(مقاله پژوهشی)

تعیین سطح گلی‌کلازید در پلاسما با استفاده از روش کروماتوگرافی مایع با کارآیی بالا با آشکارسازی فتودیود آرایه‌ای

میثم صابری[۱]، زهرا رمضانی[۲*]، علی‌حسین صابری[۳]، حمیرا رشیدی[۴]

۱-دانشجوی دکتری حرفه ای داروسازی.
۲- استادیار گروه شیمی دارویی.
۳- دانشیار گروه ژنتیک.
۴-دانشیار گروه داخلی مرکز تحقیقات دیابت.

۱-دانشکده داروسازی، دانشجوی دکتری حرفه ای داروسازی، دانشگاه علوم پزشکی جندی شاپور اهواز، اهواز، ایران.
۲-گروه شیمی دارویی، دانشکده داروسازی، دانشگاه علوم پزشکی جندی شاپور اهواز، اهواز، ایران.
۳-گروه ژنتیک، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی جندی شاپور اهواز، اهواز، ایران.
۴-مرکز تحقیقات دیابت، پژوهشکده سلامت، دانشگاه علوم پزشکی جندی شاپور اهواز، اهواز ایران.

*نویسندهٔ مسؤول:
زهرا رمضانی؛ گروه شیمی دارویی، دانشکده داروسازی، دانشگاه علوم پزشکی جندی شاپور اهواز، اهواز، ایران.
تلفن: ۰۰۹۸۹۱۷۷۱۶۱۰۱۷
Email: meisams1991@gmail.com

چکیده

زمینه و هدف: در این مطالعه یک روش کروماتوگرافی مایع با کارآیی بالا (HPLC) برای تعیین سطح غلظت گلی کلازید در پلاسما ارایه شده است. استفاده از دتکتور فتودیود آرایه ای (PDA) امکان تعیین خلوص پیک جدا شده را فراهم می کند.

روش بررسی: فاز متحرک استفاده شده در این تحقیق بافر فسفات با PH=3.5 و استونیتریل به نسبت ۱:۱ بوده است. برای تعیین دقت و تکرار پذیری روش، ۴ غلظت استاندارد ۴۰۰، ۲۰۰، ۱۰۰ و ۵۰ نانوگرم بر لیتر از گلی‌کلازید در پلاسما مورد استفاده قرار گرفت.

یافته ها: منحنی کالیبراسیون در ناحیه ۵۰ تا ۴۰۰ نانوگرم بر میلی لیتر می باشد. پیک مربوط به گلی کلازید در ۳,۶ دقیقه توسط دتکتور فتودیود شناسایی می شود. میزان حد تشخیص (LOD) و حد تعیین کمی (LOQ) در این روش به ترتیب ۲۳ نانوگرم بر میلی لیتر و ۵۰ نانوگرم بر میلی لیتر محاسبه شده است.

نتیجه گیری: ارزیابی صحت و دقت روش پیشنهادی نشان داد که این روش توانایی تعیین مقدار گلی کلازید را در پلاسما دارد و روش قابل اعتماد و سریعی می باشد.

واژه‌های کلیدی: کروماتوگرافی مایع با کارآیی، فتودیود آرایه ای (PDA)، گلی‌کلازید.

دریافت مقاله: ۱۳۹۶/۱۱/۲۹ دریافت مقالهٔ اصلاح‌شده: ۱۳۹۷/۳/۷ اعلام قبولی: ۱۳۹۷/۳/۷

مقدمه

گلی‌کلازید یک سولفونیل اوره موثر و از نسل دوم است که در درمان دیابت نوع ۲ استفاده می شود. این دارو ترشح انسولین را تحریک می‌کند بنابراین برای بیماران دیابت نوع ۲ مفید است(۱). جذب خوراکی آن در بیماران و افراد سالم (غیر دیابتی) شبیه است، هرچند، در زمان رسیدن به حداکثر (T_{max}) غلظت آن در پلاسما (C_{max}) در سنین مختلف، تفاوت‌هایی مشاهده شده است. دوز خوراکی آن ۴۰ تا ۱۲۰ میلی گرم، مقدار C_{max} آن ۲,۲ تا ۸ میلی گرم در لیتر در مدت زمان ۲ تا ۸ ساعت متغیر می باشد. ۲ روزبعد ازمصرف ۴۰ تا ۱۲۰ میلی‌گرم گلی‌کلازید غلظت آن به سطح درمانی می‌رسد(۲). حجم توزیع گلی‌کلازید در افراد سالم و بیمار زیاد نیست (۱۳ تا ۲۴ لیتر) که ممکن است بخشی از آن با پیوند پروتئینی (۸۵ تا ۹۷٪) توضیح داده شود(۳). نیمه عمر حذف ($T_{1/2}$) گلی‌کلازید پس از تجویز خوراکی دوزهای ۴۰ تا ۱۲۰ میلی گرم برای داوطلبان سالم و بیمار ۸,۱ تا ۲۰,۵ ساعت است(۲, ۴). روش‌های مختلفی برای اندازه‌گیری آن در بافت‌های مختلف ارایه شده است(۵, ۶). کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا به دلیل کاهش حد تشخیص و جدا کردن اجزا موجود در بافت‌های پیچیده مانند پلاسما و ادرار به عنوان یک روش مناسب برای اندازه‌گیری پیشنهاد شده است(۷, ۸). در این مطالعه یک روش کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا برای ارزیابی گلی‌کلازید در سرم انسان مورد استفاده قرار گرفته است. در این روش از کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا و دتکتور فتودیود آرایه‌ای استفاده شده است که این دتکتور توانایی تعیین خلوص پیک دارو را دارد. این روش همچنین می تواند در مطالعات فارماکوکینتیک گلی‌کلازید مورد استفاده قرار داد.

روش بررسی

مواد شیمیایی و واکنش دهنده ها:

گلی‌کلازید استاندارد از شرکت داروسازی عبیدی به عنوان هدیه دریافت شد. متانول، استونیتریل، پتاسیم دی هیدروژن فسفات و اسید فسفریک از شرکت مرک آلمان خریداری شدند. از آب دوبار تقطیر و دیونیزه برای تهیه فاز متحرک و محلول‌سازی استفاده شد. همه مواد بکار برده شده دارای خلوص کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا بودند.

شرایط کروماتوگرافی

استونیتریل و بافر فسفات به غلظت ۲۵ میلی‌مول در pH=3.5 به ترتیب با نسبت ۶۰ به ۴۰ ترکیب می‌شوند. قبل از استفاده به عنوان فاز متحرک، گاز زدایی (degass) انجام می‌شود. فاز متحرک بصورت ایزوکراتیک با فشار ۱میلی‌لیتر در دقیقه به دستگاه پمپ شد و طول موج تشخیص در دمای اتاق ۲۵۳ نانومتر تنظیم گردید. طیف UV-vis در هر زمان در ناحیه طول موجی ۲۰۰ تا ۶۰۰ نانومتر ثبت گردید.

محلول‌های استاندارد

محلول ۱۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر با حل کردن ۱۰ میلی‌گرم گلی کلازید استاندارد در ۱۰۰ میلی‌لیتر استونیتریل:آب به نسبت ۱:۱ تهیه شد. این محلول در دمای منفی ۲۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳ ماه پایدار می‌باشد. محلول‌های مختلف در ناحیه غلظتی ۵۰ تا 400 نانوگرم بر لیتر جهت رسم منحنی کالیبراسیون و استفاده‌های بعدی با رقت مرحله به مرحله تهیه شد.

آماده سازی نمونه پلاسما

در میکروتیوب‌های ۲میلی لیتری به ۵۰۰ میکرولیتر از پلاسما ۱ سی‌سی استونیتریل جهت رسوب پروتئین‌های پلاسما اضافه شد. لوله‌ها به مدت ۳۰ ثانیه ورتکس شده و سپس به مدت ۸ دقیقه با دور g ۵۰۰۰ در سانتریفوژ پروتیین-ها جدا شدند. سپس محلول رویی به تیوب تمیز منتقل و

دوباره با همان دور به مدت ۲ دقیقه سانتریفوژ شد. در نهایت محلول حاصل به دستگاه تزریق گردید.

ارزیابی روش آنالیزی

جهت ارزیابی روش کروماتوگرافی با کارایی بالا، دقت و صحت روش مورد بررسی قرار گرفت. برای تعیین دقت و تکرار پذیری روش، ۴ غلظت استاندارد ۴۰۰، ۲۰۰، ۱۰۰ و ۵۰ نانوگرم بر لیتر از گلی‌کلازید در پلاسما در طی یک روز، سه بار تهیه شدند و بعد از آماده‌سازی نمونه‌ها و تزریق به HPLC، سطح زیر منحنی گلی‌کلازید محاسبه شد و با توجه به منحنی استاندارد سطح زیر پیک گلی‌کلازید به غلظت تبدیل شد. در نهایت درصد ضریب تغییرات که معرف دقت و درصد خطا که نمایانگر تکرار پذیری روش است محاسبه شد. صحت نتایج با تعیین درصد بازیافت از فرمول ۱ تعیین گردید.

۱۰۰× غلظت استاندارد اضافه شده/ غلظت بدست آمده =درصد بازیافت (فرمول ۱)

بدین منظور غلظت‌های استاندارد ۴۰۰، ۲۰۰، ۱۰۰و ۵۰ نانوگرم بر میلی‌لیتر از گلی‌کلازید در پلاسما در طی سه روز مختلف، هر بار یک سری تهیه شدند و پس از آماده‌سازی نمونه‌ها و تزریق به HPLC، با استفاده از نتایج از غلظت‌های تهیه شده در روزهای مختلف ضریب تغییرات و ضریب خطا مشخص شدند. صحت با استفاده از فرمول ۱ بدست آمد.

بحث

پیک مربوط به گلی‌کلازید در ۳/۶ دقیقه توسط دتکتور فتودیود شناسایی می‌شود (شکل۱). زمان آنالیز برای هر نمونه پلاسما ۱۰ دقیقه می‌باشد. منحنی کالیبراسیون در ناحیه غلظتی ۵۰ تا ۴۰۰ نانوگرم بر میلی‌لیتر رابطه خطی خوبی با فرمول $y = 28.029x + 212.74$ و R^2=۰,۹۹۸ بین نسبت سطح پیک و غلظت پلاسما در محدوده ۵۰ تا ۴۰۰ نانوگرم بر میلی-لیتر گلی‌کلازید بدست آمد. منحنی کالیبراسیون از طریق منشا عبور می کند که استفاده از کالیبراسیون تک نقطه را توجیه می کند. منحنی کالیبراسیون در شکل ۲ آمده است. ضریب تغییرات interday و intraday که بیانگر دقت داده‌ها می-باشد کمتر از ۲ درصد بوده است. در محدوده غلظت ۵۰ تا ۴۰۰ نانوگرم بر میلی‌گرم صحت intraday از۹۵,۵۷ تا ۱۰۶,۶۶ درصد متغیر و صحت interday بین ۹۵,۷۴ تا ۱۰۶,۴۸ درصد بود (جدول ۱).

بنابراین روش HPLC توصیف شده در اینجا صحیح ، دقیق و قادر به تعیین غلظت گلی‌کلازید در حجم های کوچک سرم انسان می‌باشد و روش خالص‌سازی گلی‌کلازید هم در این مطالعه ساده می‌باشد. در روش MARIA-CRISTINA RANETTI زمان شناسایی پیک گلی-کلازید بیش از ۱۰ دقیقه است، همچنین از متانول و استونیتریل برای فاز متحرک استفاده شده است که pH آن تحت تاثیر شرایط آزمایشگاهی قرار میگیرد. در این مطالعه اماده‌سازی پلاسما برای تزریق به دستگاه روند پیچیده‌ای دارد(۹)، درصورتی که زمان شناسایی پیک مطالعه حاضر کمتر از ۵ دقیقه می باشد. فاز متحرک در مطالعه کنونی از استونیتریل و محلول بافری تهیه شده است که ماندگاری بالایی دارد، در صورتی که در مطالعه Venkatesh از سه محلول فرمیک اسید، استونیتریل و متانول استفاده شده است(۱۰). در مطالعه حاضر حد تشخیص بسیار کمتر از مطالعاتی است که با اسپکتروسکوپی و حتی HPLC انجام داده‌اند. با مقایسه جدول ۲ می‌توان به برتری نسبی این مطالعه نسبت به مطالعات گذشته پی برد. روش‌های HPLC ذکر شده در این جدول نیز از آشکارساز uv معمولی استفاده شده است. دتکتور مطالعه حاضر دتکتور دیود آرایه‌ای است که قادر به تعیین طیف uv/vis ماده در زمان‌های مختلف است و می‌توان خلوص پیک و عدم همپوشانی پیک‌های دیگر پلاسما را روی پیک گلی‌کلازید نشان دهد چنانچه از شکل ۲ مشخص است پیک گلی‌کلازید در زمان بازداری ۳/۶

خالص بوده و همپوشانی دیگر اجزا پلاسما در آن مشاهده نمی‌شود. در نهایت، روش پیشنهادی ساده، سریع و حساس است و می تواند به راحتی در مطالعات فارماکوکینتیک، آنالیزی و تشخیصی مورد استفاده قرار گیرد. علاوه بر آن دتکتور PDA استفاده شده خلوص پیک کروماتوگرافی را تایید می‌کند.

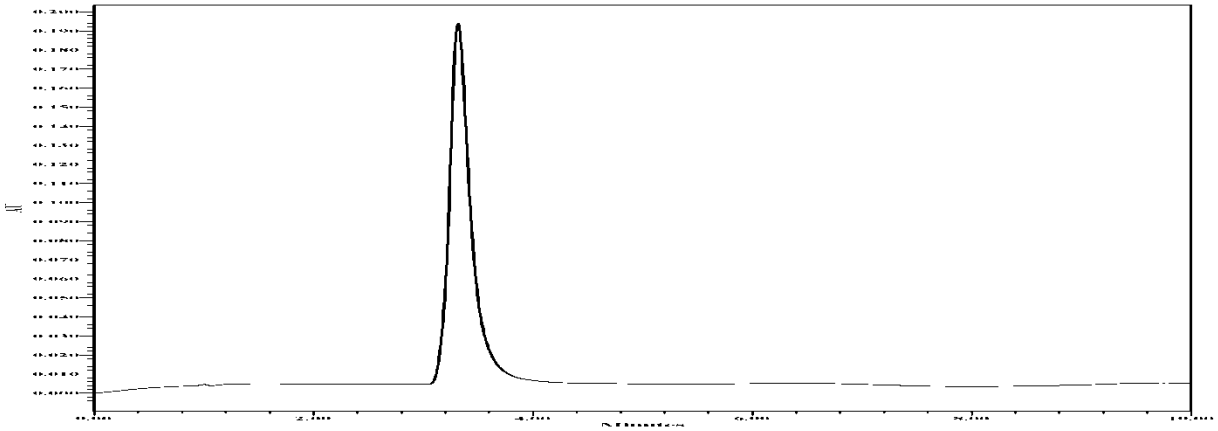
جدول۱: ضریب تغییرات و صحت داده‌های اندازه‌گیری شده در روزهای مختلف و در زمانهای مختلف در طول یک روز

دارو	غلظت اضافه شده (ng/ml)	intraday			interday		
		غلظت مشاهده شده (ng/ml)	درصدضریب تغییرات (CV)	درصد صحت	غلظت مشاهده شده (ng/ml)	درصدضریب تغییرات (CV)	درصد صحت
گلی-کلازید	۵۰	53.33	۱,۰۲	106.66	53.24	۱,۷۵	106.48
	۱۰۰	95.57	۱,۶۵	95.57	97.91	۱,۱۴	97.91
	۲۰۰	191.15	۱,۴۳	95.55	191.48	۱,۹۶	95.74
	۴۰۰	385.04	۱,۰۶	96.26	387.47	۲,۰	96.86

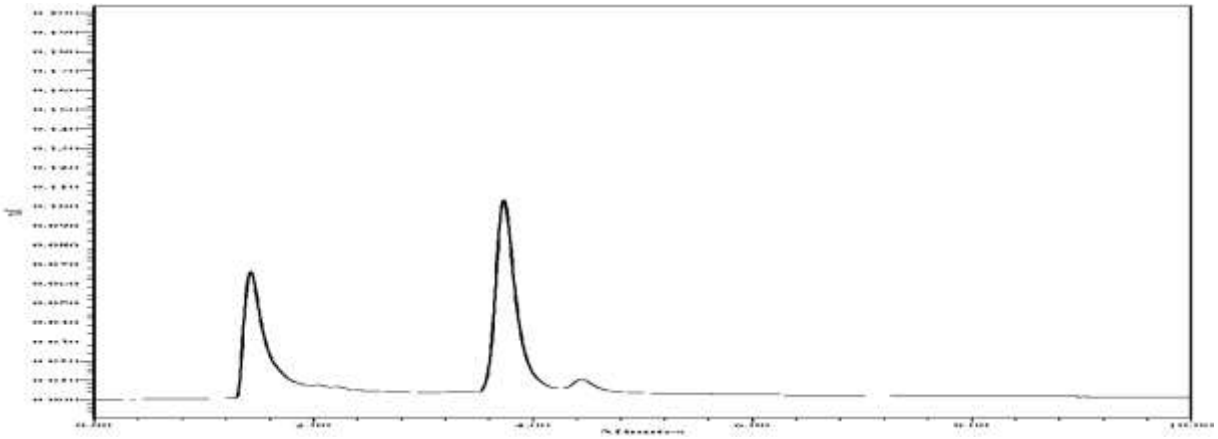
جدول ۲: مقایسه نتایج این روش با روش‌های دیگر

رفرنس	نوع بافت	نوع فاز متحرک	حد تشخیص (نانوگرم بر میلی‌لیتر)	رنج خطی (نانوگرم بر میلی‌لیتر)	روش
(۱۱)	در فرمولاسیون دارویی	N/A	۳۱۰	7000-2700	اسپکتروسکوپی-UV
(۱۲)	در فرمولاسیون دارویی	بافر فسفات در pH=6.8	44.1	1000-5000	اسپکتروسکوپی-UV
(۹)	پلاسما	متانول:استونیتریل	49	50-500	HPLC-UV
(۱۰)	پلاسما	فرمیک اسیدpH=3، استونیتریل:اب، آب:متانول	N/A	300-100000	HPLC-UV
مطالعه حاضر	پلاسما	بافر فسفات در pH=3.5:استونیتریل	23	50-500	HPLC-DPA

HPLC: High-performance liquid chromatography, UV: Ultraviolet, N/A: Not Available

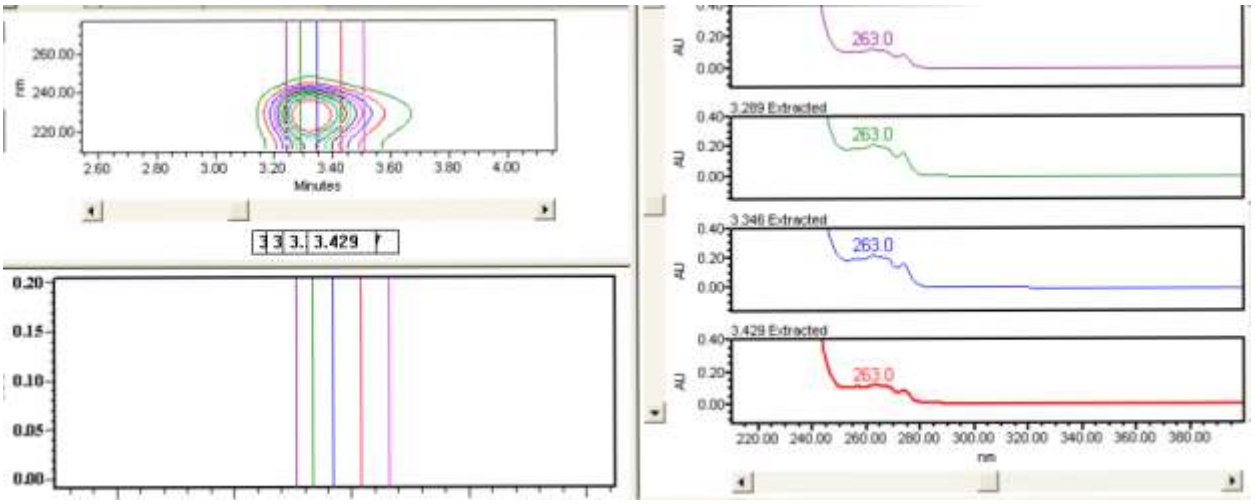


الف



ب

شکل ۱: الف) پیک گلی کلازید استاندارد ب) پیک گلی‌کلازید در سرم



شکل ۲: تعیین خلوص گلی‌کلازید که با استفاده از دتکتور PDA که در زمان‌های مختلف دارای یک نوع پیک و طول موج را نشان می‌دهد.

منابع

1-Bressler R, Johnson DG. Pharmacological Regulation of Blood Glucose Levels in Non—Insulin-Department Diabetes Mellitus. Archives of internal medicine. 1997;157(8):836-48.
2-Palmer KJ, Brogden RN. Gliclazide. Drugs. 1993;46(1):92-125.
3-Matsuda R, Anguizola J, Joseph K, Hage DS. High-performance affinity chromatography and the analysis of drug interactions with modified proteins: binding of gliclazide with glycated human serum albumin. Analytical and bioanalytical chemistry. 2011;401(9):2811.
4-Sarkar A, Tiwari A, Bhasin PS, Mitra M. Pharmacological and Pharmaceutical Profile of Gliclazide: A Review. 2011.
5-Musshoff F, Madea B. Review of biologic matrices (urine, blood, hair) as indicators of recent or ongoing cannabis use. Therapeutic drug monitoring. 2006;28(2):155-63.
6-Agrawal Y, Gogoi P, Manna K, Bhatt H, Jain V. A supercritical fluid chromatography/tandem mass spectrometry method for the simultaneous quantification of metformin and gliclazide in human plasma. Indian journal of pharmaceutical sciences. 2010;72(1):50.
7-Główka FK, Łada MK, Grund G, Wachowiak J. Determination of treosulfan in plasma and urine by HPLC with refractometric detection; pharmacokinetic studies in children undergoing myeloablative treatment prior to haematopoietic stem cell transplantation. Journal of Chromatography B. 2007;850(1-2):569-74.
8-Nekrassova O, Lawrence NS, Compton RG. Analytical determination of homocysteine: a review. Talanta. 2003;60(6):1085-95.
9-Ranetti M-C, Ionescu M, Hinescu L, Ionica E, Anuta V ,Ranetti AE, et al. Validation of a HPLC method for the simultaneous analysis of metformin and gliclazide in human plasma. Farmacia. 2009;57(6):728-35.
10-Venkatesh P, Harisudhan T, Choudhury H, Mullangi R, Srinivas NR. Simultaneous estimation of six anti-diabetic drugs—glibenclamide, gliclazide, glipizide, pioglitazone, repaglinide and rosiglitazone: development of a novel HPLC method for use in the analysis of pharmaceutical formulations and its application to human plasma assay. Biomedical Chromatography. 2006;20(10):1043-8.
11-Jamadar SA, Mulye SP, Karekar PS, Pore YV, Burade KB. Development and validation of UV spectrophotometric method for the determination of Gliclazide in tablet dosage form. Der Pharma Chemica. 2011;3(4):338-43.
12-Bhaskar R, Sagar M, Saini V, Bhat K. UV-spectrophotometric-assisted chemometric methods for the simultaneous determination of metformin hydrochloride and gliclazide in pharmaceutical formulations. Pharmaceut Anal Acta. 2012;3(4):1-5.

Identification and Quantification of Gliclazide in Human Plasma by HPLC-PDA

Meisam Saberi[1], Zahra Ramezani[2*], Ali Hossein Saberi[3], Homeira Rashidi[4]

1-Farmacy Student, Faculty of Farmacy.
2-Assistant Professor of Pharmaceutical Chemistry.
3-Associate Professor of Genetics.
4-Associate Professor of Internal Medicine, Diabetic Research Center.

1-Faculty of Pharmacy, Ph.D. Student of Pharmacy, Jundishapur University of Medical Sciences, Ahvaz, Iran.
2-Department of Medical Chemistry, Factuly of Pharmacy, Ahvaz Jundishapur University Medical Sciences, Iran.
3-Department of Medical Genetic, Factuly of Medicine, Ahvaz Jundishapur Universy Medical Sciences, Ahvaz, Iran.
4-Diabetes Research Center,Health Research Institute, Ahvaz Jundishapur University of Medical Sciences, Ahvaz, Iran

**Corresponding author:*
Zahra Ramezani; Diabetes Research Center,Health Research Institute, Ahvaz Jundishapur University of Medical Sciences, Ahvaz, Iran.
Tel: +989177161017
Email: meisams1991@gmail.com

Abstract

Background and Objective: In this study, a high-performance liquid chromatography method was developed to determine the concentration of gliclazide in plasma. The Photodiode array (PDA) detector allows for the determination of purity.

Subjects and Methods: The mobile phase used in this study was phosphate buffer with pH = 3.5 and acetonitrile (HPLC grade) at a ratio of 1: 1 was run isocraticaly through a C18 analytical column. The UV detection was done at 253 nm. Analytical run time was less than 10 min.

Results: In the optimum conditions, the calibration curve in the area of 50 to 400 ng/ml, linear with the equation y = 28.029x + 212.74 and 0.998 = R2. Gliclazide was detected within 3.6 minutes by photodiode detector. The limit of detection (LOD) and the limit of quantitative (LOQ) in this method are calculated as 23 ng/ml and 71 ng/ml, respectively.

Conclusion: The evaluation of the accuracy and precision of method showed that this method has the ability to determine the amount of gliclazide in plasma, and the method is reliable and fast.

Keywords: HPLC, HPLC-PDA, gliclazide.

►*Please cite this paper as:*
Saberi M, Ramezani Z, Saberi AH, Rashidi H. Identification and Quantification of Gliclazide in Human Plasma by HPLC-PDA. Jundishapur Sci Med J 2018; 17(2):195-201.

Received: Feb 18, 2018 **Revised: May 28, 2018** **Accepted: May 28 2018**