

RINGKASAN

Pengembangan Metode KCKT-ELSD dengan Pemisahan HILIC untuk Penetapan Kadar Glukosamin Hidroklorida dan Kondroitin Sulfat pada Produk Suplemen

Saat ini banyak sediaan suplemen mengandung glukosamin dan kondroitin sulfat yang beredar dalam berbagai merek dan bermacam-macam kleim yang tercantum pada label, namun kontrol kualitas dari kedua bahan aktif dalam sediaan suplemen sangat kompleks. Beberapa metode analisis glukosamin dan kondroitin sulfat secara simultan yang dilaporkan antara lain elektroforesis dengan detektor ultraviolet (Voclavikovo *et al.*, 2013), *ion exchange chromatography* dengan *pulsed amperometric detection* (HPAEC-PAD) (Kornfeld *et al.*, 2016), kromatografi cair kinerja tinggi (KCKT) dengan detektor ultraviolet (Gatti *et al.*, 2010), KCKT detektor fluoresensi dengan derivatisasi (Harmita *et al.*, 2017) dan KCKT dengan detektor refraktif indeks (Jahandir *et al.*, 2015). Analisis dengan metode HPAEC-PAD, epimerasi dan degradasi glukosamin dan kondroitin sulfat dapat terjadi ketika larutan natrium hidroksida digunakan sebagai fase gerak (Vaclavikova & Kvasnicka, 2013). Kromatografi cair kinerja tinggi dengan detektor ultraviolet saat ini banyak digunakan untuk analisis sediaan obat dan suplemen kesehatan (Way *et al.*, 2000; Akamatsu & Mitsuhashi, 2012). Masalah yang timbul selama analisis berhubungan dengan tidak terdeteksinya glukosamin dan kondroitin sulfat, sehingga harus dilakukan derivatisasi dengan penambahan reagen tertentu sebelum dilakukan analisis (Gatti *et al.*, 2010). Hal yang sama, glukosamin dan kondroitin sulfat juga tidak dapat berfluoresensi karena tidak memiliki gugus fluoresen, sehingga perlu diderivatisasi dengan penambahan reagen tertentu selama analisis dengan KCKT dengan menggunakan detektor fluoresensi (Harmita *et al.*, 2015). Kondroitin sulfat selain memiliki serapan lemah pada daerah ultraviolet juga merupakan polimer dengan berat molekul yang besar antara 5000 sampai dengan 10,000 Dalton (GLC, 2012) dan adanya gugus sulfat yang memiliki polaritas tinggi, sehingga sulit untuk dianalisis.

Penelitian ini bertujuan untuk mendapatkan kondisi KCKT-ELSD (*evaporative light scattering detector*) dengan pemisahan *Hydrophilic interaction liquid interface chromatography* (HILIC) yang sederhana, selektif dan akurat dapat memisahkan analit dari matriks dalam sampel sediaan suplemen, melakukan validasi pada metode yang terpilih, serta menerapkan metode tersebut untuk penetapan kadar glukosamin hidroklorida dan kondroitin sulfat secara simultan dalam sediaan suplemen.

Optimasi kondisi KCKT-ELSD dengan pemisahan HILIC pada penelitian ini meliputi komposisi asetonitril, jenis, konsentrasi dan pH dapar, suhu *nebulizer* dan *evaporator* detektor. Berdasarkan hasil optimasi pada standar campuran glukosamin hidroklorida dan kondroitin sulfat 600 µg/ml menggunakan kolom

ZIC-HILIC (150, 4,6 mm), 200 Å 5µm diperoleh fase gerak amonium format 30 mM : air : asetonitril (20:3:77, v/v/v) pada pH 4,5, *flow rate* 1 ml/menit suhu kolom 35°C dengan volume injeksi 5µL dan kondisi ELSD meliputi suhu *nebulizer* dan *evaporator* 50/80°C dengan *flow rate* N₂ 1,10 SLM.

Kondisi KCKT-ELSD dengan pemisahan HILIC yang terpilih selanjutnya digunakan untuk uji pre-validasi meliputi uji stabilitas dan kesesuaian sistem. Uji stabilitas pada penelitian ini bertujuan untuk mengetahui stabilitas larutan standar selama proses analisis. Uji stabilitas dilakukan selama 7 hari pada suhu kamar dan suhu 4°C pada standar campuran glukosamin hidroklorida (600 µg/ml) dan kondroitin sulfat (konsentrasi 400 µg/ml). Puncak area pada pengamatan hari ke-1, 2, 4 dan 7 dibandingkan dengan larutan pada kondisi *zero* kemudian dianalisis dengan menggunakan uji statistik *two way* ANOVA. Hasil analisis statistik menunjukkan tidak terdapat perbedaan bermakna puncak area pada hari ke-1 dan 2, sehingga dapat disimpulkan bahwa lama penyimpanan larutan analit tidak mempengaruhi puncak area yang dihasilkan sampai dengan penyimpanan larutan analit selama dua hari.

Hasil uji kesesuaian sistem dilakukan dengan menyuntikkan larutan standar campuran glukosamin hidroklorida dan kondroitin sulfat 600 µg/ml dalam sistem KCKT pada kondisi optimal sebanyak 6 kali pengulangan. Hasil uji kesesuaian sistem menunjukkan keterulangan waktu retensi yang ditunjukkan dengan nilai % RSD glukosamin hidroklorida dan kondroitin sulfat yaitu 0,26% dan 0,43% sedangkan keterulangan puncak area masing-masing adalah 1,39 % dan 0,62%. Hasil uji kesesuaian sistem memenuhi persyaratan dengan nilai $RSD \leq 2\%$.

Setelah uji prevalidasi dilanjutkan validasi metode analisis. Validasi metode analisis terdiri dari uji selektivitas, linearitas, akurasi, presisi, batas deteksi dan batas kuantitasi. Uji selektivitas dilakukan untuk menunjukkan bahwa puncak analit dan analit lainnya terpisah dengan baik. Hasil pengujian didapatkan bahwa blanko pelarut asetonitril dapar amonium format dan matriks yang terdapat pada sampel tidak mengganggu analisis. Larutan standar glukosamin hidroklorida dan kondroitin sulfat menunjukkan puncak pada waktu retensi 18,33 dan 11,33 menit sedangkan larutan standar campuran glukosamin hidroklorida dan kondroitin sulfat memberikan puncak pada waktu retensi 18,43 dan 11,50 menit. Pengujian matriks sampel yang telah dilakukan spiking dengan glukosamin hidroklorida dan kondroitin sulfat menunjukkan puncak pada waktu retensi 18,21 dan 11,46 menit.

Uji linieritas digunakan 6 konsentrasi yang bervariasi dari larutan standar campuran glukosamin hidroklorida dan kondroitin sulfat dengan rentang konsentrasi 400 – 2500 µg/ml dan menunjukkan adanya hubungan linier antara area dengan kadar (Gambar 5.7). Hasil kurva baku diperoleh nilai r hitung = 0,99904 dengan nilai V_{xo} = 3,003% untuk glukosamin hidroklorida dan nilai r hitung = 0,99926 dengan nilai V_{xo} 2,635% untuk kondroitin sulfat. Hasil tersebut menunjukkan bahwa parameter linieritas memenuhi persyaratan dengan nilai $r > 0,999$ dan $V_{xo} < 5\%$. Batas deteksi dan kuantitasi ditentukan berdasarkan rasio *signal-to-noise*. Batas deteksi dilakukan dengan menyuntikkan standar glukosamin hidroklorida dan kondroitin sulfat sampai kadar terkecil replikasi 3 kali yang dapat memberikan perbandingan antara *signal-to-noise* sebesar 3 : 1 mengacu pada ICH 2005. Berdasarkan hasil pengujian diperoleh bahwa konsentrasi standar glukosamin hidroklorida 20 µg/ml dan kondroitin sulfat 80 µg/ml dengan

perbandingan *signal-to-noise* sebesar 3: 1 sehingga ditetapkan sebagai limit deteksi. Uji batas kuantitasi dilakukan dengan cara yang sama yaitu menyuntikkan standar glukosamin hidroklorida dan kondroitin sulfat sampai kadar terkecil yang dapat terkuantitasi dengan perbandingan antara *signal to noise* sebesar 10 : 1. Berdasarkan hasil pengujian diperoleh bahwa konsentrasi 80 µg/ml glukosamin hidroklorida dan 400 µg/ml kondroitin sulfat dengan perbandingan *signal-to-noise* 10:1, sehingga ditetapkan sebagai batas kuantitasi.

Uji presisi dilakukan secara *repeatability* yaitu dilakukan pengujian pada hari dan analisis yang sama. Uji presisi bertujuan untuk mengetahui kedekatan dari suatu seri pengukuran yang diperoleh dari sampel yang homogen. Uji presisi dilakukan dengan menganalisis satu konsentrasi 100% sebanyak 6 kali replikasi. Uji presisi dilakukan dengan menganalisis standar dalam larutan matriks. Hasil uji presisi ditunjukkan dengan nilai % RSD dan dari hasil pengujian diperoleh nilai % RSD sebesar 0,51% untuk glukosamin hidroklorida dan 1,44% untuk kondroitin sulfat dimana telah memenuhi persyaratan. Uji presisi *intra day* pada hari yang berbeda dalam hal ini dilakukan pada hari ke-2 diperoleh nilai % RSD 0,33% untuk glukosamin hidroklorida dan 1,65% untuk kondroitin sulfat yang memenuhi persyaratan tidak lebih dari 2% (Horwitz, 2009).

Uji akurasi dilakukan dengan menganalisis matriks yang telah dilakukan spiking dengan standar glukosamin hidroklorida dan kondroitin sulfat masing-masing pada konsentrasi 80%, 100% dan 120%, dipreparasi sesuai dengan tahapan preparasi sampel dan masing-masing dilakukan 3 kali replikasi. Hasil uji akurasi didapatkan % perolehan kembali glukosamin hidroklorida untuk kadar 80% masing-masing = $100,59 \pm 0,55\%$; 100% = $101,04 \pm 0,57\%$ dan 120% = $100,46 \pm 0,18\%$ sedangkan % perolehan kembali kondroitin sulfat untuk kadar 80% masing-masing = $97,65 \pm 0,18\%$; 100% = $102,34 \pm 1,21\%$ dan 120% = $101,37 \pm 0,44\%$, berada pada rentang yang dipersyaratkan, yaitu 92 – 105%. Berdasarkan uji tersebut dapat disimpulkan bahwa metode ini akurat untuk menganalisis glukosamin hidroklorida dan kondroitin sulfat secara simultan dalam suplemen (Horwitz, 2009).

Berdasarkan hasil pengembangan dan validasi metode, selanjutnya diaplikasikan terhadap sampel suplemen kesehatan. Penetapan kadar dilakukan pada tiga sampel diperoleh kadar glukosamin hidroklorida pada sampel A= 461,92 mg/kaplet, B= 480,92 mg/kaplet dan C= 483,24 mg/kaplet. Dibandingkan dengan label kleim diperoleh hasil pada sampel A= 92,38%, B 96,18 % dan C 96,65%. Keseluruhan hasil penetapan kadar diperoleh nilai RSD < 2% dan memenuhi persyaratan untuk glukosamin hidroklorida dalam suplemen yaitu 90–120% (The United States Pharmacopeia, 2018).

Penetapan kadar kondroitin sulfat diperoleh hasil pada sampel A= 405,15 mg/kaplet, B= 176,63 mg/kaplet dan C= 458,85 mg/kaplet. Dibandingkan dengan label kleim diperoleh hasil pada sampel A=101,29%, B= 44,16% dan C 114,71%. Persyaratan kondroitin sulfat dalam sediaan suplemen adalah 90–110% (The United States Pharmacopeia, 2018). Berdasarkan hasil analisis, diperoleh sampel B dibawah 90-110% dan sampel C diatas 90-110%.

ABSTRACT**A HILIC-HPLC-ELSD Method Development for Simultaneous Determination of Glucosamine Hydrochloride and Chondroitin Sulfate in Dietary Supplement**

Glucosamine hydrochloride and chondroitin sulfate are widely used as dietary supplements for osteoarthritis treatment. The analysis of glucosamine hydrochloride and chondroitin sulfate in dietary supplements poses several challenges due to the lack of a sufficient UV chromophore and its high polarity. The purposes of this study were to develop and validate a simple, selective and accurate a HILIC-HPLC-ELSD (*high performance liquid chromatography with evaporative light scattering detector-hydrophilic interaction liquid chromatography column*) method for determination of glucosamine hydrochloride and chondroitin sulfate in dietary supplements. The chromatographic of glucosamine hydrochloride and chondroitin sulfate was carried on a ZIC-HILIC column 150 mm x 4.6 mm x 5 μ m in isocratic system mode, the mobile phase consisted of acetonitrile, 30 mM ammonium formate and water (77:20:3, v/v/v) with pH of 4.5, column temperature of 35°C, flow rate of 1 ml/min, and injection volume of 5 μ l. *Evaporative light scattering* was used as detector with the nebulization and evaporation temperature were 50°C and 80°C, respectively. The flow rate of nitrogen was 1.10 standard liter per minutes. A good separation of glucosamine hydrochloride and chondroitin sulfate was obtained, the resolution of the analytes more than 1.5. The retention time of glucosamine hydrochloride and chondroitin sulfate are 18.13 min and 11.28 min, respectively. The linearity of glucosamine hydrochloride and chondroitin sulfate were obtained in 0.4 – 2.5 mg/ml range. The limit of detection and limit of quantification of glucosamine hydrochloride and chondroitine sulfat were 20, 80 μ g/mL, 80 and 400 mg/mL. All the validation parameter selectivity, linearity and range, accuracy and precision met the acceptable criteria according to ICH guideline. The method was successfully applied for the determination sample of dietary supplements commercially.

Keywords: Glucosamine hydrochloride. Chondroitin sulfate. A HILIC-HPLC-ELSD. Method development. Validation. Dietary Supplements.