %130 derişim aralığındaki numunelerin doğruluk parametresine ait veriler Tablo 4.8’de yer almaktadır.

Tablo 4. 8. Metformin HCl için doğruluk verileri

Seviye	Numune	Teorik derişim mg/mL	Deneyssel derişim mg/mL	%Geri kazanım	% ortalama	%RSD
%70	1	0,03461	0,03442	99,5		
	2	0,03455	0,03456	100,0	99,7	0,29
	3	0,03458	0,03447	99,7		
%100	1	0,04937	0,04891	99,1		
	2	0,04934	0,04888	99,0	99,0	0,06
	3	0,04936	0,04885	99,0		
%130	1	0,06417	0,06464	100,7		
	2	0,06413	0,06467	100,9	100,9	0,13
	3	0,06415	0,06479	101,0		

Numune çözeltilerinin matriks miktarları sabit olacak şekilde, etken madde miktarlarının %70, %100 ve %130 seviyelerinde metformin HCl hammaddesi ilave edildiğı zaman Tablo 4.8’de görüldüğü gibi geri kazanım değerleri %99,0-%101,0 arasında, %RSD değerleri ise %0,06-%0,29 arasında elde edilmiştir. Elde edilen sonuçların kabul kriterlerine uygunluğu belirlenmiştir.

Sitagliptin için %70, %100, ve %130 derişim aralığındaki numunelerin doğruluk parametresine ait veriler Tablo 4.9’da yer almaktadır.

Tablo 4. 9.Sitaglipin için doğruluk verileri

Seviye	Numune	Teorik derişim mg/mL	Deneyisel derişim mg/mL	%Geri kazanım	% ortalama	%RSD
%70	1	0,03380	0,03353	98,9		
	2	0,03391	0,03347	98,7	98,7	0,16
	3	0,03395	0,03348	98,6		
%100	1	0,04846	0,04901	101,1		
	2	0,04946	0,04894	101,0	101,1	0,10
	3	0,04942	0,04899	101,2		
%130	1	0,06312	0,06368	100,9		
	2	0,06289	0,06352	101,0	100,8	0,19
	3	0,06304	0,06343	100,6		

Numune çözeltilerinin matriks miktarları sabit olacak şekilde, etken madde miktarlarının %70, %100 ve %130 seviyelerinde Sitagliptin hammaddesi ilave edildiği zaman Tablo 4.9’da sunulduğu üzere geri kazanım değerleri %98,6-%101,2 arasında, %RSD değerleri ise %0,10-%0,19 arasında elde edilmiştir. Elde edilen sonuçların kabul kriterlerine uygunluğu belirlenmiştir.

Kesinlikte, sistem kesinliği, yöntem kesinliği ve laboratuvar için kesinlik parametreleri incelendi. Sistem kesinliği verileri Tablo 4.10- 4.11’de yer almaktadır.

Tablo 4. 10. Metformin HCl için sistem kesinliği verileri

Enjeksiyon sayısı	Metformin HCl standart çözeltisi alanı
1	1248825
2	1245936
3	1245755
4	1246921
5	1247535
6	1246809
Ortalama	1246964
Standart sapma	1126
%RSD	0,090

Metformin HCl için sistem kesinliğinde 6 enjeksiyonundan sonra %RSD değeri %0,090; kuyruklanma faktörü 1,44; teorik plaka sayısı 4558 bulunmuştur. Elde edilen sonuçların kabul kriterlerine uygun olduğu belirlenmiştir.

Tablo 4. 11. Sitagliptin için sistem kesinliği verileri

Enjeksiyon sayısı	Sitagliptin standart çözeltisi alanı
1	805428
2	803071
3	805122
4	805716
5	805302
6	805203
Ortalama	804973
Standart sapma	955
%RSD	0,119

Sitagliptin için sistem kesinliğinde 6 enjeksiyonundan sonra %RSD değeri %0,119; kuyruklanma faktörü 1,24; teorik plaka sayısı 15505 bulunmuştur. Elde edilen sonuçların kabul kriterlerine uygun olduğu belirlenmiştir.

Etken maddesinin yöntem kesinliği ve laboratuvar içi kesinlik verileri Tablo 4.12-4.14’de yer almaktadır.

Tablo 4. 12. Metformin HCl için yöntem kesinliği ve laboratuvar içi kesinlik verileri

Numune Enjeksiyon sayısı	1.Analizci Metformin HCl(%)	2.Analizci Metformin HC(%)
1	99,050	98,523
2	98,725	98,498
3	98,781	99,245
4	98,715	99,763
5	98,773	98,196
6	98,896	99,933
Ortalama	98,824	99,026
Standart sapma	0,150	0,726
%RSD	0,152	0,733
%95Güven aralığı	98,824±0,16	99,026±0,76

Yöntem kesinliğinde ve laboratuvar içi kesinlikte güven aralığı hesaplanırken 6 analiz için serbestlik derecesi 5 (N-1), t değeri 2,571’dir. Standart sapma değeri ile %95 güven sınırı değerleri hesaplandıktan sonra ortalama olan değerler ile güven aralığı belirlenmiştir. Sonuçlar Tablo 4.12’de gösterilmiştir. Yöntem kesinliği için yapılan

analizlerin sonucunda %RSD değeri 0,152 olarak bulunmuş ve elde edilen sonuçlar kabul kriterlerine uygun bulunmuştur.

Ayrıca numune için yapılan farklı iki analizci sonuçlarından elde edilen veriler Tablo 4.13'te yer almaktadır.

Tablo 4. 13. Metformin HCl için iki analizci sonuçları arasındaki fark

Analizci	Metformin HCl(%)
1.Analizci	98,824
2.Analizci	99,026
%Fark	0,202

Tablo 4. 14. Sitagliptin için yöntem kesinliği ve laboratuvar içi kesinlik verileri

Numune Enjeksiyon sayısı	1.Analizci Sitagliptin(%)	2.Analizci Sitagliptin(%)
1	101,622	101,214
2	102,301	100,998
3	101,678	101,563
4	101,692	10,367
5	101,771	101,789
6	101,810	101,287
Ortalama	101,812	101,370
Standart sapma	0,308	0,277
%RSD	0,303	0,273
%95Güven aralığı	101,812±0,32	101,370±0,29

Yöntem kesinliğinde ve laboratuvar içi kesinlikte güven aralığı hesaplanırken 6 analiz için serbestlik derecesi 5 (N-1), t değeri 2,571'dir. Standart sapma değeri ile %95 güven sınırı değerleri hesaplandıktan sonra ortalama olan değerler ile güven aralığı belirlenmiştir. Sonuçlar Tablo 4.14'te gösterilmiştir. Yöntem kesinliği için yapılan analizlerin sonucunda %RSD değeri 0,303 olarak bulunmuş ve elde edilen sonuçlar kabul kriterlerine uygun bulunmuştur.

Numune için yapılan farklı iki analizci sonuçlarından elde edilen veriler Tablo 4.15'de yer almaktadır.

Tablo 4. 15. Sitagliptin için iki analizci sonuçları arasındaki fark

Analizci	Sitagliptin(%)
1.Analizci	101,812
2.Analizci	101,370
%Fark	0,422

Sağlamlık metot stabilitesi ve çözelti stabilitesi çalışmalarını içeren validasyon parametresidir. Metot stabilitesi için elde edilen verileri içeren Tablo 4.16-4.25 aralığında yer almaktadır ve kromatogramlar Şekil 21- 22’de verilmektedir.

Tablo 4. 16. Metformin HCl standardı için akış hızı değişimi sağlamlık verileri

Akış Hızı mL/dk	Alıkonma zamanı,dk	Alanlar Arası,%RSD	Kuyruklanma faktörü	Teorik plaka sayısı	Alan	Değişim Yüzdesi (%)
0,6	3,92	0,135	1,51	4271	1532432	23
0,7*	3,36	0,090	1,44	4558	1246964	-
0,8	2,95	0,022	1,52	3857	1151291	8

*Başlangıç koşulu olarak kesinlik çalışmasının sonuçları alınmıştır.

Tablo 4. 17. Metformin HCl numunesi için akış hızı değişimi sağlamlık verileri

Akış Hızı mL/dk	Alıkonma zamanı,dk	Alanlar Arası,%RSD	Kuyruklanma faktörü	Teorik plaka sayısı	Alan	Değişim Yüzdesi (%)
0,6	3,92	0,297	1,45	4690	1435359	17
0,7*	3,36	0,140	1,44	4566	1229706	-
0,8	2,95	0,261	1,46	4276	1094252	11

*Başlangıç koşulu olarak kesinlik çalışmasının sonuçları alınmıştır.

Tablo 4. 18. Sitagliptin standardı için akış hızı değişimi sağlamlık verileri

Akış Hızı mL/dk	Alıkonma zamanı,dk	Alanlar Arası,%RSD	Kuyruklanma faktörü	Teorik plaka sayısı	Alan	Değişim Yüzdesi (%)
0,6	10,64	0,119	1,24	17391	93098	16
0,7*	8,92	0,119	1,24	15505	804973	-
0,8	7,92	0,035	1,24	15585	700245	13

*Başlangıç koşulu olarak kesinlik çalışmasının sonuçları alınmıştır.

Tablo 4. 19. Sitagliptin numunesi için akış hızı değişimi sağlamlık verileri

Akış Hızı mL/dk	Alıkonma zamanı,dk	Alanlar Arası,%RSD	Kuyruklanma faktörü	Teorik plaka sayısı	Alan	Değişim Yüzdesi (%)
0,6	10,63	0,006	1,24	17146	957004	17
0,7*	8,93	0,061	1,24	15531	818710	-
0,8	7,92	0,079	1,24	15474	719010	12

*Başlangıç koşulu olarak kesinlik çalışmasının sonuçları alınmıştır.

Tablo 4. 20. Metformin HCl standardı için kolon fırını sıcaklık değişimi sağlamlık verileri

Kolon Fırını Sıcaklığı	Alıkonma zamanı,dk	Alanlar Arası,%RSD	Kuyruklanma faktörü	Teorik plaka sayısı	Alan	Değişim Yüzdesi (%)
38°C	3,37	0,176	1,51	4126	1316077	6
40°C *	3,36	0,090	1,44	4558	1246964	-
42°C	3,35	0,228	1,50	4936	1207840	3

*Başlangıç koşulu olarak kesinlik çalışmasının sonuçları alınmıştır.

Tablo 4. 21. Metformin HCl numunesi için kolon fırını sıcaklık değişimi sağlamlık verileri

Kolon Fırını Sıcaklığı	Alıkonma zamanı,dk	Alanlar Arası,%RSD	Kuyruklanma faktörü	Teorik plaka sayısı	Alan	Değişim Yüzdesi (%)
38°C	3,37	0,329	1,45	4565	1232636	0,24
40°C *	3,36	0,140	1,44	4566	1229706	-
42°C	3,37	0,053	1,44	4620	1224732	0,40

*Başlangıç koşulu olarak kesinlik çalışmasının sonuçları alınmıştır.

Tablo 4. 22. Sitagliptin standardı için kolon fırını sıcaklık değişimi sağlamlık verileri

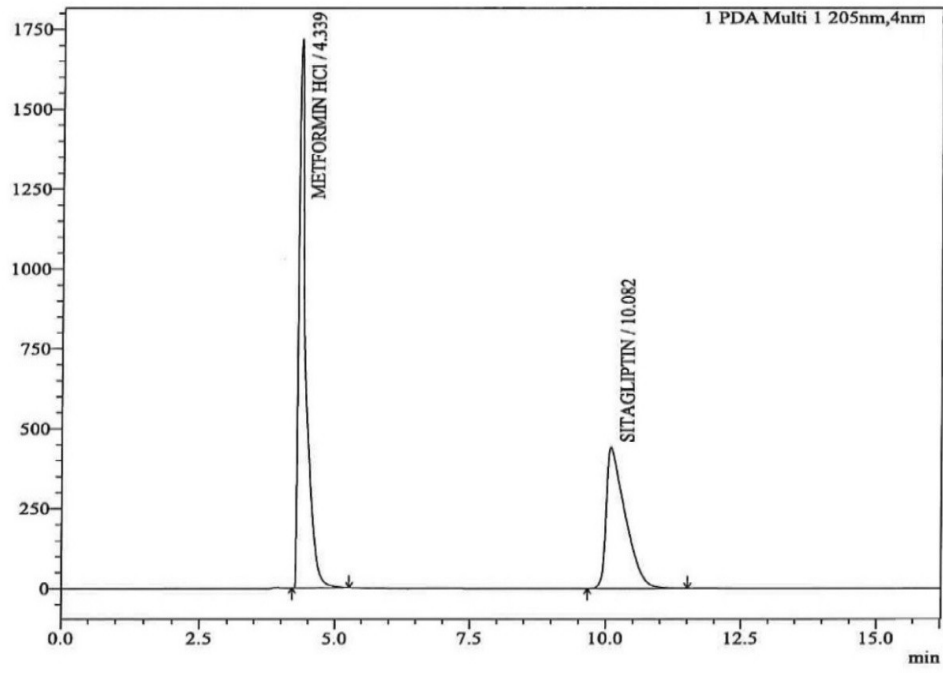
Kolon Fırını Sıcaklığı	Alıkonma zamanı,dk	Alanlar Arası,%RSD	Kuyruklanma faktörü	Teorik plaka sayısı	Alan	Değişim Yüzdesi (%)
38°C	9,18	0,345	1,24	16348	812467	0,93
40°C *	8,92	0,119	1,24	15505	804973	-
42°C	8,99	0,126	1,25	16340	818371	1,66

*Başlangıç koşulu olarak kesinlik çalışmasının sonuçları alınmıştır.

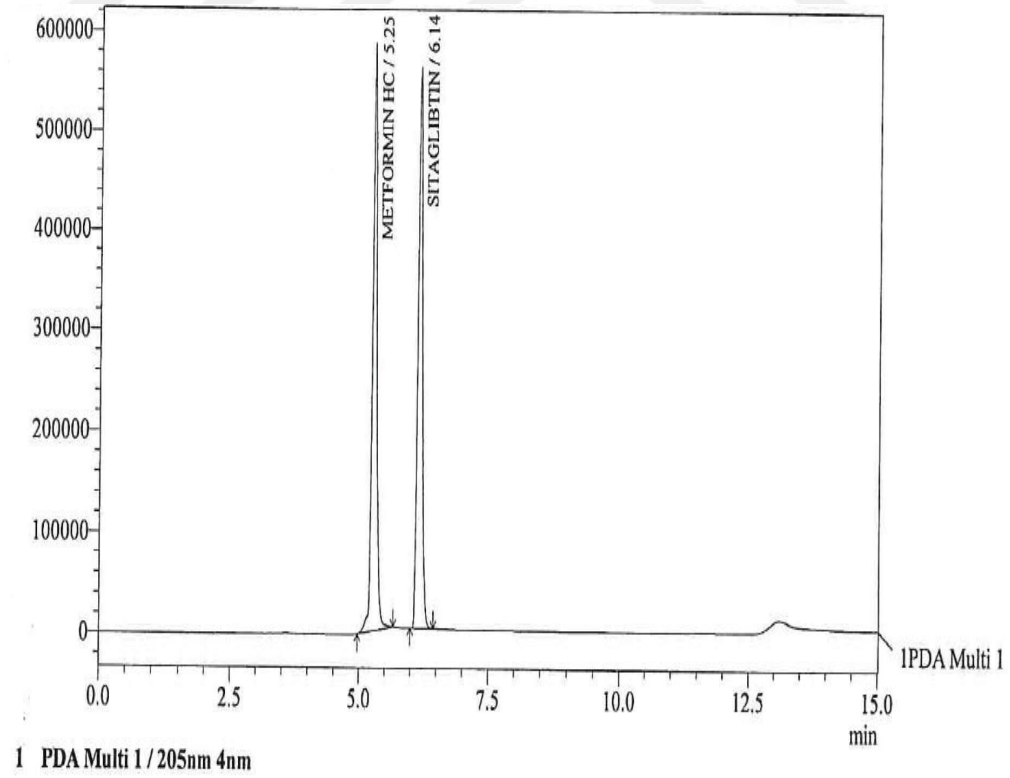
Tablo 4. 23. Sitagliptin numunesi için kolon fırını sıcaklık değişimi sağlamlık verileri

Kolon Fırını Sıcaklığı	Alıkonma zamanı,dk	Alanlar Arası,%RSD	Kuyruklanma faktörü	Teorik plaka sayısı	Alan	Değişim Yüzdesi (%)
38°C	9,18	0,299	1,24	16547	821574	0,35
40°C *	8,93	0,061	1,24	15531	818710	-
42°C	8,99	0,113	1,25	16710	818859	0,02

*Başlangıç koşulu olarak kesinlik çalışmasının sonuçları alınmıştır.



Şekil 4. 21. pH 5 tamponu ile çalışılan analiz kromatogramı



Şekil 4. 22. pH 3 tamponu ile çalışılan analiz kromatogramı

Tablo 4. 24. Metformin HCl için çözelti stabilitesi verileri

Zaman	Standart çözeltisi		Numune çözeltisi	
	Alan	% Fark	Alan	% Fark
Başlangıç	1247475	-	1231780	-
4.Saat	1247898	0,03	1233932	0,17
8.Saat	1249019	0,12	1235737	0,32
12.Saat	1246973	0,04	1238811	0,57
24.Saat	1253388	0,47	1241384	0,78
36.Saat	1252721	0,42	1242227	0,85
48.Saat	1257919	0,84	1250667	1,53
60.Saat	1259715	0,98	1251603	1,61

Tablo 4. 25. Sitagliptin için çözelti stabilitesi verileri

Zaman	Standart çözeltisi		Numune çözeltisi	
	Alan	% Fark	Alan	% Fark
Başlangıç	805523	-	82144	-
4.Saat	806582	0,13	82185	0,05
8.Saat	808116	0,32	82613	0,57
12.Saat	807106	0,20	82006	0,17
24.Saat	810376	0,60	83212	1,30
36.Saat	808533	0,37	83050	1,10
48.Saat	810871	0,66	83344	1,46
60.Saat	812334	0,85	83682	1,87

Sağlamlık; çözelti stabilitesindeki elde edilen sonuçlara istinaden, 25°C’de standart çözeltisi ve numune çözeltisi 60 saat stabildir.

Gerçek örnek çalışma verileri Tablo 4.26- 4.27’de verilmiştir.

Tablo 4. 26. Metformin HCl için gerçek örnek verileri

Numune enjeksiyon sayısı	Göl suyu matriksinde Metformin HCl (%)	Elma suyu matriksinde Metformin HCl (%)
1	99,319	96,137
2	99,807	97,172
3	98,423	97,498
4	98,893	96,897
5	98,959	97,432
6	98,172	96,763
Ortalama	98,929	96,983
Standart sapma	0,592	0,505
%RSD	0,599	0,520
%95Güven aralığı	98,929±1,39	96,983±1,19

Tablo 4. 27. Sitagliptin için gerçek örnek verileri

Numune Enjeksiyon sayısı	Göl suyu matriksinde Sitagliptin(%)	Elma suyu matriksinde Sitagliptin(%)
1	98,436	95,792
2	99,349	96,314
3	99,172	97,697
4	97,982	96,146
5	98,148	97,587
6	97,837	96,823
Ortalama	98,487	96,727
Standart sapma	0,634	0,784
%RSD	0,643	0,810
%95Güven aralığı	98,487±1,49	96,727±1,84

Etken maddeler için HPLC’de uygulanan optimum kromatografik koşullar Tablo 4.28’de sunulmuştur.

Tablo 4. 28. Sitagliptin/Metformin HCl 100/1000 tablet için HPLC’de uygulanan optimum kromatografik koşullar

Paremetreler	Analitik Koşullar
Dedektör	:Tek boylu veya değiştirilebilir dalga boylu DAD/UV Dedektör
Pompa	:Dörtlü gradient pompa/İzokratik Akış
Kolon	:Phenomenex Kinetex EVO C18
Kolon Tipi	:C18
Kolon Uzunluğu	:250 mm
Kolon Partikül Boyutu	:5 µm
Kolon Çapı	:4,6 mm
Kolon Fırın Sıcaklığı	:40°C
Numune Bölme Sıcaklığı	:25°C
Çalışma Dalga Boyu	:205 nm
Enjeksiyon Hacmi	:5 µL
Akış Hızı	:0,7 mL/dakika
Analiz Süresi	:15 dakika

5. SONUÇ VE ÖNERİLER

Sitagliptin ve metformin HCl etkin bir tip II diyabet ilacı etken maddesidir. Bu çalışmada, Tip II diyabet ilacı olarak kullanılan sitagliptin ve metformin HCl etken maddesinin HPLC-PDA-UV’de miktar tayini metot validasyonu, geliştirilmesi yapıldı.

Çalışmada, sitagliptin/metformin HCl 100/1000 mg tablet ürünü için miktar tayini metot validasyonunda yüksek doğruluk, yüksek kesinlik (sistem kesinliği, yöntem kesinliği ve laboratuvar içi kesinlik), seçici, hızlı, düşük relatif standart sapmaların yüzdesi sağlandı. Ayrıca, doğrusallık, doğruluk, çalışma aralığı, sağlamlık ve gerçek örnek çalışma parametreleri çalışılarak kabul kriterlerine uygunluğu kanıtlandı. Çalışmada ICH kabul kriteri sağlandı.

Seçicilik çalışmasında piklerin tanımlanabilmesi için blank, matriks, standart ve tablet numunesi çözeltisi HPLC’de analiz edildi ve her birinden gelen kromatogramdaki pikler tespit edildi. Seçicilik sonuçlarının ICH kabul kriterlerine uyduğu, elde edilen kromatogramlardaki sitagliptin ve metformin HCl piklerinin ayrı tutunma zamanında çıktığı kromatogramlar sayesinde belirlendi. Ayrıca, sitagliptin ve metformin HCl piklerinde pik saflığı değerleri için alınan UV spektrumunda seçicilik ve tanımlama sağlandı.

ICH kabul kriterine göre sitagliptin ve metformin HCl için sistem uygunluk sonuçları ve yöntem kesinliği için 6 enjeksiyon yapıldı. Sistem uygunluk sonuçlarında %RSD değerlerinin sitagliptin için 0,090 metformin HCl için 0,119 olduğu bulundu. %10(LOQ)-%150 derişim aralığında sitagliptin standardı ve metformin HCl standardı ile kalibrasyon grafikleri çizildi ve korelasyon değeri metformin HCl için 0,9999 ve sitagliptin için ise 0,9998 olarak tespit edilip belirlendi. Metformin HCl ve sitagliptin için %10(LOQ) ve %150 derişimli standart çözeltileri için 6’şar enjeksiyon verilerek alt ve üst derişim %RSD değerlerinin sırasıyla %0,868 ile %0,076 olduğu, Sitagliptin için %0,801 ile %0,140 olduğu ve derişimlerdeki “%RSD $\leq$ 2,0 olmalı ICH kabul kriteri” sağladığı da kanıtlandı. Ayrıca, numune çözeltisinin matriks miktarı sabit olacak şekilde, etken madde miktarının %70, %100 ve %130 derişimlerde metformin

HCl etken maddesi ilave edildiğinde geri kazanım değerleri %99,0-%101,0 arasında, %RSD değerleri ise %0,06-%0,29 arasında olduğu ve sitagliptin etken maddesi ilave edildiğinde geri kazanım değerleri %98,6-%101,2 arasında, %RSD değerleri ise %0,10-%0,19 arasında olduğu bulundu. Doğruluk için elde edilen kabul kriterler sonuçları ICH kabul kriterlerine uygundu.

Sitagliptin/metformin HCl 100/1000 mg tablet ürünü kullanılarak yapılan kesinlik çalışmasında sistem kesinliği, yöntem kesinliği ve laboratuvar içi kesinlik çalışmaları yapıldı. Sistem kesinliğinde ICH kabul kriterlerine göre yapılan 6 enjeksiyondan sonra metformin HCl'den elde edilen %RSD değeri %0,090; kuyruklanma faktörü 1,44; teorik plaka sayısı 4558 olarak bulundu ve sitagliptinden elde edilen %RSD değeri ise 0,119; kuyruklanma faktörü 1,24; teorik plaka sayısı 15505 olarak bulundu. Bulunan sonuçlar neticesinde elde edilen veriler ICH kabul kriterlerine uygundu.

Yöntem kesinliği ve laboratuvar içi kesinlikte sitagliptin/metformin HCl 100/1000 mg tablet numunesi için yapılan farklı iki analizci sonucu arasında elde edilen veriler %95 güven sınırında güven aralığı belirlendi. Yöntem kesinliği için yapılan analizler bizlere metformin HCl için sonuç olarak %RSD değeri %0,152 olarak, sitagliptin için ise %RSD değeri %0,303 bulunduğunu gösterdi ve elde edilen sonuçların kabul kriterlerine uygunluğu tespit edildi. Ardışık analizlerin sonuçlarının %RSD $\leq$ 2,0 ve iki farklı analizcinin sonuçlarının ortalamaları hesaplandığında aralarındaki fark % 1'den küçük olduğu belirlendi.

Sağlamlık validasyon parametresinde, çözelti ve metot stabilitesi çalışmaları yapıldı. Metot stabilitesinde akış hızı ve kolon fırını sıcaklığı değişimi etkisi dikkate alınarak yapılan çalışmaların sonucunda, elde edilen sonuçların ICH kabul kriterlerine uygunluğu gözlemlendi. Çözelti stabilitesinde 25°C' de standart çözelti ve numune çözeltisinin 60 saat stabil olduğu başlangıçtan itibaren her 4 saatte bir aynı vialdeki numuneyi HPLC cihazında okutarak kromotogramdaki alanların Relatif değişimleri sonucunda varıldı.

Gerçek örnek çalışmasında sitagliptin/metformin HCl 100/1000 mg tablet için yapılan analizler sonucu elde edilen verilerin %95 güven aralığında olduğu belirlendi ve bulunan sonuçlar neticesinde elde edilen veriler ICH kabul kriterlerine uygundu.

Sonuç olarak; bu metot, sitagliptin/metformin HCl 100/1000 mg tablet numunesi kullanılacak bir miktar tayini metot validasyonunda tanıma (UV) ve tanıma (DAD) için uygun olduğu kanıtlandı.



KAYNAKÇA

- [1] American Diabetes Association. (2011). Standards of medical care in diabetes—2011. *Diabetes care*, 34(Supplement_1), S11-S61..
- [2] Magliano, D. J., Boyko, E. J., & Atlas, I. D. (2021). What is diabetes?. In *IDF DIABETES ATLAS* [Internet]. 10th edition. International Diabetes Federation.
- [3] Wang, S., Zhang, L., Jin, Z., Wang, Y., Zhang, B., & Zhao, L. (2023). Visualizing temporal dynamics and research trends of macrophage-related diabetes studies between 2000 and 2022: a bibliometric analysis. *Frontiers in Immunology*, 14, 1194738.
- [4] ElSayed, N. A., Aleppo, G., Bannuru, R. R., Bruemmer, D., Collins, B. S., Ekhlaspour, L., ... & American Diabetes Association Professional Practice Committee. (2024). 9. Pharmacologic Approaches to Glycemic Treatment: Standards of Care in Diabetes—2024. *Diabetes Care*, 47.
- [5] Nelson, S. E. (2011). Management of patients with type 2 diabetes. *Current medical research and opinion*, 27(10), 1931-1947.
- [6] Shaw, J. E., Sicree, R. A., & Zimmet, P. Z. (2010). Global estimates of the prevalence of diabetes for 2010 and 2030. *Diabetes research and clinical practice*, 87(1), 4-14.
- [7] Yang, M. (2023). *Public Health Data Analysis: Diabetes*. Public Health.
- [8] World Health Organization. (2024). *Guidance on global monitoring for diabetes prevention and control: framework, indicators and application*. World Health Organization.
- [9] Canha, D., McMahon, V., Schmitz, S., De Beaufort, C., Alzaid, F., Reznik, Y., ... & Aguayo, G. A. (2025). The effect of automated insulin delivery system use on diabetes distress in people with type 1 diabetes and their caregivers: A systematic review and meta-analysis. *Diabetic Medicine*, 42(4), e15503.
- [10] ElSayed, N. A., Aleppo, G., Bannuru, R. R., Bruemmer, D., Collins, B. S., Ekhlaspour, L., ... & American Diabetes Association Professional Practice Committee. (2024). 15. Management of Diabetes in Pregnancy: Standards of Care in Diabetes—2024. *Diabetes Care*, 47.
- [11] DeFronzo, R. A. (2009). From the triumvirate to the ominous octet: a new paradigm for the treatment of type 2 diabetes mellitus. *diabetes*, 58(4), 773-795..
- [12] Cho, N. H., Shaw, J. E., Karuranga, S., Huang, Y., da Rocha Fernandes, J. D., Ohlrogge, A. W., & Malanda, B. I. D. F. (2018). *IDF Diabetes Atlas: Global estimates of diabetes prevalence for 2017 and projections for 2045*. *Diabetes research and clinical practice*, 138, 271-281.
- [13] Drake, T., Landsteiner, A., Langsetmo, L., MacDonald, R., Anthony, M., Kalinowski, C., ... & Wilt, T. J. (2024). Newer pharmacologic treatments in adults with type 2 diabetes: a systematic review and network meta-analysis for the American College of Physicians. *Annals of internal medicine*, 177(5), 618-632.
- [14] Maruthur, N. M., Tseng, E., Hutfless, S., Wilson, L. M., Suarez-Cuervo, C., Berger, Z., ... & Bolen, S. (2016). Diabetes medications as monotherapy or metformin-based combination therapy for type 2 diabetes: a systematic review and meta-analysis. *Annals of internal medicine*, 164(11), 740-751.
- [15] Magliano, D. J., & Boyko, E. J. (2021). *IDF Diabetes Atlas 10th edition scientific committee*. *IDF DIABETES ATLAS* [Internet]. 10th ed. Brussels: International Diabetes Federation, 35914061.
- [16] Rena, G., Hardie, D. G., & Pearson, E. R. (2017). The mechanisms of action of metformin. *Diabetologia*, 60(9), 1577-1585.

- [17] Ahren, B. (2007). DPP-4 inhibitors. *Best Practice & Research Clinical Endocrinology & Metabolism*, 21(4), 517-533.
- [18] Gallwitz, B. (2019). Clinical use of DPP-4 inhibitors. *Frontiers in endocrinology*, 10, 389.
- [19] Helen, W., & Bhavya, E. (2021). A Prospective Study on Effectiveness of Sitagliptin on Glycemic Control, Blood Pressure and Serum Lipid Profile Levels in Type-II Diabetes Mellitus. *Annals of the Romanian Society for Cell Biology*, 25(5), 3585-3592.
- [20] Parihar, R. (2020). QUANTITATIVE STRUCTURE-ACTIVITY RELATIONSHIP STUDIES ON ANTIDIABETIC AGENTS (Doctoral dissertation, University of Kota, Kota).
- [21] Thornberry, N. A., & Weber, A. E. (2007). Discovery of JANUVIA™(Sitagliptin), a Selective Dipeptidyl Peptidase IV Inhibitor for the Treatment of Type2 Diabetes. *Current topics in medicinal chemistry*, 7(6), 557-568.
- [22] Bosi, E., Lucotti, P., Setola, E., Monti, L., & Piatti, P. M. (2008). Incretin-based therapies in type 2 diabetes: A review of clinical results. *diabetes research and clinical practice*, 82, S102-S107.
- [23] Deacon, C. F. (2011). Dipeptidyl peptidase-4 inhibitors in the treatment of type 2 diabetes: a comparative review. *Diabetes, Obesity and Metabolism*, 13(1), 7-18.
- [24] Gallwitz, B. (2007). Sitagliptin: profile of a novel DPP-4 inhibitor for the treatment of type 2 diabetes. *Drugs Today*, 43(1), 13-25..
- [25] Zhao, J. Y., Wang, H. P., Wang, H. J., Yao, J. M., Wu, X. Y., Dong, J. J., & Liao, L. (2016). Efficacy and safety of sitagliptin in patients with type 2 diabetes mellitus: A meta-analysis. *Int. J. Clin. Exp. Med*, 9, 11202-11210.
- [26] Brunton, L. L., Dandan-Hilal, R., & Knollmann, B. C. (2018). Goodman&Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics Ed 13th. McGrawHill Educ.
- [27] Rojas, L. B. A., & Gomes, M. B. (2013). Metformin: an old but still the best treatment for type 2 diabetes. *Diabetology & metabolic syndrome*, 5, 1-15.
- [28] Ismail, G. A. (2024). Analisis Determinan Komplikasi Pada Pasien Diabetes Mellitus Tipe 2 Di Rumah Sakit Aloi Saboe Kota Gorontalo (Doctoral dissertation, Universitas Hasanuddin).
- [29] Davies, M. J., D'Alessio, D. A., Fradkin, J., Kernan, W. N., Mathieu, C., Mingrone, G., ... & Buse, J. B. (2018). Management of hyperglycemia in type 2 diabetes, 2018. A consensus report by the American Diabetes Association (ADA) and the European Association for the Study of Diabetes (EASD). *Diabetes care*, 41(12), 2669.
- [30] Rojas, L. B. A., & Gomes, M. B. (2013). Metformin: an old but still the best treatment for type 2 diabetes. *Diabetology & metabolic syndrome*, 5, 1-15.
- [31] Radziuk, J., Bailey, C. J., Wiernsperger, N. F., & Yudkin, J. S. (2003). Metformin and its liver targets in the treatment of type 2 diabetes. *Current Drug Targets-Immune, Endocrine & Metabolic Disorders*, 3(2), 151-169.
- [32] Rena, G., Hardie, D. G., & Pearson, E. R. (2017). The mechanisms of action of metformin. *Diabetologia*, 60(9), 1577-1585.
- [33] Ghadge, A. A., & Kuvalekar, A. A. (2017). Controversy of oral hypoglycemic agents in type 2 diabetes mellitus: novel move towards combination therapies. *Diabetes & Metabolic Syndrome: Clinical Research & Reviews*, 11, S5-S13.
- [34] American Diabetes Association. (2020). 6. Glycemic targets: standards of medical care in diabetes—2020. *Diabetes care*, 43(Supplement_1), S66-S76.
- [35] Drucker, D. J. (2006). The biology of incretin hormones. *Cell metabolism*, 3(3), 153-165.

- [36] Ahren, B. (2007). DPP-4 inhibitors. *Best Practice & Research Clinical Endocrinology & Metabolism*, 21(4), 517-533.
- [37] Holst, J. J. (2007). The physiology of glucagon-like peptide 1. *Physiological reviews*.
- [38] Charbonnel, B., Karasik, A., Liu, J., Wu, M., Meininger, G., & Sitagliptin Study 020 Group. (2006). Efficacy and safety of the dipeptidyl peptidase-4 inhibitor sitagliptin added to ongoing metformin therapy in patients with type 2 diabetes inadequately controlled with metformin alone. *Diabetes care*, 29(12), 2638-2643.
- [39] Bhende, S. D., Varanasi, M. B., Abbulu, K., Swetha, M. D., Shravanthi, V., Kumari, J. K., & Shayamala, T. (2012). RP-HPLC method for the simultaneous estimation of sitagliptin phosphate and metformin hydrochloride in combined tablet dosage forms. *Oriental Journal of Chemistry*, 28(1), 463.
- [40] Peraman, R., Gowra, C. S., Reddy, Y. P., & Peruru, K. K. (2013). Stability-indicating RP-HPLC method for simultaneous determination of metformin hydrochloride and sitagliptin phosphate in dosage forms. *Chromatographia*, 76(17), 1153-1162.
- [41] Kadam, G. M., Puyad, A. L., Kalyankar, T. M., & Kshirsagar, R. V. (2021). Reverse Phase Chromatographic Method of Analysis for Assay and Content Uniformity Estimation of Drug Sitagliptin, Metformin and Empagliflozin from Available Marketed Formulation. *Oriental Journal of Chemistry*, 37(4).
- [42] Karimulla, S. K., Vasanth, P. M., Ramesh, T., & Ramesh, M. (2013). Method development and validation of sitagliptin and metformin using reverse phase HPLC method in bulk and tablet dosage form. *Der Pharmacia Lettre*, 5(5), 168-174.
- [43] Sankar, A. S. K., Sythana, S., Jhansi, A., Shanmugasundharam, P., & Aumithra, M. J. I. J. P. T. R. (2013). Development and validation for simultaneous estimation of sitagliptin and metformin in pharmaceutical dosage form using RP-HPLC method. *Int J Pharm Tech Res*, 5(4), 1736-1744.
- [44] Hammash, L., Bitar, Y., & Trefi, S. (2019). Novel Ion Pair HPLC Methods for the Assessment of Sitagliptin and Pioglitazone in Tablets. *Research journal of pharmacy and technology*, 12(8), 3713-3719.
- [45] Sahoo, P. K., Sharma, R., & Chaturvedi, S. C. (2008). Simultaneous estimation of metformin hydrochloride and pioglitazone hydrochloride by RPHPLC method from combined tablet dosage form. *Indian journal of pharmaceutical sciences*, 70(3), 383.
- [46] Himabindu, T., Narmadha, S., Sireesha, D., & Vasudha, B. (2016). Development and validation of spectrophotometric method for the simultaneous estimation of metformin hydrochloride and sitagliptin phosphate in tablet dosage form. *World Journal of Pharmaceutical Research*, 5(7), 1011-1018.
- [47] Bhende, S. D., Varanasi, M. B., Abbulu, K., Swetha, M. D., Shravanthi, V., Kumari, J. K., & Shayamala, T. (2012). RP-HPLC method for the simultaneous estimation of sitagliptin phosphate and metformin hydrochloride in combined tablet dosage forms. *Oriental Journal of Chemistry*, 28(1), 463.
- [48] Guideline, I. H. T. (2005). Validation of analytical procedures: text and methodology. Q2 (R1), 1(20), 05.
- [49] Riley, C. M., & Nguyen, K. L. (Eds.). (2024). *Specification of drug substances and products: development and validation of analytical methods*. Elsevier.
- [50] Guideline, I. H. T. (2022). *Validation of analytical procedures Q2 (R2)*. ICH: Geneva, Switzerland.
- [51] World Health Organization. (2024). *WHO Expert Committee on Specifications for Pharmaceutical Preparations: fifty-seventh report*. World Health Organization.