

## INTISARI

Kombinasi terapi metformin dan glimepirid diperlukan untuk mengontrol kadar glukosa darah pada pasien diabetes tipe 2. Pengukuran dan pemantauan konsentrasi obat di dalam darah diperlukan untuk individualisasi dosis guna menghindari efek samping yang mungkin terjadi. Penelitian ini bertujuan untuk mengembangkan dan memvalidasi metode analisis metformin dan glimepirid secara simultan di dalam *spiked* plasma secara KCKT.

Sistem KCKT menggunakan fase diam Ascentis® Phenyl C18 (250 × 4,6 mm i.d.; 5 µm) dan fase gerak asetonitril : bufer KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0,0125 M + SDS 1 mM, dengan detektor UV-210 nm. Optimasi kondisi KCKT dilakukan menggunakan *Box-Behnken Design* (BBD) meliputi parameter persentase bufer, pH bufer dan laju alir. Metode optimum yang diperoleh kemudian divalidasi sesuai dengan *Guideline European Medicines Agency* (EMA).

Kondisi optimal KCKT hasil BBD yaitu fase gerak asetonitril : bufer KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0,0125 M + SDS 1 mM (28:72%, v/v), pH bufer 4,3 dan laju alir 1,0 mL/menit yang dialirkan secara isokratik. Hasil validasi menunjukkan metode yang dikembangkan selektif, akurat, dan presisi. Nilai LLOQ yang diperoleh yaitu 15 ng/mL untuk metformin dan 10 ng/mL untuk glimepirid. Kurva kalibrasi memenuhi syarat linearitas pada rentang konsentrasi 15-1000 ng/mL untuk metformin dan 10-1000 ng/mL untuk glimepirid. Metode juga memenuhi syarat penerimaan untuk *dilution integrity* dan *carry over*. Metformin terbukti stabil dari hasil uji stabilitas analit dalam *spiked* plasma yang di uji pada berbagai kondisi. Namun untuk glimepirid, kestabilan analit dalam *spiked* plasma hanya bertahan selama 6 jam pada penyimpanan -80°C. Kesimpulan, metode ini dapat digunakan untuk penetapan kadar metformin dan glimepirid dalam *spiked* plasma dengan memperhatikan waktu penyimpanan sampel.

**Kata kunci:** Metformin HCl, glimepirid, KCKT fase terbalik, *spiked plasma*, BBD, validasi

## ABSTRACT

Combination therapy of metformin and glimepiride is needed to control glucose levels in type 2 diabetes patients. Evaluation and monitoring of drug concentrations in the plasma are crucial for the individual dose to avoid any possible side effects. This research aims to develop and validate the simultaneous HPLC analysis method of metformin and glimepiride in spiked plasma.

The HPLC system used in this research was consisted of a stationary phase Ascentis® Phenyl C18 (250 × 4.6 mm i.d.; 5 μm) with a mobile phase of acetonitrile : KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> buffer 0.0125 M + SDS 1 mM, and UV detector at 210 nm. Optimization of HPLC conditions was carried out using Box-Behnken Design (BBD), the parameters included the percentage of buffer, buffer pH and flow rate. The optimum method was validated according to the European Medicines Agency (EMA) guidelines.

The optimal condition of HPLC of BBD result was the mobile phase of acetonitrile : KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> buffer 0,0125 M + SDS 1 mM (28:72%, v/v), buffer pH at 4.3 and flow rate 1.0 mL/min using isocratic mode. Validation results showed that the developed method was selective, accurate, and precise. LLOQ values obtained from this study were 15 ng/mL for metformin and 10 ng/mL for glimepiride, respectively. Calibration curves satisfied the linearity requirements at the range concentrations of 15-1000 ng/mL for metformin and 10-1000 ng/mL for glimepiride. The method also fulfills the acceptance criteria of dilution integrity and carryover. Metformin has proven to be stable based on the results of the test of the stability of the analyte in plasma samples which tested under various. However, the stability of glimepiride in spiked plasma only lasts for 6 hours of -80°C. In conclusion, this method can be used to determine of metformin and glimepiride in spiked plasma by considering the storage time of plasma samples.

**Key words:** Metformin HCl, glimepiride, RP-HPLC, spiked plasma, BBD, validation