

BIOANALISIS METABOLIT GLIKLAZIDA DALAM MIKROSOM HATI MANUSIA DENGAN METODE HPLC

Suharjono

*Bagian Ilmu Biomedik Farmasi – Fakultas Farmasi Universitas Airlangga
Jl. Dharmawangsa Dalam, Surabaya - 60286*

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 β -OH-GZ, 6 α -OHGz, 6 β -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 μ M 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 μ l perchloric acid 70%, then were added 20 μ l solution of internal standard of chlorpropamide 200 μ M, were centrifuged 14,000 rpm for 10 minutes, supernatan taken. Then 200 μ l supernatan were added 5 μ l of 2 M NaOH, were mixed and centrifuged again at 14,000 rpm for 5 minutes. Then 65 μ l supernatant were injected into HPLC column (Beckman), column Ultrasphere ODS 5 μ M 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 β -OH-GZ, 6 α -OHGz, 6 β -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 α -OHGz. 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 β -OH-GZ, 6 β -OH-GZ and Me-OH-GZ were appropriate, because the method were selected, cheap, easy, fast and good validity.

Keywords : *Gliclazide metabolites - human liver microsomes - HPLC*

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 β -OH-Gz, 6 α -OHGz, 6 β -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 μ M diinkubasi dalam mikrosom hati manusia menggunakan reagen regenerasi pada suhu 37°C selama 90 menit. Reaksi inkubasi diakhiri dengan pendinginan tabung pada suhu 4°C dan penambahan 10 μ l asam perklorat 70%, sebanyak 10 μ l, kemudian ditambahkan larutan baku kerja standar internal klorpropamid 200 μ M sebanyak 20 μ l, dipusingkan 14.000 rpm selama 10 menit, supernatan diambil. Sebanyak 200 μ l supernatan ditambah larutan NaOH 2 M sebanyak 5 μ l, kocok dan dipusingkan 14.000 rpm selama 5 menit. Supernatan sebanyak 65 μ l disuntikkan ke kolom HPLC (Beckman), kolom Ultrasphere ODS 5 μ M 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 β -OH-Gz, 6 α -OHGz, 6 β -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 α -OHGz. Linieritas, rekovery, keterulangan, presisi memenuhi syarat untuk penentuan kadar metabolit Gz dalam mikrosom hati manusia. Metode HPLC untuk bioanalisis metabolit utama 7 β -OH-Gz, 6 β -OH-Gz dan Me-OH-Gz merupakan metode yang terpilih dan murah, mudah, cepat serta baik validitasnya.

Kata kunci : *Gliklazid - metabolit - mikrosom hati manusia - HPLC.*

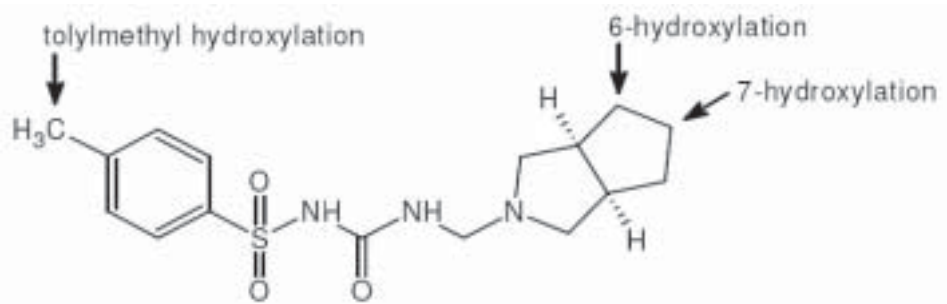
PENDAHULUAN

Gliklazida (Gz) adalah salah satu oral antidiabetik sulfonilurea generasi 2. Obat ini bekerja dengan cara menurunkan kadar glukosa darah pada penderita DM dengan merang-

sang sekresi insulin endogen dari sel β pankreas dan penurunan produksi basal glukosa hepatik serta peningkatan aksi insulin perifer postreseptor (1).

Metabolisme Gz terutama terjadi di hati. Sejauh ini studi metabolisme

Sudah dipresentasikan di Kongres Ilmiah ISFI XV, 17-19 Juni 2007, Jakarta.



Gambar 1. Posisi hidroksilasi Gz (2)

Gz yang sudah pernah dilaporkan adalah menggunakan urin tikus/ mencit/penderita DM dan mikrosom hati tikus, namun belum ada yang meneliti metabolisme Gz menggunakan mikrosom hati manusia (MHM). Untuk menentukan kadar metabolit Gz yang terbentuk digunakan metode HPLC.

Gliklazida dalam mikrosom MHM akan mengalami metabolisme menjadi 4 metabolit, yaitu metilhidroksi Gz (Me-OH-Gz), 6 α -OH-Gz, 6- β -OHGz dan 7-OH-Gz. (2). Metode bioanalisis metabolit Gz dalam cuplikan biologic menggunakan metode HPLC, yang sebelumnya oleh peneliti (3) terdahulu dilakukan dengan cara ekstraksi menggunakan pelarut organik diklormetan, untuk memisahkan dari Gz utuhnya. Hal ini akan berakibat lebih mahalnya biaya analisis, lebih lama pengerjaannya, diperlukan jumlah cuplikan yang lebih banyak dan melelahkan serta hasilnya kurang reproduksibel. Penetapan kadar metabolit golongan sulfonilurea lainnya seperti halnya glibenklamida untuk preparasinya bisa juga dikerjakan tanpa ekstraksi

dengan pelarut organik, namun metabolit yang terbentuk setelah inkubasi dalam MHM dapat dipisahkan dari protein dan senyawa pengganggu lainnya dengan pengendap protein berupa asam perklorat 70%. Sedang fase gerak dan laju alirnya sama dengan metode Miners et al (3). Modifikasi ini dilakukan setelah dilakukan percobaan penelitian bioanalisis sebelumnya.

METODOLOGI

Bahan kimia

Gliklazid, dan 4 metabolit Gz terbesar, yaitu : 1. 7 β -OH-Gz; 2. 6 α -OHGz; 3. 6 β -OH-Gz; 4. Me-OH-Gz (semua bahan berasal dari *Technologies Servier, France*), 5. Klorpro-pamida (standar internal = IS), glukosa-6-fosfat, glukosa-6-fosfat-dehidrogenase, β -NADP⁺, *Bovine Serum Albumin* (BSA) (semua dari *Sigma Chemical Co, St Louis, USA*), Asetonitril pro HPLC, asam perklorat p.a, Natrium hidroksida p.a, Natrium dihidro genfosfat p.a, Dinatriumhydrogen fosfat (*Analar, Australia*).

Sudah dipresentasikan di Kongres Ilmiah ISFI XV, 17-19 Juni 2007, Jakarta.

Instrumen Penelitian

Alat gelas, pH meter, peralatan operasi, alat homogenat, *shaker water bath*, *counting clock*, *Finn pipet*, timbangan analitik *microcahn*, HPLC *Pump Beckman 114M Solvent Dehatiy Module*, Detektor *LC 1200 UV/VIS ICI Instrument*, Rekorder *SE 120 BBC-Goetz-Metrawatt*, Kolom *Ultrasphere ODS 5 µM 4,6 mm x 25 cm – Beckman Coulter-USA*, *Ultra Turax^R T25*, *Potter-Elvehjem*, alat Ultracentrifugus suhu dingin : *Beckman J2-21 M/E centrifuge* dan *Beckman LS-70M Ultracentrifuge*.

Lokasi Penelitian

Di Laboratorium Farmakologi Molekular, Departemen Farmakologi Klinik, *Flinders Medical Centre – Adelaide* – Australia Selatan.

Bioanalisis HPLC metabolit Gz

Hasil inkubasi dengan MHM yang mengandung produk metabolit Gz atau yang ditambahkan pada blanko diendapkan proteinnya dengan penambahan 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 (besar volume kolom 50µl). Kromatogram dari metabolit-metabolit Gz dan standar internal klopropamid dihitung tingginya masing-masing

dan rasio tinggi metabolit Gz terhadap klopropamid. Larutan eluen HPLC adalah dapar asetat 5mM (pH 4,3)-Asetonitril (70 : 30), dengan laju alir 1,5 ml/menit dan detektor UV pada 235 nm (3, 4).

Keterulangan metode analisis 3 metabolit dilakukan dengan kadar 1 µM dan 7 µM, untuk antar hari, didapatkan hasil dengan KV % masing-masing kadar 1 µM dan 7 µM untuk 7-OH-Gz (4.1 dan 2.4 %), 6-OH-Gz (4.9 dan 3.5 %) dan Me-OHGz (9.9 % dan 6.1 %) memenuhi syarat untuk penelitian ini karena KV < 10% (FDA, 2001).

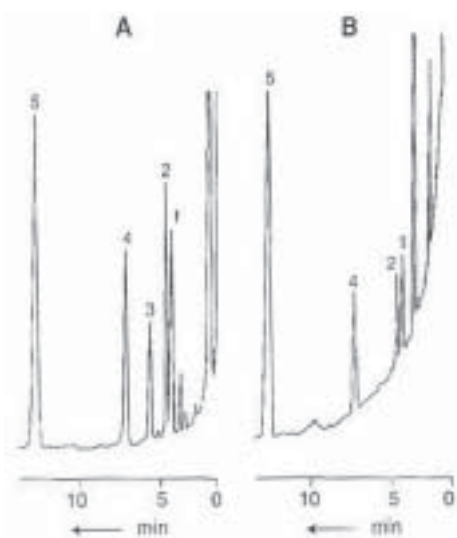
Dari harga KV yang didapat 1,9-9,8 % < 10%, menunjukkan bahwa metode ini mempunyai keterulangan yang cukup baik (5).

Tabel 1. Waktu Retensi metabolit Gz, IS dan Gz

Nama bahan	Waktu retensi(menit)
7β-OH-Gz	4,40
6β-OH-Gz	4,58
6α-OH-Gz*	5,55
Me-OH-Gz	7,3
Klorpropamid	12,30
Gliklazid	36

Gambar 2 menjelaskan waktu retensi, yang ada kaitannya dengan sifat lipofilisitas dan respons kromatogram masing-masing metabolit Gz, A (tanpa MHM) dan B (dengan MHM). Dari respon kromatogram tersebut, kadar 6α-OH-Gz yang terbentuk dari hasil inkubasi relatif sangat kecil, maka selanjutnya tidak dianalisis.

Sudah dipresentasikan di Kongres Ilmiah ISFI XV, 17-19 Juni 2007, Jakarta.



Gambar 2. Kromatogram HPLC :
 A.metabolit Gliklazid dan internal standar dalam kurva baku; B. metabolit Gz dari hasil inkubasi dengan MHM : 1.7 β -OH-Gz; 2.6 β -OH-Gz; 3.6 α -OH-Gz*; 4.Me-OH-Gz; 5.Klorpropamid (IS)

Linieritas kurva baku metabolit Gliklazid

Linieritas kurva baku ditentukan dengan larutan baku kerja 3 metabolit dalam *regenerating system* tanpa MHM, prosedur sama seperti pada penentuan kadar metabolit dalam MHM. Rentang kadar ketiga metabolit adalah 0,1 , 2, 5, 7 dan 10 μ M (berarti masing-masing metabolit Gz adalah ekuivalen dengan kadar 0, 339,4; 678,8; 1697; 2375,8 dan 3394 μ g/ml. Fase gerak aseto nitril : dapar asetat 0.1 M pH= 4,3 (30:70). 3 metabolit yang terbentuk selama inkubasi Gz dengan kadar 0 - 2000 μ M dalam MHM. Rasio tinggi kromatogram 3 metabolit terhadap IS dari 2 replikasi, pada Tabel 2.

Tabel 2. Rasio Tinggi 3 metabolit Gz / IS vs kadar metabolit untuk penentuan linieritas kurva baku (tanpa MHM)*

Kadar Metabolit (μ M)	Purata Rasio Tinggi Metabolit / IS		
	7 β -OH-Gz	6 α -OH-Gz	Me-OH-Gz
0	0	0	0
1	0.599	0.583	0.464
2	1.213	1.204	1.002
5	2.75	2.71	2.228
7	4.041	3.983	3.238
10	5.363	5.329	4.325

* replikasi 2 kali

Persamaan kurva : Kadar metabolit (0 - 10 μ M) vs rasio tinggi puncak kromatogram metabolit /IS, untuk :

7-OH-Gz, $y = 0,6614 x$; $r^2 = 0,9968$
 $(r = 0,9984) > r \text{ tabel} = 0,754$ ($p < 0,05$; db = 5)

7-OH-Gz, $y = 0,5391x$; $r^2 = 0,9985$
 $(r = 0,9985) > r \text{ tabel} = 0,754$ ($p < 0,05$; db = 5)

6-OH-Gz, $y = 0,5459 x$; $r^2 = 0,9973$
 $(r = 0,9986) > r \text{ tabel} = 0,754$ ($p < 0,05$; db = 5)

Me-OH-Gz, $y=0,4443 x$, $r^2 = 0,9969$
 $(r = 0,9984) > r \text{ tabel} = 0,754$ ($p < 0,05$; db = 5)

Linieritas kurva rekoveri metabolit Gliklazid dengan MHM

Kadar metabolit Gz dalam MHM yang dida patkan kembali (rekoveri) dari kadar 0, 1, 2, 5, 7, 10 μ M pada Tabel 3.

Karena prosen rekoveri $< 10 \%$, maka menurut *Bioanalysis Guidance* (FDA, 2001), dengan rentang reko-

Sudah dipresentasikan di Kongres Ilmiah ISFI XV, 17-19 Juni 2007, Jakarta.

Tabel 3. Rasio Tinggi 3 metabolit Gz / IS vs kadar metabolit untuk penentuan linieritas rekoveryi menggunakan MHM*

Kadar Metabolit (µM)	Purata Rasio Tinggi Metabolit / IS		
	7β-OH-Gz	6α-OH-Gz	Me-OH-Gz
0	0	0	0
1	0.521	0.517	0.427
2	1.076	0.989	0.909
5	2.698	2.693	2.214
7	3.979	3.584	3.289
10	5.248	5.206	4.63

veri 82.1 – 107,1 dan KV < 10 %, ada ($r = 0,9984$) > r tabel = 0,754 ($p < 0,05$; db = 5)

6-OH-Gz, $y = 0,5202 x$; $r^2 = 0,9993$ ($r = 0,9986$) > r tabel = 0,754 ($p < 0,05$; db = 5)

Me-OH-Gz, $y = 0,4617 x$; $r^2 = 0,9992$ ($r = 0,9984$) > r tabel = 0,754 ($p < 0,05$; db = 5)

Rekoveryi Metabolit Gz

Kadar metabolit Gz dalam MHM yang didapatkan kembali (rekoveryi) dari kadar 0, 1, 2, 5, 7, 10 µM pada Tabel 4.

korelasi linier antara rasio tinggi 3 metabolit/IS terhadap kadar metabolit yang ditambahkan, sehingga memenuhi syarat untuk dapat digunakan dalam metode bioanalisis metabolit Gz selanjutnya %,

Presisi

Penentuan presisi alat dilakukan dengan kadar 2 dan 5 µM untuk 3 metabolit dengan replikasi 5 kali, dalam hari yang sama, didapat hasil Tabel 5.

Tabel 4. Rasio Tinggi 3 metabolit Gz / IS vs kadar metabolit untuk penentuan linieritas rekoveryi menggunakan HLM*

Kadar (µM)	7β-OH-Gz (%)	6β-OH-Gz (%)	MeOH-Gz (%)
1	86,9	88,7	92,0
2	88,7	82,1	90,7
5	99,6	99,4	99,4
7	99,9	89,9	101,6
10	97,9	97,7	107,1
Purata	94,6	91,6	98,2
+ SD	6,2	7,0	6,8
KV(%)	6,6	7,7	6,9

* replikasi 2 kali

Metode untuk penentuan 3 metabolit Gz dengan kadar 2 dan 5 µM, didapat % KV untuk metabolit 7-OH-Gz (4,3 dan 6,1 %), 6-OH-Gz (3,3 dan 4,0 %) dan Me-OH-Gz (8,5 dan 6,8 %) memenuhi syarat, karena KV % < 10 % (FDA, 2001).

Repeatabilitas (Keterulangan)

Penentuan keterulangan dapat dilakukan dengan menentukan rasio tinggi meta bolit / IS terhadap kadar metabolit pada hari yang berbeda (*interday*) dan dihasilkan data seperti dalam Tabel 6.

Keterulangan metode analisis 3 metabolit dilakukan dengan kadar 1 µM dan 7 µM, untuk antar hari, didapatkan hasil dengan KV % masing-masing kadar 1 µM dan 7 µM untuk 7-OH-Gz (4.1 dan 2.4 %), 6-OH-Gz (4.9 dan 3.5 %) dan Me-OHGz (9.9 % dan 6.1 %) memenuhi syarat untuk penelitian ini karena KV < 10% (FDA, 2001). Dari harga KV yang didapat 1,9-9,8 % < 10 %, menunjukkan bahwa metode ini mempunyai

Sudah dipresentasikan di Kongres Ilmiah ISFI XV, 17-19 Juni 2007, Jakarta.

Tabel 5. Rasio tinggi metabolit/IS dari Metabolit Gz kadar 2 dan 5 μM untuk penentuan presisi

Rasio Tinggi Metabolit / IS			
Kadar (μM)/n	7 β -OH-Gz	6 β -OH-Gz	Me-OH-Gz
2 μM n= 1	1,000	1,013	0,813
2	1,086	1,057	0,986
3	1,133	1,063	0,839
4	1,155	1,121	0,94
5	1,11	1,098	0,817
X	1,108	1,077	0,886
SD	0,048	0,035	0,075
KV (%)	4,320	3,290	8,471
5 μM n= 1	3,000	2,958	2,417
2	2,679	2,643	2,036
3	3,077	2,846	2,154
4	2,932	2,886	2,409
5	2,700	2,733	2,233
X	2,864	2,797	2,231
SD	0,173	0,113	0,152
KV (%)	6,057	4,041	6,832

Tabel 6. Keterulangan Rasio Tinggi 3 metabolit/IS dari 2 Kadar metabolit (1 dan 7 μM)

Rasio Tinggi Metabolit / IS			
Kadar (μM)/Hari	7 β -OH-Gz	6 β -OH-Gz	Me-OH-Gz
1 μM Hari= 1	0,519	0,488	0,363
2	0,530	0,506	0,463
3	0,543	0,546	0,414
4	0,493	0,495	0,418
X	0,521	0,508	0,415
SD	0,021	0,025	0,041
KV (%)	4,074	4,897	9,866
7 mM Hari= 1	3,469	3,281	2,563
2	3,500	3,469	2,688
3	3,655	3,517	2,759
4	3,593	3,556	2,963
5			
X	3,554	3,456	2,743
SD	0,085	0,122	0,167
KV (%)	2,402	3,525	6,103

keterulangan yang cukup baik (FDA, 2001).

KESIMPULAN

Dalam penelitian ini telah dilakukan penelitian pendahuluan dengan cara ekstraksi menggunakan metode sebelumnya memakai diklorometan, namun hasilnya sangat kurang bagus sehingga dicari modifikasi metode tanpa ekstraksi. Dari hasil penelitian tanpa ekstraksi ini ternyata bila dibandingkan dengan metode HPLC untuk penetapan kadar metabolit Gz cara ekstraksi

hasilnya lebih reproduibel, cepat, murah, mudah, tidak memerlukan jumlah cuplikan yang lebih banyak dan validitasnya dapat diterima.

UCAPAN TERIMAKASIH

Kepada Prof. Donald J. Birkeet dan Prof. John O. Miners, suervisor saya di Departemen Farmakologi Klinik, Flinders Medical Centre, Bedford Park, Adelaide, South Australia yang memberikan kesempatan untuk melakukan penelitian di laboratoriumnya.

Sudah dipresentasikan di Kongres Ilmiah ISFI XV, 17-19 Juni 2007, Jakarta.

DAFTAR PUSTAKA

1. Kuhlmann dan Puls. 1996. **Oral Antidiabetics**, Springer-Verlag, Berlin, pp 65-128, 161-184.
2. Taylor AR, RD Brownsill, H Grandon, F Lefoulon, A Petit, W Luijten, PG Kopelman, B Walther B. 1996. Synthesis of Putative Metabolites and Investigation of the Metabolic Fate of Gliclazide [1-(3-Azabicyclo (3,3,0)Oct-3-yl)-3-(4-Methyl-phenylsulfonyl)urea] in Diabetic Patients. *Drug Metab Disp* **24**(1): 55-64.
3. Miners JO, KJ Smith, RA Robson. 1988. Tolbutamide Hydroxylation by Human Liver Microsomes. Kinetics Characterization and Relationship to Other CYP 450 Dependent Xenobiotic Oxidation. *Biochem Pharmacol* **37**(6): 1137-1144.
4. Ricutord A, I Stupansi, GM Shenfield, AS Gross. 1995. Gliclazide Hydroxylation by Rat Liver Microsomes. *Xenobiotica* **25** (12): 135-1354.
5. FDA. 2001. **Guidance for Industry Bioanalytical Method Validation**. U.S. Department of Health and Human Services Food and Drug Administration Center for Drug Evaluation and Research (CDER). Center for Veterinary Medicine (CVM), pp 1-20.