



Farklı Matrislerde Pioglitazon ve Metforminin Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografi Yöntemleri ile Nicel Analizine Yönelik Güncel Yaklaşımlar

Muhammed Mirza YILDIZ¹, Doç. Dr. Tuğrul Çağrı AKMAN¹

¹ Erzincan Binali Yıldırım Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi, Analitik Kimya ABD, Erzincan, Türkiye.

Geliş Tarihi: 31.10.2025

Kabul Tarihi: 19.11.2025

Yayın Tarihi: 25.12.2025

ÖZET

Bu derlemede, diyabet tedavisinde yaygın olarak kullanılan metformin ve pioglitazonun nicel analizinde uygulanan yüksek performanslı sıvı kromatografisi (HPLC) yöntemleri kapsamlı biçimde değerlendirilmiştir. Farklı biyolojik ve farmasötik matrislerde gerçekleştirilen HPLC çalışmalarında kullanılan kolon tipleri, mobil faz bileşimleri, dedektör ayarları, örnek hazırlama prosedürleri ve validasyon parametreleri karşılaştırılmıştır. İncelenen yöntemlerde duyarlılık, seçicilik, doğruluk, kesinlik, doğrusal aralık, LOD ve LOQ değerleri ayrıntılı olarak analiz edilmiş; bu parametreler üzerinden en uygun kromatografik şartların belirlenmesine yönelik güncel yaklaşımlar tartışılmıştır. Derleme, metformin ve pioglitazonun doğru ve güvenilir kantitatif tayini için literatürde önerilen HPLC yöntemlerini bir araya getirerek araştırmacılara kapsamlı bir kaynak sunmayı amaçlamaktadır.

Anahtar Kelimeler: Analitik Kimya, HPLC, Metformin, Pioglitazon

Current Approaches to Quantitative Analysis of Pioglitazone and Metformin in Different Matrices by High-Performance Liquid Chromatography Methods

ABSTRACT

This review comprehensively evaluates high-performance liquid chromatography (HPLC) methods applied to the quantitative analysis of metformin and pioglitazone, commonly used in diabetes treatment. Column types, mobile phase compositions, detector settings, sample preparation procedures, and validation parameters used in HPLC studies performed on different biological and pharmaceutical matrices are compared. Sensitivity, selectivity, accuracy, precision, linear range, LOD, and LOQ values of the reviewed methods are analyzed in detail, and current approaches to determining the most appropriate chromatographic conditions based on these parameters are discussed. This review aims to provide researchers with a comprehensive resource by bringing together HPLC methods recommended in the literature for the accurate and reliable quantitative determination of metformin and pioglitazone.

Keywords: Analytical Chemistry, HPLC, Metformin, Pioglitazone

Sorumlu Yazar : Tuğrul Çağrı AKMAN, Erzincan Binali Yıldırım Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi, Analitik Kimya ABD, Erzincan, Türkiye.

E-mail: eczacagri87@gmail.com

Bu makaleye atf yapmak için : Yıldız, M. M., Akman, T. Ç. (2025). Farklı Matrislerde Pioglitazon ve Metforminin Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografi Yöntemleri ile Nicel Analizine Yönelik Güncel Yaklaşımlar. *Erzincan Binali Yıldırım Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Dergisi*, 2(4), 1-30.

1. GİRİŞ

Diyabet, sıklıkla karşılaşılan ve yüksek ölüm oranına sahip bir hastalıktır. Pankreasın beta hücrelerinin tahrip olması sonucu, pankreastan insülin salgılanamamasına veya insüline karşı direnç gelişmesine bağlı olarak insülin görevini yapamaz ve sonuç olarak hastalık yüksek glikoz seviyesi ile karakterize olur. Vakaların büyük çoğunluğunu insüline bağımlı olmayan (Tip 2) diyabet oluşturur (Antar ve ark., 2023).

Diyabet hastalığının tedavisinde hedef glikoz seviyesini azaltmak veya korumaktır. Bu amaçla hastaya ilk olarak, egzersiz ve diyet başta olmak üzere yaşam tarzında değişiklikler önerilir. Glikoz düzeyi, bu tavsiyeler ile düzenlenmiyorsa hastaya oral antidiyabetik ajan kullanması önerilir. Diyabet tedavisinde kullanılan antidiyabetik ilaçların farklı biyolojik sıvılardaki miktarları, ilaçların farmakokinetik parametrelerinin, biyoyararlanımının, tedavi etkinliğinin takibi açısından son zamanlarda önem kazanmıştır (Tomic ve ark., 2022).

İlaç analizlerinde analitik kimya oldukça önemli bir yere sahiptir. İlaçların hem kalitatif hem de kantitatif analizlerinde, araştırmacılar tarafından sıklıkla kullanılır. İlaç analizlerinde sonuçların doğruluğu ve güvenilirliği validasyon parametrelerinin incelenmesi ile kontrol edilir. Bu sebeple yöntemin geliştirilmesi kadar yöntemin validasyonu da büyük önem taşımaktadır (Görög, 2008).

Kromatografik yöntemler ilaç analizlerinde başvurulan analitik yöntemler arasındadır. Burada yüksek performanslı sıvı kromatografisi (HPLC), numunelerin kalitatif ve kantitatif analizlerinde oldukça önemli bir yere sahiptir. İlaç analizleri, biyokimyasal analizler, gıda analizleri, adli tıp analizleri, toksikoloji analizleri, klinik biyokimya analizleri ve endüstriyel analizler gibi birçok alanda kullanılmaktadır (Snyder ve ark., 2012).

Bu çalışmada, diyabet tedavisinde kullanılan metformin ve pioglitazonun kantitatif tayini için literatürde yer alan HPLC yöntemleri araştırılarak bir araya toplanmış ve çalışmalara geniş bir pencereden bakılmıştır. Böylece, farmasötik preparatlarda ve farklı matrislerde metformin ve pioglitazonun kantitatif tayini için en uygun kromatografik şartların belirlenmesi hedeflenmiştir.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Diyabet ve Antidiyabetik İlaçlar

Dünyada yüksek insidansa ve mortalite oranına sahip olan diyabet hastalığı, insanların yaşam kalitesini etkileyen bir halk sağlığı sorunudur. Yüksek glikoz seviyesiyle karakterize olan

diyabet, insülin üretiminden sorumlu pankreas beta hücrelerinin tahrip olması sonucu pankreastan insülin salgılanamaması veya insülin direncine bağlı olarak insülinin görevini yapamaması sonucu ortaya çıkan metabolik bir hastalıktır. İnsülin, pankreastaki Langerhans adacıklarının beta hücreleri tarafından üretilen, glikozun taşınmasından ve metabolizmasından sorumlu olan ve kanda glikoz yükselmesi durumunda salınan hormondur. İnsüline bağımlı olmayan diyabet olarak da bilinen Tip 2 diyabet (DM2) aynı zamanda diyabet vakalarının yaklaşık %90-95'ini kapsamaktadır (da Trindade ve ark., 2018).

Poliüri, polidipsi, polifaji ve açıklanamayan kilo kaybı diyabet hastalığının klinik semptomlarıdır. Bununla birlikte çoğu zaman diyabet asemptomatik olarak da görülür ve komplikasyon semptomları ortaya çıkmadan kalıcı olarak teşhis edilemez. Ülser, ampütasyon, retinopati, böbrek yetmezliği ve kalp hastalıkları diyabetin komplikasyonları arasında yer alır. Diyabet tedavisinde ilk olarak glikoz seviyesini korumak veya azaltmak amacıyla, egzersiz ve diyet değişikliği önerilir ve glikoz seviyesi kontrol altında tutulmaya çalışılır. Bu parametreler için glikoz düzeyi bu önlemler ile düzenlenemiyorsa, ilaç müdahalesi gereklidir. İlaç tedavisinde, önerilen tedavi hedeflerine ulaşmak için hastaların hiperglisemi dereceleri, ek hastalıkları, alışkanlıkları göz önünde bulundurularak düzenlenir (da Trindade ve ark., 2018).

Oral antidiyabetik ilaçlar etki mekanizmalarına göre ayrılmıştır ve bunlar; insülin salgılatıcı ilaçlar, insülin duyarlılaştırıcı ilaçlar (sensitizerler), alfa-glukozidaz inhibitörleri ve inkretin mimetik ilaçlardır (Phung ve ark., 2011).

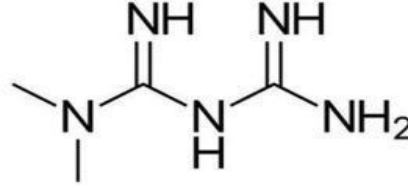
Tablo 1. Oral antidiyabetik ilaçların sınıflandırılması ve günlük doz aralıkları

Jenerik Adı	Günlük Doz
Glipizid	2.5-40 mg
Glipizid (kontrollü salımlı form)	5-20 mg
Gliklazid	80-240 mg
Gliklazid (kontrollü salımlı form)	30-90 mg
Glibenklamid	1.25-20 mg
Glibornurid	12.5-75 mg
Glimeprid	1-8 mg
Repaglinid	0.5-16 mg
Nateglinid	60-360 mg
Metformin	500-2550 mg
Rosiglitazon	2.8 mg
Pioglitazon	15-45 mg
Akarboz	25-300 mg
Sitagliptin	50-200 mg
Vildagliptin	50-100 mg
Saksagliptin	2.5-5 mg

*(Dahlén ve ark., 2022)

2.2. Metformin

Metformin (3-(diaminomethylidene)-1,1-dimethylguanidine) (Şekil 1), etkili bir biguanid antidiyabetik ilaçtır. DM2'li hastalarda kan glikoz düzeylerini kontrol etmek için uzun süredir kullanılmaktadır ve uluslararası kılavuzlara göre birinci basamak tedavi olarak kabul edilmektedir (Musi ve ark., 2002). Metformin, hepatik glikoz üretimini azaltmak için tasarlanmış biguanid sınıfı bir ilaçtır. Mitokondriyal inhibisyon ve AMPK (AMP aktive eden protein kinaz) aktivasyonu, hepatik glukoneogenezinin inhibisyonu metforminin moleküler rolleridir (Rena ve ark., 2013). Metformin, insülin duyarlılığını artırır ve glikoz seviyelerini düşürür. Öte yandan metformin, iskelet kasının insüline duyarlılığını doğrudan veya dolaylı olarak arttırabilir (Turner, 1998).



Şekil 1. Metformin'in molekül formülü

2.2.1. Etki Mekanizması

Metformin, diyet değişikliklerine cevap vermeyen ve insüline bağımlı olmayan şeker hastalıklarında kullanılır. Metformin, metabolik bir inhibitör olarak görev alır ve hücrel enerji metabolizmasını değiştirir. Ana etki mekanizması, hepatik glukoneogenezin inhibe etmesidir. Metformin, kompleks I ile mitokondriyal elektron taşıma zinciri ile etkileşime girer ve böylelikle hücrel ATP seviyeleri azalır ve AMP (adenozin monofosfat) birikir ve glukagona yanıt azalır. Sonuç olarak, glukoneojenik yolak enzimlerinin aktivitesi, glikoliz lehine inhibe edilmiş olur. Böylece metformin sayesinde glikoz üretimi azaltılmış olur (Pernicova ve Korbonits, 2014).

2.2.2. Farmakokinetik

Farmasötik formülasyonlarda metformin hidroklorür tuzu formunda bulunur. Metforminin mutlak oral biyoyararlanım %40-60'tır. Yutulduktan sonra 6 saat içinde gastrointestinal emilim tamamlanmış olur (Sweetman, 2010).

Metformin çabuk dağılır ve plazma proteinlerine bağlanmaz. Karaciğerde metabolize edilmez ve hiçbir metabolit veya metformin konjugatı tanımlanmamıştır. Böbreklerden değişmeden atılan metformin, ortalama plazma eliminasyon yarı ömrü oral olarak alındıktan sonra 2 ila 6

saat arasındadır. Böbrek yetmezliği olan hastalarda bu süre uzar ve bu süre kreatinin klirensi ile alakalıdır. Metformin anne sütüne geçişi düşüktür (Graham ve ark., 2011).

2.2.3. Fizikokimyasal Özellikleri

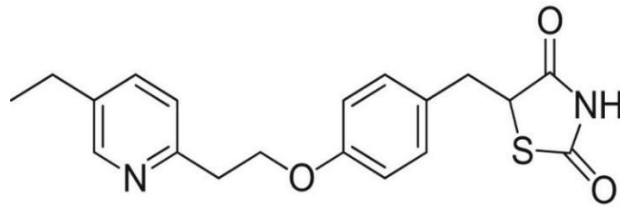
Beyaz veya neredeyse beyaz kristaldir. Moleküler formülü $C_4H_{11}N_5$ 'dir. CAS numarası 1115-70-4'tür. Metforminin molekül ağırlığı 129.16 g/mol'dür. Erime noktası 223 ila 226 °C arasında değişir, LogP değeri 0,5 ve pKa 12,4'tür. (British Pharmacopoeia, 1864)

2.3. Pioglitazon

İnsülin direnci, DM2'nin patogeneziinde primer bozukluk olarak kabul edilmekte ve bu sebeple ilk basamakta insülin duyarlılaştırıcı ilaçların kullanılması tedavide en iyi yaklaşımdır. Guanidin türevlerinin etki mekanizmalarının anlaşılmasının ardından antidiyabetik ajan geliştirmesinde bu grup moleküllerin önemi artmış ve bu çalışmalar sonucunda PPAR- γ (Peroksizom Proliferator-Aktive Reseptör- γ) agonistleri geliştirilmiştir. Bu gruptaki ilaçların etki mekanizmaları periferik dokulardaki insülin duyarlılığını arttırmakta ve çoğunlukla iskelet kasında insülin duyarlılığını arttırmaktadırlar. Açlık plazma glukozunu 25-55 mg/dL düzeyine, hemoglobin A1c'yi %0.5-1.4 düzeyine indirirler (Gillies ve Dunn, 2000).

2.3.1. Fiziksel ve Kimyasal Özellikleri

Pioglitazonun (5-[[4-[2-(5-etilpiridin-2-il)etoksi]fenil]metil]-1,3-tiazolidin-2,4-dion) (Şekil 2), molekül ağırlığı 356.44 g/mol'dür. Beyaz toz veya kristal halindedir. Suda çözünmez, susuz etanolde çözünür.



Şekil 2. Pioglitazon'un molekül formülü

2.3.2. Pioglitazonun Farmakokinetiği

Şekil 2'deki kimyasal yapıya sahip pioglitazon, tiazolidindion antidiyabetik ilaçtır ve DM2 tedavisinde kullanılır. Pioglitazon periferde ve karaciğerde insülin direncini azaltır, bunun sonucunda insüline bağlı glikoz atılımında artış görülür ve hepatik glikoz çıkışında azalmaya sebebiyet verir. Pioglitazonun büyük ölçüde metabolizasyonu hidroksilasyon ve oksidasyon yoluyla olur. Metabolitler pioglitazonun keto türevi (M-III) ve pioglitazonun hidroksi türevi

(M-IV)'dir. Metabolitlerin DM2'li hayvan modellerinde farmakolojik olarak aktif oldukları görülmüştür. Metabolitler kararlı durumda pioglitazona eşit veya daha fazla serum konsantrasyonlarına ulaşırlar (Krieter ve ark., 1994).

Pioglitazone, insülin duyarlılığını artırır ve hepatik glukoneogenezi azaltır. Günde bir defa verilir, emilimi iyidir ve hepatik sitokrom P450 enzim sistemi tarafından metabolize edilir. İlacın yarı ömrü 9 saat olmasına karşın aktif olan M-III ve M-IV metabolitleri, glikoz düşürücü etkinin uzamasına katkıda bulunurlar. Emiliminin ardından karaciğer, plazma ve böbrekte en yüksek konsantrasyonlarda bulunduğu görülmüştür. Ortalama mutlak biyoyararlanım %83'tür. Absorpsiyon hızı sabiti 0.04 ila 1.17 saat⁻¹ aralığındadır. Ortalama klirens 2.4 (aralık 1.72-4.17) L/saattir. Dağılım hacmi, muhtemelen kapsamlı protein bağlanmasına bağlı olarak (>%97) 0.253 L/kg'dır. Yapılan çalışmalarda, ilaç metabolizmasında yer alan herhangi bir enzim ile etkileşim görülmemiştir. Bundan yola çıkarak potansiyel ilaç etkileşimi ihtimali düşüktür. Sağlıklı gönüllüler ve DM2'li hastalar arasında pioglitazonun farmakokinetiği açısından önemli ölçüde farklılık görülmemiştir. Böbrek yetmezliği olan, hemodiyalize giren hastalarda doz ayarlaması gerekmemektedir. Pioglitazonun farmakokinetiği açısından yaş ve cinsiyetin önemli bir etkisi görülmemiştir. Aynı zamanda farmakokinetik açısından ırklar arası önemli bir farklılık görülmemiştir (Eckland ve Danhof, 2000).

2.4. Analitik Kimya

Analitik kimya; ayırma, teşhis ve bir madde numunesindeki bileşenlerin bağıl miktarlarının tayini ile ilgilenen kimya dalıdır. Analitik kimya, kalitatif analiz ve kantitatif analiz olmak üzere iki gruba ayrılır. Kalitatif analiz ile numunedeki türlerin kimyasal olarak belirlenmesi sağlanırken, kantitatif analizde ise tür veya türlerin veya analitin bağıl miktarı sayısal olarak belirlenir. Numunede tayini gerçekleştirilecek bileşenlere analit denir. Endüstrinin, tıbbın ve fen bilimlerinin her alanında kullanılan analitik kimya, bilimin gelişmesinde çok önemli role sahiptir (Skoog ve ark., 2019).

2.4.1. Kantitatif (Nisel) Analiz Yöntemlerinin Sınıflandırılması

Analitin veya analit ile kimyasal olarak ilgili bir bileşiğin kütlesi gravimetrik yöntem ile tayin edilir. Analit ile tümüyle reaksiyona girecek yeterli reaktif içeren bir çözeltinin hacmi volumetrik yöntem ile ölçülür. Potansiyel, akım, direnç ve elektrik miktarı gibi bazı elektriksel özellikler elektroanalitik yöntemler ile ölçülür. Analit atomları veya molekülleri ile elektromanyetik ışınma arasındaki etkileşimin ölçülmesi veya analit tarafından bazı ışınmaların üretilmesi spektroskopik yöntemler ile ilgilidir. Kullanılan diğer yöntemler, kütle/yük oranı

(kütle spektrometrisi), radyoaktif bozunma hızı, reaksiyon ısısı, reaksiyon hızı, termal iletkenlik, optikçe aktiflik, kırma indisi gibi bazı özelliklerin ölçülmesini kapsar (ICHHT Guideline, 2014).

2.4.2. Analitik Yöntemlerin Validasyonu

Analitik yöntemlere ait analiz sonuçlarının güvenilir bir temele dayanması için yöntemler valide edilmelidir. Validasyon; sağlam ve güvenilir bir temel de yöntemi ve yöntemden alınan sonuçları (ürünleri) desteklemek ya da teyit etmektir. Geliştirilen her analitik yöntemin validasyonu birbirinden bağımsız olmalıdır. (ICHHT Guideline, 2014)

Bir yöntemin geçerli olabilmesi için, yöntemin aynı zamanda doğruluk, kesinlik, duyarlılık, tekrarlanabilirlik, teşhis tayin limiti (LOD) miktar tayin limiti (LOQ), çalışma aralığı, seçicilik, sağlamlık ve stabilite gibi validasyon parametrelerini karşılaması gerekmektedir. Hangi validasyon parametrelerinin kullanılacağı yapılacak analitik analizlere göre seçilmelidir. Yöntemden elde edilen analiz sonuçlarının güvenilir olması için validasyon parametrelerinin kabul sınırları içerisinde olması gerekmektedir (Swartz ve Krull, 2012).

2.5. Kromatografi

Kromatografi kelimesi köken olarak Yunancadan gelmekte olup “renk yazımı” anlamındadır. Ortak ve uygun bir çözücü ortamına konan bir karışımın içerdiği maddelerin fiziksel ve kimyasal özelliklerine göre çözünerek ayrıldığı ayırma işlemleri kromatografi olarak adlandırılmaktadır (Sepici Dinçel ve Eser, 2018). Kromatografideki asıl amaç hedeflenen numunenin bileşenlerine ayrılması ve miktarlarının ölçülmesidir. Çeşitli maddelerin, hareketli bir faz (mobil faz) yardımıyla, sabit bir faz üzerinde, değişik hızlarla hareket etmesi veya sürüklenmesi esasına dayanan bu yöntemde çözücü hareket eder ve analiti sabit ortam boyunca taşır. Burada taşıyıcı faz kullanılan kromatografi tekniğine göre sıvı veya gaz, sabit faz ise selüloz kağıdından kapiller cam tüplere kadar farklı maddeden olabilmektedir (Sepici Dinçel ve Eser, 2018).

2.5.1. Kromatografide Kullanılan Terimler

Mobil faz: Analizi yapılacak maddeleri içeren örneği sabit faz (kolon) boyunca taşınmasını sağlayan çözücü karışımlarıdır.

Sabit faz: Hareketli faz içerisinde gelen örneğe ait bileşenlerin etkileştikleri ve maddelerin özelliklerine göre farklı miktarda alıkonuldukları fazdır. Sabit faz “kolon” olarak da adlandırılır.

Alıkonma zamanı: Maddenin kolon içerisinde kalma süresini ifade eder. Enjeksiyonun kolona verildiği süreden dedektöre ulaşıp çıktığı süreye kadar olan zamanın ifadesidir. Bu özellik göz önünde tutularak her kimyasal madde için, belirli sabit analitik şartlar altında, her madde için farklı olan alıkonma süresi (t_R) bulunur (Sepici Dinçel ve Eser, 2018).

Kromatogram: Analiz edilen numunenin her bir bileşeni için belli zamanlarda derişim değerine karşı elde edilen cevabın uygun bir detektör kullanılarak saptanmasıyla elde edilen pikleri gösteren grafiğe kromatogram adı verilir.

2.5.2. Kromatografik ayırmada etkili olan parametreler

Bir kromatografik yöntemde bileşenlere ait piklerin iyi ayrılıp ayrılmadığı bazı parametreler yardımı ile belirlenir. Bunlardan başlıcaları; alıkonma zamanı (t_R), kapasite faktörü (k), seçicilik (α), etkin tabaka sayısı (N) ve ayırma gücü (R_s)'dür.

Alıkonma zamanı ve kapasite faktörü

Kromatografide bir pik, o pike ait alıkonma süresiyle tanımlanır. Kromatografik karşılaştırma yapılmak istendiği durumlarda alıkonma süresi yerine “ k ” kullanılır. Kapasite faktörünün hesaplanması için aşağıdaki bağıntı kullanılır.

$$k = \frac{t_R - t_0}{t_0}$$

Bağıntıda bileşene ait alıkonma süresi t_R , kolonda tutunmayan türe ait alıkonma süreleri t_0 ile ifade edilmiştir. Bileşen sabit fazda iyi tutulması ve kolon boyunca yavaş ilerlemesi, k değeri büyüktür olarak yorumlanırken k değerinin küçük oluşu, bileşenin mobil fazla etkileşiminin fazla olmasından kaynaklı kolon boyunca hızlı ilerlediği şeklinde yorumlanabilir. “ k ”, HPLC ayırımlarında mümkün olduğunca 1-10 aralığında tutulmalıdır.

Seçicilik (α)

Seçiciliği etkileyen faktör, esas olarak kullanılan sabit fazın özelliği olsa da mobil faz bileşimi de kısmen etkiler. Seçiciliği bulmak için, kolonu daha geç terk eden maddeye ait k değeri, kolonu daha erken terk eden maddeye ait k değeri ile oranlanır ve hesaplama yapılır. Bu oran orantıya göre α değeri her zaman 1'den büyüktür.

$$\alpha = \frac{k_2}{k_1} = \frac{t_{R_2} - t_{R_0}}{t_{R_1} - t_{R_0}}$$

Teorik tabaka sayısı (N)

Teorik tabaka sayısı, kolondan çıkan pikin sivri ve dar olması ve piklerin iyi ayrılmış olması ile

ilgilidir. Teorik tabaka sayısının sayısal değeri, analizi yapılan maddenin cinsine bağlıdır ve aynı zamanda akış hızı, sıcaklık, kolon kalitesi, dolumun tek biçimliliği gibi deney koşullarına da bağlıdır. Teorik tabaka sayısı değerinin 2000'den büyük olması tavsiye edilir. Etkin tabaka sayısı, aşağıdaki bağıntı ile hesaplanır.

$$N = 5,54 \left(\frac{t_R}{W_{0,5}} \right)^2$$

N: Teorik tabaka sayısı

t_R : Bileşene ait alıkonma süresi, (s)

$W_{0,5}$: Pikin yarı yüksekliğindeki pik genişliği

Ayrırma gücü (Rs)

Kromatografide kolon etkinliği ve çözücü etkinliğinin ortak etkisinin ifade edilmesinde ayırma gücü (rezolüsyon) kavramı kullanılır. R değerinin hesaplanması için, kapasite faktörü (k), tabaka sayısı (N) ve seçicilik (α) kullanılır. İyi bir ayırım için $R=1,5$ olmalıdır.

$$R = 1,18 \times \frac{(t_2 - t_1)}{W_{0,5} + W_{p0,5}}$$

R_s : Pik çifti için ayırma gücü, t_1 (s): Birinci pikin alıkonma süresi, t_2 (s): İkinci pikin alıkonma süresi, $W_{0,5}$: Birinci pikin zaman ekseninde yarı genişliği, $W_{p0,5}$: İkinci pikin zaman ekseninde yarı genişliği olarak tanımlanmaktadır.

2.5.3. Kromatografinin Sınıflandırılması

Kromatografide, moleküllerin özellikleri oldukça önemlidir. Bu özellikler adsorpsiyon, dağılıma ve değiştirme örnek verilebilir. Yöntemler maddelerin bu özellikleri göz önünde bulundurularak ayrılma mekanizmalarına, uygulama biçimine ve faz tiplerine göre kromatografik yöntemler olarak farklı gruplara ayrılırlar (Sepici Dinçel ve Eser, 2018). Tablo 2'de bu sınıflandırılma verilmiştir (Skoog ve ark., 2019).

Tablo 2. Kromatografik yöntemlerin temel sınıflandırılması

Ayrılma Mekanizmasına Göre	Uygulama Biçimine Göre	Faz Tipine Göre
----------------------------	------------------------	-----------------

Adsorpsiyon Kromatografisi	Düzensel Kromatografi	Sıvı Kromatografisi
Partisyon Kromatografisi	• Kağıt Kromatografisi	Sıvı-Katı Kromatografisi
İyon Değişirme Kromatografisi	• İnce Tabaka Kromatografisi	Sıvı-Sıvı Kromatografisi
Jel Filtrasyon (Moleküler Eleme) Kromatografisi	Kolon Kromatografisi	Gaz Kromatografisi
	• Gaz Kromatografisi	
	• HPLC	

2.5.4. Kromatografinin Uygulamaları

Kromatografik teknikler, karmaşık yapıdaki örnek çözeltilerinde yer alan ve kimyasal özellikleri birbirine oldukça yakın olan bileşenlerin ayrılmasında yaygın olarak kullanılan güçlü analitik yöntemlerdir. Bu yöntemler, söz konusu maddelerin hem nitel hem de nicel analizlerinin gerçekleştirilmesinde önemli bir yere sahiptir.

Nitel analiz

Kromatografide yapılan nitel analizler, bileşiklerin sistemde tutulma sürelerindeki farklılıklara dayanmaktadır. Bu amaçla, uygun şekilde hazırlanmış bir standart karışım sisteme enjekte edilerek standart bileşenlere ait alıkonma süreleri belirlenir. Daha sonra, analiz edilen örneğin kromatogramındaki piklerin alıkonma süreleri bu standart değerlerle karşılaştırılır. Hem standart hem de örnek analizlerinde kolon tipi, dedektör ayarları ve akış hızı gibi tüm kromatografik parametrelerin aynı koşullarda yürütülmesi gerekmektedir (Skoog ve ark., 2019).

Nicel analiz

Nicel analizde, incelenen bileşiğe ait pik alanı ya da pik yüksekliği, standart çözeltide bulunan maddelerin pik alanı veya yüksekliğiyle karşılaştırılarak miktar tayini yapılır (Skoog ve ark., 2019).

Pik yüksekliğine dayalı analizler

Kromatografide pik yüksekliği, taban çizgileri pikin her iki tarafından düz bir çizgi ile birleştirilerek ve bu çizgiden pik tepesine dikey mesafe ölçülerek elde edilir. Bu şekilde yapılan ölçüm genelde yüksek kesinliğe sahiptir. Kolon sıcaklığı, eluent akış hızı ve numune enjeksiyon hızı yakından kontrol edilmesi gereken değişkenlerdir (Skoog ve ark., 2019).

Pik Alanına Dayalı Analizler

Pik yüksekliğine dayalı analizlerde pik alanları, söz konusu değişkenlere bağlı bant genişlemesi etkilerine bağımlı değildir. Buna göre, pik alanları yüksekliklere göre daha iyi analitik değişkenlerdir (Skoog ve ark., 2019).

Kalibrasyon ve standartlar

Kromatografik yöntemlerde, nicel analizler için en doğru yöntem, bir seri standart çözeltilerine ait pik alanları veya yükseklikler derişimin bir fonksiyonu olarak grafiğe geçirilmek üzere standartların kromatogramları alınır. Nicel analizlerin sağlıklı bir şekilde gerçekleştirilebilmesi için, kullanılan yöntemle belirlenen konsantrasyon aralığında oluşturulan kalibrasyon grafiğinin doğrusal bir ilişki göstermesi gerekmektedir. Sık sık tekrardan kalibrasyon yapılması en yüksek doğruluk için gereklidir.

İç standart yöntemi

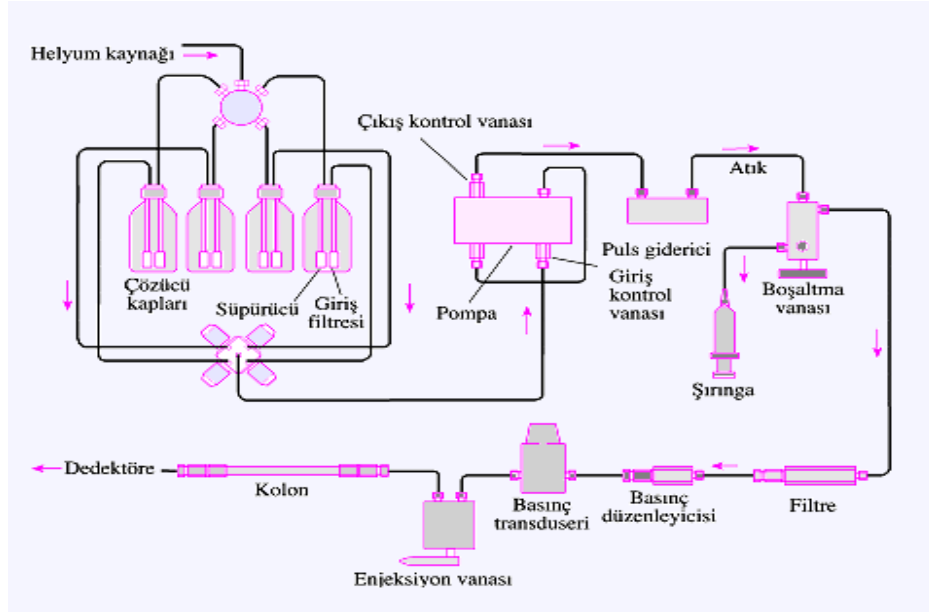
İç standart kullanılarak elde edilen değerler en kesin kantitatif değerlerdir. Bu yöntemde iç standart olarak seçilen madde, kullanılan çözücülerde fazlaca çözünen ve analite kimyasal yapı bakımından benzerlik gösteren bir maddedir. Her numuneye bilinen sabit bir miktarı eklenir. Analitin pik yüksekliği veya pik alanı, iç standardın pik alanına veya pik yüksekliğine oranı bir analitik parametredir ve bu oran üzerinden konsantrasyon hesaplanır (Skoog ve ark., 2019).

2.5.5. Sıvı Kromatografisi

Sıvı kromatografisinde maddeler birbiriyle karışmayan iki faz arasında farklı özelliklerinden yararlanılarak ayrılır ve ardından tanımlanırlar. Bu özelliklere dağılma oranları, fazlara olan ilgileri, fazlardaki farklı çözünürlükleri, adsorpsiyonları, iyonik yükleri, büyüklük farklılıkları örnek olarak verilebilir. Bu yöntemde sabit faz katı veya katı üzerine emdirilmiş bir sıvı haldedir. Mobil faz ise sıvı haldedir ve bir çözücü veya çözücüler karışımı halindedir. Mobil faz bir kolon içinde yer çekimi ile ya da basınç yardımı ile belirli bir akış hızı ile kolondaki sabit faz içerisinden veya üzerinden geçirilir. Bu işlem esnasında mobil faz içerisinde çözülmüş halde bulunan maddeler, sabit faz ile farklı olan etkileşimler meydana getirirler. Etkileşimlerdeki bu farklılıklar maddelerin fiziksel ve kimyasal özelliklerinin farklılıklarından kaynaklanmaktadır. Bu etkileşimlerin farklılıklarından dolayı numune içerisinde bulunan maddeler kolon boyunca farklı hızlarda hareket eder ve kolonu farklı sürelerde terk ederler. Sabit faza ilgisi düşük moleküller daha az etkileşime girerek kolon boyunca daha tutunarak kolonu hızla terk ederler. Ancak sabit faza ilgisi yüksek moleküller kolona daha çok tutunurlar ve kolon boyunca yavaş hareket ederek kolonu daha geç terk ederler (Skoog ve ark., 2019).

2.5.6. Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi (HPLC)

HPLC, diğer sıvı kromatografi yöntemlerinden farklı olarak hareketli faz, sabit faz üzerinden basınç yardımıyla geçirilir. Bu basınç yardımı ile hareketli faz, sabit faz üzerinden daha yüksek akış hızı ile geçirilmiş olur. HPLC, yüksek duyarlılık, doğruluk ve iyi tekrarlanabilirlik sağlaması; uçucu olmayan ya da ısıya karşı hassas bileşiklerin ayrılmasına uygun bir teknik olması ve birçok bilimsel disiplin ile endüstriyel alanda kullanılan maddelerin güvenilir biçimde nicel analizine imkân tanınması nedeniyle yaygın olarak tercih edilen bir yöntemdir (Aydın ve Narin, 2017). Aşağıda, Şekil 3'te HPLC cihazının şematik gösterimi verilmiştir.



Şekil 3. HPLC cihazının şematik görünüşü

HPLC'nin Çalışma Basamakları:

1. Test edilecek protein, peptit ya da diğer molekülleri çözmek için uygun bir çözücü kullanılması.
2. Çözdüğümüz bu karışım kolona enjekte edilerek hareketli faz ile hareket etmesi için bir basınç uygulanması ve bunun sonucunda bileşenlerin farklı özelliklerinden kaynaklı kolonu farklı sürelerde terk edip ayrımlarının yapılması.
3. Ayrımı yapılan numunedeki bileşenlere göre dedektörde yanıt oluşması.
4. Dedektör kullanılarak elde edilen cevaplar örnekteki her bir bileşen için belli zamanda derişim değerine karşı elde edilen cevapların piklere dönüştürülerek kromatogram haline getirilmesi ve bu kromatogramın değerlendirilmesi. Bu değerlendirme sürecinde kromatogramlar, bilgisayar programları kullanılarak yorumlanabilmektedir (Nalbalwar, 2015).

2.5.6.1. HPLC Cihazının Bölümleri

HPLC cihazı genel olarak sekiz bölümden oluşur. Bu bölümler; hareketli faz (solvent) şişeleri, degasser, pompa, enjektör, kolon fırını, kolon, dedektör, kaydedici şeklindedir. Üzerinde çalışılacak örneğe, kullanılacak cihazın markasına ya da modeline göre bu bölümler değişebilir.

Hareketli faz (solvent) şişeleri: Kullanılan HPLC cihazında cam veya paslanmaz çelik kaplar bulunur. Kullanılacak kapların kalitesi oldukça önemlidir çünkü araştırmada sulu tamponlardan hidrokarbonlara kadar farklı polaritede çözücüler kullanılabilir. Bunun yanında kullanılacak çözeltiler de saf olmalıdır.

Degasser: Bu sistem hareketli fazda eriyik halde bulunan gazların giderilmesi için kullanılır. Tüm çözücülerin içinde bulunan hava kabarcıkları giderilmelidir.

Pompa: Sıvı kromatografi cihazının temel bileşenlerinden biri olan HPLC pompası, sistem içerisinde mobil fazın ve numunenin enjektörden geçerek kolona ve dedektöre kadar sürekli ve sabit bir akışla ilerlemesini sağlayan kritik bir ünedir. Pompa, sıvının sistemde dolaşımını sağlamak ile görevlidir. Bir pompa sistemi; yüksek basınç altında da çalışabilmeli, basınç dalgalanması düşük olmalı, akış doğru ve tekrarlanabilir olmalı, kendi üzerinden kumanda edilebilmelidir. Bunlar bir pompa sisteminde olması gereken temel özelliklerdir (Bruns ve ark., 2007).

Enjektör: HPLC sisteminde, numunenin sabit fazdan (kolon) önce hareketli faza enjekte edilmesi için kullanılan kısım enjektördür.

Kolon fırını: Kolonun sabit bir sıcaklıkta olmasını sağlar. Bu çalışmanın kalitesi açısından önemlidir. Bu amaçla iki tip fırın kullanılır. Bunlar hava sirkülasyonlu ve blok ısıtıcılı fırınlardır.

Kolon: Kolon HPLC sisteminin en önemli kısımlardan birisidir. Karmaşık örneklerde bulunan bileşenlerin iyi çözünürlükle ayırımından sorumlu sabit fazdır. Kolon iç yüzeyinde kullanılan malzemenin kimyasal ve fiziksel özellikleri çok çeşitli olup, kullanılacak mobil fazın ve uygulanacak HPLC yönteminin özelliklerine ve analizi yapılacak örneğin bilinen kimyasal ve fiziksel özelliklerine göre seçilmelidir (Fung, 2008; Snyder ve ark., 2012).

HPLC’de kullanılan sabit faz ile hareketli faz ve bunlar arasındaki etkileşimler gibi bazı özellikler dikkate alınarak farklı ayırım teknikleri geliştirilmiştir. Bunlar arasında Normal Faz (Normal Phase; NP), Ters Faz (Reverse Phase; RP), Ters Faz İyon Çifti (Reverse Phase Ion

Pairing; IP), İyon Değişim (Ion Exchange; IC), Boyut Eleme (Size Exclusion; SEC (GPC/GFC)) ve Kiral Ayrım (Chiral Separation) tekniklerini sayılabilir (Bruns ve ark., 2007).

Dedektör: Kolonu terkeden bileşenlerin görülebilmesi, bunların ayrımının yapılması ve miktarlarının belirlenmesini sağlayan kısım dedektördür. Dedektörden geçen maddeler kaydedici kullanılarak kaydedilir. Burada zamana karşı dedektörden gelen cevaba ait bir grafik oluşturulur. Bu grafiğe kromatogram adı verilir. Bu amaç doğrultusunda kullanılan dedektörler arasında; fotodiyot dizisi dedektörü (Photodiode Array Detector–PAD), kütle dedektörü (Mass Detector–MS), refraktif indeks dedektörü (Refractive Index Detector–RID), floresans dedektörü (Fluorescence Detector–FLD), ultraviyole/görünür bölge dedektörü (UV/Vis Detector), elektrokimyasal dedektör (Electrochemical Detector–ECD) ve iletkenlik dedektörü (Conductivity Detector–CDD) gibi farklı algılama sistemleri bulunmaktadır (Nalbalwar, 2015; Snyder ve ark., 2012).

2.5.6.2. HPLC'nin Kullanım Alanları

Bu tekniğin çok yaygın kullanım alanı bulunur. HPLC ile yapılan analizler yedi başlık altında toplanabilir. Bunlar; biyokimyasal analizler, ilaç analizleri (antibiyotikler, sedatifler, steroidler, analjezikler), toksikoloji (uyuşturucu ilaçlar, narkotikler, zehirler), gıda analizleri, gıda ve çevre kirleticileri, adli tıp, klinik biyokimya (safra asitleri, üre ekstraktları, ilaç metabolitleri), endüstriyel analizler şeklinde sıralanabilir (Gault ve McClenaghan, 2013).

2.6. Geçerlilik Testi (Validasyon)

Geçerlilik (validasyon), bir ürüne yönelik yapılan nitel veya nicel analizlerde tercih edilen yöntemin ilgili analiz sürecine uygun olduğunu kanıtlamaya yönelik gerçekleştirilen testlerin bütünüdür (US Food and Drug Administration (US FDA), 2018; Hubert ve ark., 2007). Bir analitik yöntemin güvenilirliğini ortaya koymak amacıyla doğruluk, kesinlik, tekrarlanabilirlik, seçicilik, doğrusalık, sstabilite, duyarlılık sınırı ve sağlamlık gibi çeşitli performans parametreleri değerlendirilir.

2.6.1. Doğruluk, Kesinlik ve Tekrarlanabilirlik

Bir analitik yöntemde, elde edilen ölçüm sonuçlarının gerçek değere ne kadar yakın olduğuna doğruluk denir ve bu özellik, mutlak ya da bağıl hata değerleriyle ifade edilir. Kesinlik ise aynı örnekten yapılan çoklu ölçümlerin sonuçlarının birbirine ne derece yaklaştığını gösterir ve genellikle bağıl standart sapma yüzdesi (%BSS) üzerinden değerlendirilir. Tekrarlanabilirlik ise aynı yöntem kullanılarak farklı koşullarda hazırlanmış örneklerden elde edilen sonuçların birbiriyle olan uyumunu tanımlar.

i) **Gün içi kesinlik:** Aynı gün içerisinde, birbirinden bağımsız olarak hazırlanan numunelerin tekrar eden analizlerinden elde edilen verilerin birbirine yakınlığı ile belirlenir. Gün içi kesinlik, n=6 örnek üzerinden hesaplanan %BSS değeri ile raporlanır.

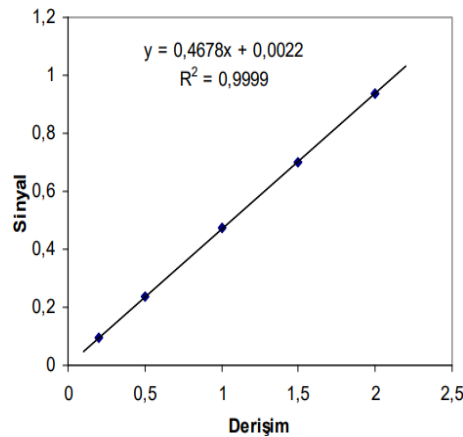
ii) **Günler arası kesinlik:** Bağımsız şekilde hazırlanmış numunelerin en az altı farklı günde tekrarlanan analizlerinden (her gün en az n=6 ölçüm) elde edilen sonuçların birbiriyle olan tutarlılığını ifade eder. Günler arası kesinlikten elde edilen bu veriler, yöntemin rutin analizlerde uygulanabilirliğini değerlendirmek açısından da önemli bir göstergedir.

2.6.2. Örneklerin Stabilitesi

Analizlerde kullanılan örneklerin ölçüm süreci boyunca kimyasal yapılarında herhangi bir bozulma meydana gelip gelmediğini değerlendirmek amacıyla yapılan testler kararlılık (stabilite) çalışmaları olarak adlandırılır. Saf analitin, analit çözeltilerinin ya da analit içeren biyolojik örneklerin; nem, sıcaklık, hava ile temas veya dondurup çözme işlemleri (örneğin – 20 °C’de saklama) gibi rutin laboratuvar koşullarına maruz kaldıklarında ne kadar süre boyunca değişmeden kaldığının belirlenmesi gerekir. Bu süreçte elde edilen stabilite verilerinin literatürde bildirilen bilgilerle uyumlu olması da önem taşımaktadır.

2.6.3. Kalibrasyon Eğrisi ve Doğrusallık

Yöntemin hangi konsantrasyon aralığında doğrusal bir yanıt verdiğini belirlemek amacıyla, en düşükten en yüksek derişime doğru artan bir dizi standart çözelti hazırlanır; bu değerlendirme doğrusallık çalışması olarak tanımlanır. Doğrusallık aralığı belirlendikten sonra, her bir çözeltilerden elde edilen sinyal yanıtları derişime karşı grafiğe aktarılır ve bu verilerden kalibrasyon eğrisi oluşturulur. Eğri, ağırlıklı ya da ağırlıksız en küçük kareler regresyonu kullanılarak analiz edilir ve böylece standart doğrultunun denklemine ek olarak regresyon katsayısı elde edilir (Şekil 4). Kalibrasyon eğrisinin eğim değeri ise yöntemin doğrusal yanıt verme derecesini gösteren matematiksel bir ölçüt olarak kabul edilir.



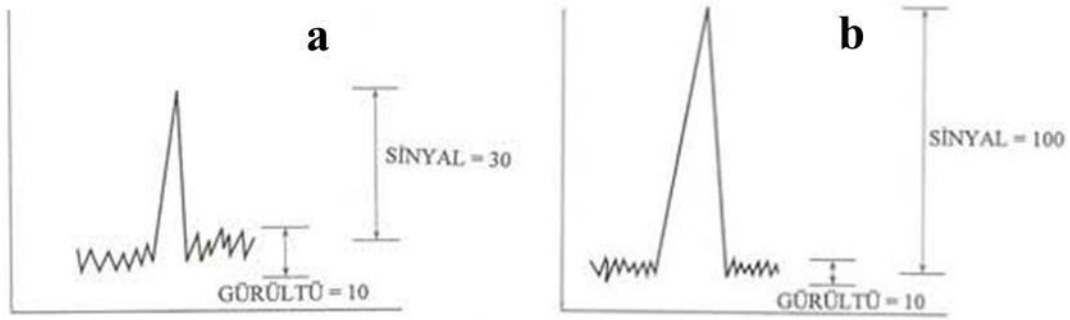
Şekil 4. Doğrusallık ve kalibrasyon eğrisi

2.6.4. Duyarlılık

Duyarlılık, yöntemin en düşük derişimdeki analitleri saptayabilme yeteneğinin ölçüsüdür.

2.6.5. Gözlenebilme Sınırı (Limit of Dedection, LOD) ve Miktar Tayin Alt Sınırı (Limit of Quantificiation, LOQ)

Bir analitik işlemden, örnekteki incelenen bileşimin belirlenebilen en düşük miktarı gözlenebilme (teşhis) sınırı olarak ifade edilir. Bununla birlikte, gözlenebilme sınırı olarak tanımlanan derişim, kantitatif bir tayin için tam anlamıyla güvenilir bir ölçüt değildir; yalnızca yöntemin algılama kapasitesini gösteren bir eşik değeridir. Kromatografik analizlerde, pik alanının gürültü seviyesine oranının 3'e ulaşması durumunda elde edilen derişim gözlenebilme sınırı olarak kabul edilmektedir. (Şekil 5a)



Şekil 5. a) Gözlenebilme Sınırı ve b) Miktar Tayin Alt Sınırı

Belirlenen deney koşulları altında, bir numunede bulunan analitin kabul edilebilir doğruluk ve kesinlik düzeyleriyle ölçülebildiği en düşük derişim, miktar tayin alt sınırı olarak tanımlanır. Kromatografik analizlerde ise pik alanının gürültü sinyaline oranının 10'a eşit olduğu derişim değeri, yöntemin tayin alt sınırı olarak kabul edilmektedir (Şekil 5 b).

2.6.6. Tutarlılık

Yöntemin farklı deney koşullarında, farklı laboratuvar, farklı analist, farklı alet, farklı koşullarda hazırlanan reaktiflerle ve farklı günlerde aynı yöntem ile yapılan analizlerin sonuçlarının birbiri ile uygunluk derecesidir. Analiz sonucunda elde edilen bulguların birbiriyle uyumlu olması analitik yöntemin tekrarlanabilirliğini ve uygulanabilirliğini gösterir.

2.6.7. Geri Kazanım

Analiz sonucunda bulunan değerlerin gerçek değere oranı olarak ifade edilir (ICHHT Guideline, 2014; US FDA, 2018).

3. MATERYAL VE METOT

Çalışmamızda, farklı ortamlarda (farmasötik preparat, plazma, tam kan vs.) HPLC tekniği

kullanılarak gerçekleştirilen metformin ve pioglitazon etken maddelerine ait analizleri detaylı bir şekilde inceledik. Yapılan çalışmaların yöntem şartlarını ve elde edilen sonuçları bir araya topladık. Metformin ve pioglitazon için en iyi yöntem şartlarını belirlemeye çalıştık.

3.1. Metformin İçin Yapılan HPLC Analizleri

Bu kısımda metforminin kantitatif analizi ve safsızlık tayini için literatürlerde yer alan bazı HPLC yöntemleri bulunmaktadır (Tablo 3).

Ching-Ling Cheng ve Chen- Hsi Chou, metforminin insan plazmasında analizini yapmak için HPLC yöntemini kullanmışlardır. Hichrom Silica H5 sütunu (10 mm x 3.2 mm) ile silika sütunu (250 mm × 4.6 mm; 5 µm) kolon olarak kullanılmıştır. 0.03 M diamonyum hidrojen fosfat tamponu (750 mL) ve asetonitril (250 mL) mobil faz olarak kullanarak analiz etmişlerdir. Metformin ve internal standart (atenolol) 240 nm dalga boyunda sırasıyla 7.8 ve 6.8 dakikada ayrılmışlardır. Akış hızı 1 mL/dk'dır (Cheng ve Chou, 2001).

Mei Zhang ve arkadaşları, metforminin insan plazmasında ve anne sütünde analizini yapmak için HPLC yöntemini kullanmışlardır. Analizde bir katyon değişim kolonu (250 mm × 4 mm; 5 µm) ve ön katyon değişim kolonu Nucleosil (30 mm × 4 mm; 5 µm) ayırım için kullanıldı. Metformin ve internal standart buformini, pH 3.7' ye ayarlanmış tetrametilamonyum fosfat tamponu ve asetonitrili (80:20, h/h) mobil faz olarak kullanarak HPLC-UV ile 236 nm dalga boyunda belirlenmiştir. Akış hızı 1 mL/dk'dır (Zhang ve ark., 2002).

Hossein Amini ve arkadaşları, yeni bir numune ekstraksiyon prosedürü kullanarak, metforminin insan plazmasında analizini; seçici, hassas ve basit bir HPLC yöntemi geliştirerek gerçekleştirmişlerdir. Metformin ve internal standart ranitidin ayrılması için mobil faz olarak asetonitril-40 mM sulu sodyum dihidrojen (25:75, h/h) kullanıldı. Analizde izokratik elüsyon altında bir silika kolon (250 mm x 4.6 mm, 5 µm) kullanıldı. Analiz 234 nm dalga boyunda 9 dakikada gerçekleştirilmiştir. Akış hızı 1.3mL/dk'dır. (Amini ve ark., 2005).

Florentin Tache ve arkadaşları, metforminin insan plazmasında analizini ppb düzeyinde HPLC-DAD yöntemi ile gerçekleştirmişlerdir. HP DAD G1315A detektörü ile donatılmış bir Hewlett Packard 1100 serisi sıvı kromatograf kullanmışlardır. Analizde bir Inertsil ODS-2 (250 mm × 4.6 mm id, 5 µm) kolonu ayırım için kullanıldı. Metformin, izokratik bir elüsyon (su/metanol karışımı 65/35) mobil faz olarak kullanılarak HPLC-DAD ile 280±2 nm dalga boyunda belirlenmiştir. Akış hızı 1mL/dk'dır (Tache ve ark., 2001).

Uttam Prasad Pani grahy ve A Sunil Kumar Reddy, farmasötik tablet dozaj formunda metformin ve canagliflozinin eşzamanlı tayini için yeni bir doğrulanmış HPLC-DAD yöntemi geliştirmişlerdir. 2998 PDA detektörlü Waters Alliance e2695 HPLC sistemi kullanmışlardır. Analiz için Kromasil C18 kolon (250mm × 4.6 mm, 5mm partikül boyutu) kullanıldı.

Metformin ve canagliflozinin eşzamanlı tayininde, 0.01M amonyum asetat (ortofosforik asit ile 3.5'e ayarlanmış) ve asetonitril (65:35, v/v) mobil faz olarak kullanılarak HPLC-DAD ile 254 nm dalga boyunda belirlenmişlerdir. Akış hızı 1mL/dk'dır (Panigrahy ve Reddy, 2015).

Tablo 3. Metformin için literatürde yer alan HPLC analizleri

Dalga boyu	240 nm	236 nm	234	280 ± 2 nm	254
Analiz süresi(dk)	7.8	Belirtilmemiş	9	Belirtilmemiş	8
Hareketli faz	Asetonitril (% 25) ve % 75 pH 7, 0.03 M hidrojen fosfat tamponu	Tetrametilamonyum fosfat tamponu pH 3.7 ve asetonitril (80:20, h:h)	40 mM asetonitril, sulu sodyum fosfat (25:75, h:h)	İzokratik elüsyon (su/metanol karışımı 65:35, h:h)	bir 0.01M amonyum asetat (ortofosforik asit ile 3.5'e ayarlanmış) ve asetonitril (65:35, h:h)
Akış hızı	1mL/dk	1mL/dk	1.3 mL/dk	1 mL/dk	1 mL/dk
Kolon	Hichrom Silica Katyon değişim H5 sütunu (10 mm x 3.2 mm) ile silika sütunu (250 mm x 4.6 mm; 5 µm)	Katyon değişim kolonu (250 mm x 4 mm; 5 µm), ön katyon Nucleosil (30 mm x 4 mm; 5 µm)	Ön kolon su sferisorb S5 W (30 mm x 4.6 mm) ile silika kolon (250 mm x 4.6 mm; 5 µm)	ODS-2 (250 mm x 4.6 mm id, 5-µm) kolonu	Kromasil C18 kolon (250mm x 4.6 mm, 5mm partikül boyutu)
Matris	İnsan plazması	İnsan plazması ve anne sütü	İnsan plazması	İnsan plazması	Tablet
Yöntem	HPLC – UV	HPLC – UV	HPLC – UV	HPLC-DAD	HPLC-DAD
Referans	(Cheng ve Chou, 2001)	(Zhang ve ark., 2002)	(Amini ve ark., 2005)	(Tache ve ark., 2001)	(Panigrahy ve Reddy, 2015)

3.2. Pioglitazon İçin Yapılan HPLC Analizleri

Bu kısımda pioglitazonun kantitatif analizi ve safsızlık tayini için literatürlerde yer alan HPLC yöntemlerinin bazıları bulunmaktadır. (Tablo 4)

Ziba Islambulchilar ve arkadaşları, insan plazmasındaki pioglitazonun miktar analizini HPLC-UV ile gerçekleştirmişlerdir. Analizde Shimpack VP-ODS (150 mm×4.6 mm, 5 µm) kolonu kullanılarak ayırım gerçekleştirilmiştir. Bir fosfat tamponu, metanol, asetonitril ve 12 M perklorik asit (54:33:12:1, h:h:h:h) karışımından oluşan hareketli faz kullanarak, 269 nm dalga boyunda analizini gerçekleştirmiş ve validasyonunu yapmışlardır. Akış hızı ile 1.5 mL/dk'dır (Islambulchilar ve ark., 2010).

Vinay Pandit ve arkadaşları, metformin, pioglitazon ve glimepiridinin eş zamanlı tayini için HPLC yöntemi geliştirmiş ve doğrulamışlardır. UV-SPD-10AVP dedektörü kullanmışlardır. Metanol: asetonitril: 15 mM potasyum dihidrojen fosfat (pH 4) 40:35:25 (h:h:h) oranında mobil faz kullanmışlardır. Analiz 240 nm dalga boyunda gerçekleştirilmiştir. Akış hızı 1 mL/dk'dır (Pandit ve ark., 2012).

Deepti Jain ve arkadaşları, metformin, pioglitazon ve glimepiridin tablet formlarının UV-PDA dedektör kullanarak üç farklı örneği HPLC'de eş zamanlı analiz etmek için yöntem geliştirmişlerdir. Analizde Inertsil-ODS-3 (C-18) (250 × 4.60 mm, 5 µm) kolonu kullanılarak ayırım gerçekleştirilmiştir. pH 4.3'e ayarlanmış metanol-fosfat tampon çözeltisini 75:25 (h:h) hareketli faz olarak kullanarak 258 nm dalga boyunda tayin gerçekleştirmişler ve validasyonunu yapmışlardır. Akış hızı 1 mL/dk'dır (Jain ve ark., 2008).

Lakshmi ve arkadaşları, metformin ve pioglitazonun tablet formlarını HPLC ile analiz ederek yöntem geliştirmişlerdir. Gemini C18 (150 x 4.6 mm, 5 µm) kolonunu kullanmışlardır. pH 3'e ayarlanmış asetonitril ve amonyum asetat tampon çözeltisini (42:58, h:h) mobil faz olarak kullanmış ve 255 nm dalga boyunda tayin gerçekleştirmişlerdir. Akış hızı 0.3 mL/dk'dır (Lakshmi ve ark., 2009).

Pattana Sripalakit ve arkadaşları, insan plazmasında pioglitazon analizi için HPLC yöntemi geliştirmiş ve bir farmakokinetik çalışmaya uygulamışlardır. İç standart olarak rosiglitazon kullanmışlardır. HPLC sistemi, çift pistonlu pompa (LC10ATVP) ve UV-vis dedektör (SPD10AVP) içermektedir. Analiz, ters fazlı bir Apollo C18 kolonu (250 mm × 4.6 mm i.d., 5 µm) kullanılarak ayırım yapılmıştır. Metanol-asetonitril karışımlı fosfat tamponunun (pH 2,6; 10 mM) (40:12:48, h:h:h) mobil faz olarak kullanılmış ve 269 nm dalga boyunda analiz etmişlerdir. Akış hızı 1,2 mL/dk'dır (Sripalakit ve ark., 2006).

Saber ve arkadaşları, pioglitazonun tablet formunu HPLC ile UV dedektör (Waters model 481) kullanarak analiz etmişlerdir. Analizde Nova-Pak C18 (3.9 mm x 150 mm, 5 µm) kolonu kullanılarak ayırım yapılmıştır. pH 3'e ayarlanmış amonyum format tamponu ve asetonitril (75:25, h:h) hareketli faz olarak kullanarak, 225 nm dalga boyunda tayinini gerçekleştirmiş ve valide etmişlerdir. Akış hızı 1 mL/dk'dır (Saber, 2008).

Tablo 4. Pioglitazon için literatürde yer alan HPLC analizleri

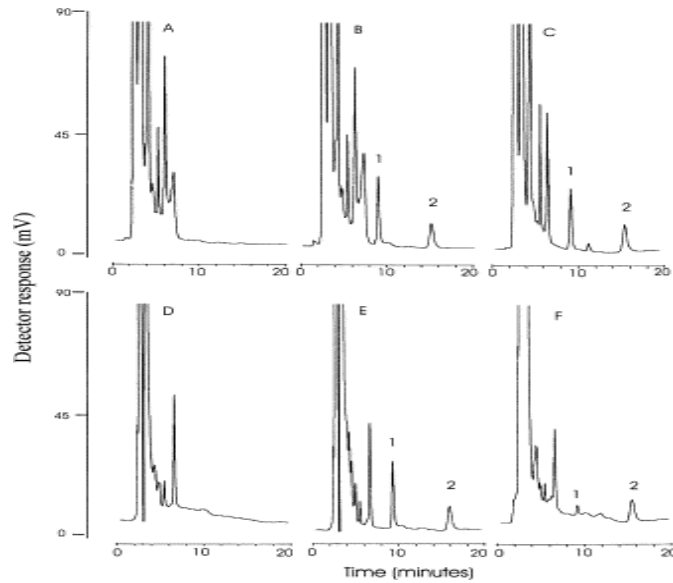
Dalga boyu	269 nm	240 nm	258 nm	255 nm	269 nm	225 nm
Analiz süresi(dk)	5.2	4.52	7.12	İfade edilmemiş	8.2	12
Hareketli faz	Fosfat tamponu, Metanol: metanol, asetonitril ve 12 M perklorik asit (54:33:12:1, h:h)	Metanol: asetonitril: potasyum dihidrojen fosfat (pH 4, 40:35:25, h:h:h)	pH 4.3' e ayarlanmış metanol-fosfat tampon çözeltisi, 75:25 (h:h)	pH 3' e ayarlanmış asetonitril ve amonyum asetat tampon çözeltisi (42: 58, h:h)	Metanol-asetonitril ve karışımli fosfat tamponunu (pH 2,6; 10 mM) (40:12:48, h:h:h)	Amonyum format ve asetonitril (75:25, h:h)
Akış hızı	1.5 mL/dk	1 ml/dk	1 mL/dk	0.3 mL/dk	1,2 mL/dk	1 mL/dk
Kolon	Shimpack VP-ODS (150 mm×4.6 mm, 5 µm)	İfade edilmemiş	Inertsil ODS 3 (C-18) (250 × 4.60 mm, 5 µm)	Gemini C18 (150 x 4.6 mm, 5 µm)	Apollo C18 kolonu (250 mm × 4.6 mm i.d, 5 µm)	Nova-Pak C18 (3.9 mm x 150 mm, 5 µm)
Matris	İnsan plazması	Tablet	Tablet	Tablet	İnsan plazması	Tablet
Yöntem	HPLC – UV	HPLC – UV	HPLC – UV	HPLC – UV	HPLC – UV	HPLC – UV
Referans	(İslambulchilar ve ark., 2010)	(Pandit ve ark., 2012)	(Jain ve ark., 2008)	(Lakshmi ve ark., 2009)	(Sripalakit ve ark., 2006)	(Saber, 2008)

4. BULGULAR VE TARTIŞMA

Metforminin ve pioglitazonun tayinleri; metformin ve pioglitazonun eşzamanlı tayinlerinin literatür taramaları yapıldığında aşağıdaki sonuçlar elde edilmiştir.

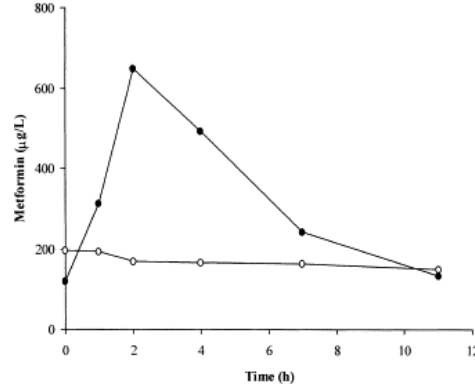
Ching Ling Cheng ve Chen Hsi Chou, insan plazmasındaki metformin tayinini HPLC yöntemini kullanarak yapmışlardır. Çalışmalarında şu sonuçları elde etmişlerdir: LOD değeri 2.5 ng/mL, LOQ değeri 10 ng/mL'dir. Doğrusallık 10-2000 ng/mL ($r > 0.999$)'dir. Doğruluk nominal konsantrasyonun %6,2'sidir. Gün içi ve günler arası kesinlik $\leq 12\%$ 'dir. Metformin ve atenolol için mutlak geri kazanım %76'dan daha yüksek bulunmuştur. Bu yöntemi, metforminin klinik incelenmesi ve miktar analizleri için uygun bulmuşlardır (Cheng ve Chou, 2001).

Mei Zhang ve arkadaşları, İnsan plazması ve anne sütünde metformin tayinini HPLC yöntemini kullanarak yapmışlardır. (Şekil 6) Çalışmalarında şu sonuçları elde etmişlerdir: LOQ değeri 20 $\mu\text{g/L}$ 'dir ve kalibrasyon eğrisi 20.0–4000 $\mu\text{g/L}$ aralığında doğrusaldır. Hem plazma hem de anne sütü testleri için gün içi varyasyon katsayıları %7.0'dan az ve günler arası varyasyon katsayıları %9.0'dan azdır. Metforminin ortalama mutlak geri kazanımı, sırasıyla plazmadan %93.7 \pm 0.76 (her konsantrasyonda $n=4$ plazma özütü) ve anne sütünden %93.9 \pm 1.00 (her konsantrasyonda $n=4$ anne sütü özütü) şeklindedir. Yöntem basit, hızlı, hassas ve spesifiktir (Zhang ve ark., 2002).



Şekil 6. Mei Zhang ve arkadaşlarının çalışmasına ait kromatogram

(A) boş plazma numunesi için elde edilen HPLC kromatogramları, (B) 1000 µg/L'de metformin eklenmiş plazma numunesi, (C) 500 mg metformin oral uygulamasından 2 saat sonra 648 µg/L metformin içeren bir hastadan alınan plazma numunesi, (D) boş anne sütü numunesi, (E) 1000 µg/L'de metformin eklenmiş anne sütü numunesi ve 500 mg metforminin oral uygulamasından 2 saat sonra 168 µg/L metformin içeren bir hastadan (F) anne sütü numunesi. Pikler: (1) Metformin; (2) buformin. (Şekil 7)



Şekil 7. Mei Zhang ve arkadaşlarının çalışmasında metforminin plazma ve süt konsantrasyonu-zaman profilleri*

*Günde iki kez 500 mg doz alan bir hastada 11 saatlik bir doz aralığında plazma ve anne sütündeki kararlı durum metformin konsantrasyonları. (●) Plazmada metformin konsantrasyonu, anne sütünde (○) metformin konsantrasyonu

Hossein Amini ve arkadaşları, insan plazmasındaki metformin tayinini HPLC yöntemini kullanarak yapmışlardır. Çalışmalarında şu sonuçları elde etmişlerdir: LOD değeri 5 ng/mL, LOQ değeri 15.6 ng/mL'dir. Kalibrasyon eğrisi, 15.6-2000 ng/mL aralığında doğrusaldır. Gün içi kesinlik %0,8-5,9 arasında değişirken, günler arası kesinlik %1,3-8,3 arasındadır. Metformin ve dahili standart için ortalama mutlak geri kazanımlar sırasıyla %98 ve %95'dir (Amini ve ark., 2005).

Florentin Tache ve arkadaşları, metforminin insan plazmasında analizini türevlendirme ile ppb düzeyinde HPLC-DAD yöntemi ile gerçekleştirmişlerdir. Türevlendirme ajanı olarak *p*-nitrobenzoil klorür kullanmışlardır. Kalibrasyon eğrisi, 0.01 ppm ila 10 ppm arasında doğrusaldır. Analiz süresi 15 dakikadır. Diğer çalışmalara göre daha uzun bir analiz süresinde tayin gerçekleştirmişlerdir. Bunun yanında türevlendirme işlemi 60 dk sürmüştür. Bu da çalışmanın bir dezavantajı olarak karşımıza çıkmaktadır. Çalışmalarında LOD değeri 10 ppb olarak saptamışlardır. Saptama sınırı düşüktür ve iyi bir seçiciliğe sahiptir. Çalışmada türevlendirme ajanı kullanılmasının kimyasalların tüketimini arttırdığı da göz önünde bulundurulmalıdır (Tache ve ark., 2001).

Uttam Prasad Panigrahy ve A Sunil Kumar Reddy, farmasötik tablet dozaj formunda metformin ve canagliflozinin eşzamanlı tayini için yeni bir doğrulanmış HPLC-DAD yöntemi geliştirmişlerdir. Çalışmalarında şu sonuçları elde etmişlerdir: Metformin ve canagliflozin için sırasıyla LOD değerleri, 0.27 µg/mL ve 0.01 µg/mL'dir. Sırasıyla LOQ değerleri, 0.83 µg/mL

ve 0.04 µg/mL'dir. Kalibrasyon eğrisi, metformin için 50-300 µg/mL aralığında doğrusaldır. Yöntem kesinliği (%BSS, n=6), metformin ve canagliflozin için sırasıyla 0.31 ve 0.43 şeklindedir. Doğruluk, metformin için 50-300 µg/mL ve canagliflozin için 5-30 µg/mL'dir ($r^2=0,999$). Metformin ve canagliflozin için geri kazanım yüzdeleri sırasıyla (%99,45-%100,65) ve (%99,95-%100,74) arasındadır (Panigrahy ve Reddy, 2015).

Ziba Islambulchilar ve arkadaşları, insan plazmasındaki pioglitazonun miktar analizini HPLC-UV ile gerçekleştirmişlerdir. Çalışmalarında şu sonuçları elde etmişlerdir: LOD değeri 14.59 ng/mL'dir. LOQ değeri 44.2 ng/mL'dir. Kalibrasyon eğrisi 50-2000 ng/mL aralığında doğrusaldır. Gün içi ve gün arası kesinlik %5'den azdır (Islambulchilar ve ark., 2010).

Vinay Pandit ve arkadaşları, metformin, pioglitazon ve glimepiridinin eş zamanlı tayini için HPLC yöntemi geliştirmiş ve doğrulamışlardır. Çalışmalarında şu sonuçları elde etmişlerdir: Metformin, pioglitazon ve glimepiridin için alıkonma süreleri sırasıyla 2.85 ± 0.03 dk, 4.52 ± 0.03 dk ve 7.08 ± 0.02 dk'dır. LOD değerleri metformin, pioglitazon ve glimepirid için sırasıyla 0.04, 0.05 ve 0,08 µg/mL'dir. LOQ değerleri metformin, pioglitazon ve glimepirid için sırasıyla 0.12, 0.19 ve 0.18 µg/mL'dir. Metformin, pioglitazon ve glimepirid için doğrusallık sırasıyla 0.2-50, 0.2-30 ve 0.2-30 µg/mL'dir. Doğruluk; metformin için 99.66 ± 0.14 , pioglitazon için 98.46 ± 0.40 ve glimepirid için $98,62 \pm 0,39$ olarak bulunmuştur. Metformin için kesinlik, gün içi %BSS 1.01–3.24 ve günler arası %BSS 1.54–4.09 olarak bulunmuştur. Pioglitazon için kesinlik, gün içi %BSS 1.03-2.09 ve günler arası %BSS 2.26-3.10 olarak bulunmuştur. Glimepirid için kesinlik, gün içi %BSS 1.00–3.15 ve günler arası %BSS 1.58–3.07 olarak bulunmuştur. %100'lük referans standardı için yüzde geri kazanımlar şu şekildedir; metformin için %99.35 pioglitazon için %98.63 glimepirid için %99.56'dır (Pandit ve ark., 2012).

Deepti Jain ve arkadaşları, metformin, pioglitazon ve glimepiridin tablet formlarının UV-PDA dedektör kullanarak üç farklı örneği HPLC'de eşzamanlı analiz etmek için yöntem geliştirmişlerdir. Çalışmalarında şu sonuçları elde etmişlerdir: Metformin, pioglitazon ve glimepirid için doğrusallık aralığı sırasıyla 10–5000, 10–150 ve 1–10 µg/mL'dir. Metformin, pioglitazon ve glimepirid için tutulma süreleri sırasıyla 2.66 ± 0.5 dakika, 7.12 ± 0.5 dakika ve 10.17 ± 0.5 dakikadır. Metformin, pioglitazon ve glimepirid için geri kazanım sırasıyla %100.4, %100.0 ve %100.2'dir. Eşzamanlı analizde kullanılacak basit, hassas, hızlı ve tekrarlanabilir bir ters fazlı HPLC yöntemi geliştirmişlerdir (Jain ve ark., 2008).

Lakshmi ve arkadaşları, metformin ve pioglitazonun tablet formlarını HPLC ile analiz ederek yöntem geliştirmişlerdir. Çalışmalarında şu sonuçları elde etmişlerdir: Metformin için LOD ve LOQ değerleri sırasıyla 0.003 µg/mL, 0.0061 µg/mL'dir. Pioglitazon için LOD ve LOQ değerleri sırasıyla 0.01 µg/mL, 0.02 µg/mL'dir. Kalibrasyon eğrisinde metformin ve

pioglitazon için sırasıyla, 0.5-50 µg /mL ve 0.3-30 µg/mL işaretlenmiştir. Metformin için kesinlik, %BSS 1.75-1.92'dir. Pioglitazon için kesinlik, %BSS 1.30-1.93'tür. Metformin ve Pioglitazon için geri kazanım değerleri sırasıyla %98-102 ve %97-103 arasındadır. Önerilen yöntem saf metformin ve pioglitazonun ve farmasötik dozaj formlarının eşzamanlı tayininde basit, hassas, doğru ve hızlı bir yöntemdir (Lakshmi ve ark., 2009).

Pattana Sripalakit ve arkadaşları, insan plazmasında pioglitazon analizi için HPLC yöntemi geliştirmiş ve bir farmakokinetik çalışmaya uygulamışlardır. Çalışmalarında şu sonuçları elde etmişlerdir: LOQ değeri 50 ng/mL'dir. Kalibrasyon eğrisi 50-2000 ng/mL ($r^2 > 0.9987$) aralığında doğrusaldır. Gün içi doğruluk %94.7 ile %97.6 arasındadır. Gün içi kesinlik %2.0 ile %8.7 arasındadır. Günler arası doğruluk %90.3 ile %96.0 arasındadır. Günler arası kesinlik %0.9 ile %6.8 arasındadır. İlaç konsantrasyonuna bakılmaksızın, geri kazanımlar %96.6 ile %106.3 arasında değişmiştir (Sripalakit ve ark., 2006).

Saber ve arkadaşları, pioglitazonun tablet formunu HPLC ile UV dedektör kullanarak analiz etmişlerdir. LOD değeri 0.2 µg/mL 'dir. LOQ değeri 0.5 µg/mL 'dir. Doğrusallık ≥ 0.5 µg/mL, hassasiyet ≥ 99.14 , ve kesinlik ≤ 0.6 'dır. Geri kazanımlar %99.65 ve %100.73 arasında değişmiştir (Saber, 2008).

Literatür çalışması ile belirlenen HPLC yöntemleri içerisinde metformin tayini için en düşük LOD (2.5 ng/mL) ve LOQ (6.1 ng/mL) değerleri sırasıyla Ching Ling Cheng ve Lakshmi'nin geliştirdikleri HPLC yöntemleridir. Ayrıca Lakshmi ve arkadaşlarının metformin ve pioglitazon eşzamanlı tayini için geliştirdikleri HPLC yöntemi pioglitazon için belirlenen en düşük LOD (10 ng/mL) ve LOQ (20 ng/mL) değerlerine sahiptir.

Ching Ling Cheng'in geliştirdiği HPLC yöntemi metformin tayini için yüksek hassasiyetli en geniş doğrusal aralığa (10-2000 ng/mL) sahip yöntemdir. Pattana Sripalakit ve arkadaşları ise pioglitazonun tayini için geliştirdikleri HPLC yöntemi 50-2000 ng/mL ile en geniş çalışma aralığına sahiptir.

Metformin ve pioglitazon için literatürde bildirilen çalışmalardan Ching Ling Cheng ve arkadaşlarının geliştirdiği yöntem dışındaki (%76) tüm HPLC yöntemlerine ait geri kazanım değerleri kabul sınırları içerisindeydi. (%95-105)

Lakshmi ve arkadaşlarının metformin ve pioglitazonu eş zamanlı tayini için geliştirdikleri HPLC yöntemi hem metformin (%BSS <1.92) hem de pioglitazon (%BSS <1.93) için en yüksek kesinliğe sahip analiz sonuçlarına sahiptir.

Metformin ve pioglitazon için en kısa alıkonma zamanları sırasıyla Deepti Jain (2.66 dk.) ve Vinay Pandit'in (4.52 dk.) geliştirdikleri HPLC yöntemlerine aitti. Ayrıca geliştirilen bu iki yöntem metformin ve pioglitazonu eş zamanlı olarak analiz edebilen en kısa analiz süresine (<7.5 dk) sahip HPLC yöntemleriydi.

5. SONUÇ

Bu derleme çalışması, metformin ve pioglitazonun çeşitli matrislerde HPLC yöntemi ile gerçekleştirilmiş nicel analizlerini kapsamlı biçimde incelemiştir. Yapılan değerlendirmeler, HPLC'nin her iki molekülün miktar tayininde yüksek duyarlılık, seçicilik, doğruluk ve kesinlik sunduğunu göstermektedir. Çalışmalar genel olarak incelendiğinde, analitik performans parametrelerinin uygun kromatografik koşullar sağlandığında güvenilir sonuçlar verdiği; yöntemlerin validasyon kriterlerini karşıladığı ve klinik, farmasötik ya da biyolojik örneklerde uygulamaya elverişli olduğu görülmektedir.

HPLC yöntemlerinin esnekliği, farklı mobil faz bileşimleri, kolon tipleri ve dedektörlerle geniş bir doğrusal aralık içinde çalışabilme imkânı sağlamaktadır. Bu yönüyle HPLC hem farmasötik kalite kontrol süreçlerinde hem de biyolojik numune analizlerinde metformin ve pioglitazonun kantitatif tayini için güçlü bir yöntem olmaya devam etmektedir.

Bu derleme, gelecekte bu aktif bileşikler için geliştirilecek analitik yaklaşımlara rehber niteliği taşıyacak bir genel çerçeve sunmakta ve HPLC'nin güvenilir, tekrarlanabilir ve yüksek doğruluk sağlayan bir teknik olarak önemini vurgulamaktadır.

Yazar Katkıları

Plan ve tasarlama: TÇA; **Revizyon, denetim veya gözden geçirme:** MMY, TÇA; **Literatürün gözden geçirilmesi:** MMY, TÇA; **Yazım ve düzeltmeler:** MMY, TÇA.

Çıkar Çatışması

Yazarlar, çıkar çatışması olmadığını beyan eder.

Finansal Destek

Bu araştırma için finansal destek alınmamıştır.

KAYNAKLAR

Amini, H., Ahmadiani, A., & Gazerani, P. (2005). Determination of metformin in human plasma by high-performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences*, 824(1–2), 319–322. <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2005.07.009>

- Antar, S. A., Ashour, N. A., Sharaky, M., Khattab, M., Ashour, N. A., Zaid, R. T., ... & Al-Karmalawy, A. A. (2023). Diabetes mellitus: Classification, mediators, and complications; A gate to identify potential targets for the development of new effective treatments. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 168, 115734. <https://doi.org/10.1016/J.BIOPHA.2023.115734>
- Aydin, İ., ve Narin, İ. (2017). Deksketoprofen trometamol ve diklofenak sodyumun farmasötik örneklerde DAD dedektörlü HPLC ile eşzamanlı tayini. *Sağlık Bilimleri Dergisi*, 26(1), 47–51.
- Bruns, D. E., Ashwood, E. R., & Carl, A. B. (2007). *Fundamentals of Molecular Diagnostics*. Elsevier Health Sciences.
- Cheng, C. L., & Chou, C. H. (2001). Determination of metformin in human plasma by high-performance liquid chromatography with spectrophotometric detection. *Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications*, 762(1), 51–58. [https://doi.org/10.1016/S0378-4347\(01\)00342-5](https://doi.org/10.1016/S0378-4347(01)00342-5)
- da Trindade, M. T., Kogawa, A. C., & Salgado, H. R. N. (2018). Metformin: A Review of Characteristics, Properties, Analytical Methods and Impact in the Green Chemistry. *Critical Reviews in Analytical Chemistry*, 48(1), 66–72. <https://doi.org/10.1080/10408347.2017.1374165>
- Dahlén, A. D., Dashi, G., Maslov, I., Attwood, M. M., Jonsson, J., Trukhan, V., & Schiöth, H. B. (2022). Trends in Antidiabetic Drug Discovery: FDA Approved Drugs, New Drugs in Clinical Trials and Global Sales. *Frontiers in Pharmacology*, 12, 807548. <https://doi.org/10.3389/FPHAR.2021.807548/FULL>
- Eckland, D. A., & Danhof, M. (2000). Clinical pharmacokinetics of pioglitazone. *Experimental and Clinical Endocrinology and Diabetes*, 108(2), 234–242. <https://doi.org/10.1055/s-2000-8525>
- Fung, E. (2008). *Protein Arrays: Methods and Protocols*. Springer Science & Business Media.
- Gault, V. A., & McClenaghan, N. H. (2013). *Understanding Bioanalytical Chemistry: Principles and Applications - Victor A. Gault, Neville H. McClenaghan - Google Kitaplar*. John Wiley & Sons.
- Gillies, P. S., & Dunn, C. J. (2000). Pioglitazone. *Drugs*, 60(2), 333–343. <https://doi.org/10.2165/00003495-200060020-00009/METRICS>
- Görög, S. (2008). Drug safety, drug quality, drug analysis. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 48(2), 247–253. <https://doi.org/10.1016/J.JPBA.2007.10.038>
- Graham, G. G., Punt, J., Arora, M., Day, R. O., Doogue, M. P., Duong, J. K., ... & Williams, K. M. (2011, September). Clinical pharmacokinetics of metformin. *Clinical Pharmacokinetics*, Vol. 50, pp. 81–98. Springer. <https://doi.org/10.2165/11534750-000000000-00000>
- Hubert, P., Nguyen-Huu, J. J., Boulanger, B., Chapuzet, E., Chiap, P., Cohen, N., ... & Rozet, E. (2007). Harmonization of strategies for the validation of quantitative analytical procedures. A SFSTP proposal - Part II. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical*

- Analysis*, 45(1), 70–81. <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2007.06.013>
- International Council for Harmonisation. (2005). *Validation of analytical procedures: Text and methodology Q2(R1)*. <https://www.ich.org/page/quality-guidelines>
- Islambulchilar, Z., Valizadeh, H., & Zakeri-Milani, P. (2010). Rapid HPLC Determination of Pioglitazone in Human Plasma by Protein Precipitation and Its Application to Pharmacokinetic Studies. *Journal of AOAC INTERNATIONAL*, 93(3), 876–881. <https://doi.org/10.1093/jaoac/93.3.876>
- Jain, D., Jain, S., Jain, D., & Amin, M. (2008). Simultaneous estimation of metformin hydrochloride, pioglitazone hydrochloride, and glimepiride by RP-HPLC in tablet formulation. *Journal of Chromatographic Science*, 46(6), 501–504. <https://doi.org/10.1093/chromsci/46.6.501>
- Krieter, P. A., Colletti, A. E., Doss, G. A., & Miller, R. R. (1994). Disposition and metabolism of the hypoglycemic agent pioglitazone in rats. *Drug Metabolism and Disposition*, 22(4), 625–630.
- Lakshmi, K. S., Rajesh, T., & Sharma, S. (2009). Simultaneous determination of metformin and pioglitazone by reversed phase HPLC in pharmaceutical dosage forms. *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*, 1(2), 162–166.
- Musi, N., Hirshman, M. F., Nygren, J., Svanfeldt, M., Bavenholm, P., Rooyackers, O., ... & Goodyear, L. J. (2002). Metformin increases AMP-activated protein-kinase activity in skeletal muscle of subjects with type 2 diabetes. *Diabetes*, 51(7), 2074–2081. <https://doi.org/10.2337/diabetes.51.7.2074>
- Nalbalwar, N. N. (2015). HPLC method development and validation-A general Concept. *International Journal of Chemical and Pharmaceutical Sciences*, 6(1), 8–14.
- Pandit, V., Pai, R. S., Singh, G., Devi, K., Narayana, S., & Suresh, S. (2012). Development and validation of the liquid chromatographic method for simultaneous estimation of metformin, pioglitazone, and glimepiride in pharmaceutical dosage forms. *Pharmaceutical Methods*, 3(1), 9–13. <https://doi.org/10.4103/2229-4708.97707>
- Panigrahy, U. P., & Reddy, A. S. K. (2015). A novel validated RP-HPLC-DAD method for the simultaneous estimation of Metformin Hydrochloride and Canagliflozin in bulk and pharmaceutical tablet dosage form with forced degradation studies. *Orient J Chem*, 31(3), 1489–1507.
- Pernicova, I., & Korbonits, M. (2014). Metformin-mode of action and clinical implications for diabetes and cancer. *Nature Reviews | Endocrinology*, 10, 143–156. <https://doi.org/10.1038/nrendo.2013.256>
- Phung, O. J., Sood, N. A., Sill, B. E., & Coleman, C. I. (2011). Oral anti-diabetic drugs for the prevention of Type 2 diabetes. *Diabetic Medicine*, 28(8), 948–964. <https://doi.org/10.1111/j.1464-5491.2011.03303.x>
- Rena, G., Pearson, E. R., & Sakamoto, K. (2013). Molecular mechanism of action of metformin: old or new insights? *Diabetologia*, 56(9), 1898–1906. <https://doi.org/10.1007/s00125-013-2991-0>
- Saber, A. L. (2008). Determination of pioglitazone hydrochloride in tablets by High-

- Performance Liquid Chromatography. *Pakistan Journal of Analytical & Environmental Chemistry*, 9(2), 118–121.
- Sepici Dinçel, A., ve Eser, B. (2018). Kromatografiye giriş, yüksek performanslı sıvı kromatografi kullanımında basit ipuçları. *Sağlık Hizmetleri ve Eğitimi Dergisi*, 2(2), 51–57. <https://doi.org/10.26567/JOHSE.2018250150>
- Skoog, D. A., Holler, F. J., & Crouch, S. R. (2019). *Principles of instrumental analysis* (6th ed.). Boston, MA: Cengage Learning.
- Snyder, L. R., Joseph, J. K., & Glajch, J. L. (2012). *Practical HPLC Method Development*. John Wiley & Sons.
- Sripalakit, P., Neamhom, P., & Saraphanchotiwitthaya, A. (2006). High-performance liquid chromatographic method for the determination of pioglitazone in human plasma using ultraviolet detection and its application to a pharmacokinetic study. *Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences*, 843(2), 164–169. <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2006.05.032>
- Swartz, M. E., & Krull, I. S. (2012). *Handbook of analytical validation*. CRC Press.
- Sweetman, S. (2010). *Martindale: The Complete Drug Reference Online via Medicines Complete*. Pharmaceutical Press.
- Tache, F., David, V., Farca, A., & Medvedovici, A. (2001). HPLC-DAD determination of Metformin in human plasma using derivatization with p-nitrobenzoyl chloride in a biphasic system. *Microchemical Journal*, 68(1), 13–19. [https://doi.org/10.1016/S0026-265X\(00\)00170-3](https://doi.org/10.1016/S0026-265X(00)00170-3)
- British Pharmacopoeia Commission. (1864). *The British Pharmacopoeia*. London: Spottiswoode & Co.
- Tomic, D., Shaw, J. E., & Magliano, D. J. (2022). The burden and risks of emerging complications of diabetes mellitus. *Nature Reviews Endocrinology* 2022 18:9, 18(9), 525–539. <https://doi.org/10.1038/s41574-022-00690-7>
- Turner, R. (1998). Effect of intensive blood-glucose control with metformin on complications in overweight patients with type 2 diabetes (UKPDS 34). *Lancet*, 352(9131), 854–865. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(98\)07037-8](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(98)07037-8)
- US Food and Drug Administration (US FDA). (2018). Bioanalytical Method Validation Guidance for Industry. Retrieved from <https://www.fda.gov/regulatory-information/search-fda-guidance-documents/bioanalytical-method-validation-guidance-industry>
- Zhang, M., Moore, G. A., Lever, M., Gardiner, S. J., Kirkpatrick, C. M. J., & Begg, E. J. (2002). Rapid and simple high-performance liquid chromatographic assay for the determination of metformin in human plasma and breast milk. *Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences*, 766(1), 175–179. [https://doi.org/10.1016/S0378-4347\(01\)00430-3](https://doi.org/10.1016/S0378-4347(01)00430-3)