

Bioanalisis metabolit gliklazida dalam mikrosom hati manusia dengan metode HPLC

Deskripsi Lengkap: <https://lib.ui.ac.id/detail?id=20334488&lokasi=lokal>

Abstrak

Gliklazida (Gz) adalah obat hipoglikemik oral generasi-2 yang digunakan untuk terapi diabetes mellitus tipe-2. Gliklazida dimetabolisme di liver pada bagian endoplasmik retikulum halus, yang dapat dibuat dalam sediaan mikrosom hati manusia. Mikrosom ini kaya dengan sitokrom P450 (CYP450). Metabolit utama Gz yang terbentuk dalam

mikrosom tersebut adalah 7-OH-Gz, 6-OH-Gz, 6-OH-Gz, dan Me-OH-Gz. Metode HPLC metabolit Gz yang pernah ada dilakukan dengan cara ekstraksi menggunakan pelarut organik. Pada penelitian ini tidak dilakukan ekstraksi, namun dengan pengendapan langsung hasil inkubasi Gz dalam mikrosom hati manusia menggunakan asam perklorat. Namun tipe kolom, fasa gerak, detektor yang digunakan tidak berbeda (dimodifikasi). Untuk menetapkan kadar keempat metabolit utama tersebut diperlukan metode bioanalisis cuplikan hasil metabolisme Gz dalam mikrosom hati manusia. Menentukan kadar keempat metabolit Gz hasil metabolisme dalam mikrosom hati manusia dengan metode HPLC.

Gliklazida dengan kadar 400 µM diinkubasi dalam mikrosom hati manusia menggunakan reagen regenerating pada suhu 37°C selama 90 menit. Reaksi inkubasi diakhiri dengan pendinginan tabung pada suhu 4°C dan

penambahan 10 µl asam perklorat 70%, sebanyak 10 µl, kemudian ditambahkan larutan baku kerja standar internal klopropamid 200 µM sebanyak 20 µl, dipusingkan 14.000 rpm selama 10 menit, supernatan diambil. Sebanyak 200 µl supernatan ditambah larutan NaOH 2 M sebanyak 5 µl, kocok dan dipusingkan 14.000 rpm selama 5 menit. Supernatan sebanyak 65 µl disuntikkan ke kolom HPLC (Beckman), kolom

Ultrasphere ODS 5 µM 4,6 mm x 25 cm, dektektor UV pada 235 nm. Larutan eluen HPLC adalah dapar asetat 5mM (pH 4.3)-Asetonitril (70 : 30), dengan laju alir 1,5 ml/menit. Waktu Retensi 7-OH-Gz, 6-OH-Gz, 6-OH-Gz, Me-OH-Gz, klorpropamida (IS) dan Gliklazida adalah 4,40; 4,58; 5,55; 7,3; 12,30 dan 36 menit (tanpa mikrosom) dan yang dengan mikrosom hanya 3 metabolit Gz yang terukur kromatogramnya, kecuali metabolit 6-OH-Gz. Linieritas, rekoveri, keterulangan, presisi

memenuhi syarat untuk penentuan kadar metabolit Gz dalam mikrosom hati manusia. Metode HPLC untuk bioanalisis metabolit utama 7-OH-Gz, 6-OH-Gz dan Me-OH-Gz merupakan metode yang terpilih dan murah, mudah, cepat serta baik validitasnya.

<hr>

Abstract

Gliclazide (GZ) is oral sulphonylurea-2 generation used for treatment of diabetes mellitus type-2. Gliclazide is metabolized in the smooth endoplasmic reticulum of liver, which can be made in preparation of human liver microsomes. These microsomes rich in cytochrome P450 (CYP450). Major metabolite of GZ in the microsomes are, 7-OH-GZ, 6-OH-GZ;

-OHGz, 6-OH-GZ, and Me-OH-GZ. HPLC method for GZ metabolites was done without extraction by organic solvents, but with direct precipitation GZ incubation results in the human liver microsomes using perchloric acid. The aim of the study is to determine the level of four GZ metabolites in human liver microsomes by HPLC method. Gliclazide 400 µM were incubated in human liver microsomes using regenerating reagent at 37°C for 90 minutes. The reaction were terminated by cooling the incubation tubes at 4°C and the addition of 10 µl perchloric acid 70%, then were added 20 µl solution of internal standard of chlorpropamide 200 µM, were centrifuged 14,000 rpm for 10 minutes, supernatant taken. Then 200 µl supernatant were added 5 µl of 2 M NaOH, were mixed and centrifuged again at 14,000 rpm for 5 minutes. Then 65 µl supernatant were injected into HPLC column

(Beckman), column Ultrasphere ODS 5 µM 4.6 mm x 25 cm, UV detector at 235 nm. HPLC eluent solution was 5mM acetate buffer (pH 4.3)-Acetonitrile (70: 30), with a flow rate of 1.5 ml / min. The retention times of 7-OH-GZ, 6-OH-GZ, 6-OH-GZ, Me-OH-GZ, chlorpropamide (IS) and Gliclazide were 4.40; 4.58; 5.55;7.3; 12.30 and 36 minutes (without microsomes) and that with microsomes only 3

metabolites GZ were measured, except metabolite of 6-OH-GZ. Linearity, recovery, reproducibility, precision were very good for determining metabolites GZ in human liver microsomes. Bioanalysis by HPLC method for the main metabolites of 7-OH-GZ, 6-OH-GZ and Me-OH-GZ were appropriate, because the method were selected, cheap, easy, fast and good validity.