

## **Pengembangan dan validasi metode kromatografi cair kinerja tinggi (KCKT) untuk estimasi kadar simultan antiemetik piridoksin hidroklorida dan piratiazin teoklat dalam bentuk sediaan tablet**

**Fikri Alatas<sup>1</sup>, Hernandi Sujono<sup>2</sup>, Woro Artati Sucipto<sup>2</sup>**

<sup>1</sup>Departemen Farmasetika dan Teknologi Farmasi, Fakultas Farmasi, Universitas Jenderal Achmad Yani, Jl. Terusan Jenderal Sudirman, Cimahi, Jawa Barat, Indonesia

<sup>2</sup>Kelompok Keahlian Kimia Analisis, Jurusan Kimia, Fakultas Sains dan Informatika Universitas Jenderal Achmad Yani, Jl. Terusan Jenderal Sudirman, Cimahi, Jawa Barat, Indonesia  
Corresponding author e-mail: fikri.alatas@lecture.unjani.ac.id

### **Abstrak**

Metode kromatografi cair kinerja tinggi (KCKT) dengan detektor ultra lembayung telah dikembangkan dan divalidasi untuk estimasi kadar secara simultan campuran piridoksin hidroklorida (PH) dan piratiazin teoklat (PT) dalam sediaan tablet antiemetik. Proses pemisahan terjadi dalam kolom Inertsil® ODS-3 pada panjang gelombang 280 nm dengan laju alir 1,0 mL/menit. Fase gerak yang optimal untuk pemisahan adalah campuran methanol-asam asetat 1% (20:80) dengan waktu retensi PH dan PT berturut-turut adalah 1,2 dan 9,8 menit. Perolehan kembali PH dan PT berturut-turut adalah 100,13 dan 99,78 %. Batas deteksi untuk PH dan PT berturut-turut adalah 0,21 dan 0,22 µg/mL, sedangkan batas kuantisasinya berturut-turut adalah 0,70 dan 0,72 µg/mL. Metode ini dapat diterapkan sebagai metode untuk estimasi kadar campuran piridoksin hidroklorida dan piratiazin teoklat dalam bentuk sediaan tablet secara simultan.

**Kata kunci:** Piridoksin hidroklorida, piratiazin teoklat, KCKT, tablet

### ***Development and validation of high performance liquid chromatography (HPLC) method for simultaneous estimation of antiemetic pyridoxine hydrochloride and pyrathiazine theoclate in tablet dosage form***

### ***Abstract***

*The high performance liquid chromatography (HPLC) method with an ultra violet detector has been developed and validated for simultaneous estimation of pyridoxine hydrochloride (PH) and pyrathiazine theoclate (PT) in antiemetic tablet preparations. The separation process occurs in the Inertsil® ODS-3 column at a wavelength of 280 nm with a flow rate of 1.0 mL /min. The optimal mobile phase for separation is a mixture of methanol-acetic acid 1% (20:80) with the retention times of PH and PT 1.2 and 9.8 minutes respectively. The recoveries of PH and PT were 100.13 and 99.78%, respectively. The detection limits for PH and PT were 0.21 and 0.22 µg / mL respectively, while the quantisation limits were 0.70 and 0.72 µg / mL, respectively. This method can be applied as a method for simultaneous estimating the levels of pyridoxine hydrochloride and pyrathiazine theoclate in tablet dosage form.*

**Keywords:** *Pyridoxine hydrochloride, pyrathiazine theoclate, HPLC, tablet*

## Pendahuluan

Kombinasi obat di dalam sediaan farmasi yang beredar di pasaran umumnya bertujuan untuk meningkatkan efektivitas pengobatan dan pemakaian yang praktis. Diantara sediaan yang ada di pasaran adalah obat golongan anti emetik, yaitu obat yang mengurangi rasa mual dan muntah. Salah satu obat antiemetik yang banyak digunakan pada wanita hamil adalah piridoksin hidroklorida (PH) yang dikombinasikan dengan antihistamin, antara lain doksilamin suksinat, proklorperazin maleat, meklizin hidroklorida dan piratiazin teoklat (Fantasia, 2014; Koren et al., 2010; Matok et al., 2014).

Proses pemisahan dua atau lebih zat aktif, antara lain dengan ekstraksi umumnya harus dilakukan sebelum menetapkan kadar lebih dari satu zat aktif di dalam sediaan farmasi dengan metode spektrofotometri ultraviolet, sehingga waktunya menjadi kurang efisien. Pada saat ini, hampir semua buku-buku resmi, seperti Farmakope Indonesia (FI), United State Pharmacopeia (USP) dan British Pharmacopeia (BP), menggunakan metode kromatografi cair kinerja tinggi (KCKT) untuk penetapan kadar sediaan obat. KCKT merupakan metode yang mampu memisahkan sekaligus menetapkan kadar lebih dari satu zat aktif di dalam sediaan farmasi dengan hasil yang optimal. Keunggulan KCKT adalah memberikan pemisahan cepat, efisien dan resolusi tinggi. Pesatnya penemuan obat baru, komposisi obat yang semakin kompleks (lebih dari dua komponen zat aktif), pengaruh matriks pada sediaan/sampel memerlukan validasi metode untuk menunjang penelitian di bidang kefarmasian.

Penetapan kadar secara simultan kombinasi piridoksin hidroklorida dan doksilamin suksinat sudah banyak dilakukan secara kromatografi cair kinerja tinggi (KCKT) (Ravichandran, Selvakumar, Afreen, & Banu, 2018; Richards & Kumar, 2017), begitu pula dengan kombinasinya dengan proklorperazin maleat (Khanage, Mohite, Dudhade, & Deshmukh, 2014) dan meklizin hidroklorida (Nawaz, 2013), namun hingga saat ini belum ditemukan literatur

tentang metode penetapan kadar simultan campuran piridoksin hidroklorida dan piratiazin teoklat secara KCKT. Penetapan kadar piratiazin teoklat dengan piridoksin hidroklorida yang telah dikembangkan sebelumnya dilakukan secara TLC-Densitometri (Widiretnani, Wahyuni, Kartinasari, & Indrayanto, 2009).

Penelitian ini bertujuan untuk mengembangkan metode penetapan kadar campuran piridoksin hidroklorida dan piratiazin teoklat secara simultan dalam sediaan tablet dengan menggunakan metode KCKT yang mudah, cepat dan valid.

## Metode

**Bahan.** Bahan-bahan penelitian ini adalah baku pembanding piratiazin teoklat, baku pembanding piridoksin hidroklorida, tiga jenis tablet di pasaran (mengandung piratiazin teoklat dan piridoksin HCl), metanol grade HPLC, air, amilum, Avicel® pH 102, magnesium stearat, Starch® 1500, dan talk.

**Alat.** Alat-alat penelitian ini adalah seperangkat instrumen KCKT (Shimadzu LC10-ADvp pump dilengkapi dengan detektor SPD-10A dan perangkat lunak Shimadzu LC Solution, seperangkat instrumen spektrofotometer UV-Vis (Shimadzu UV-1601), kolom inertsil® ODS-3 C18, 4,6 x 250 mm, timbangan analitik (Shimadzu ATX224, kapasitas 10-220 mg, ketelitian d=0,1 mg), alat sonifikasi (Branson 3510), seperangkat penyaring vakum, pompa vakum.

**Optimasi panjang gelombang menggunakan spektrofotometer UV.** Optimasi panjang gelombang yang dipakai untuk deteksi pada system KCKT dilakukan dengan membuat masing-masing kurva serapan larutan 10 µg/ mL PH dan PT di dalam air menggunakan spektrofotometer ultraviolet pada rentang panjang gelombang 200-350 nm. Kedua kurva serapan ditumpangtindihkan (overlay) dan panjang gelombang optimal ditentukan berdasarkan serapan kedua zat yang memungkinkan dapat terdeteksi pada sistem KCKT.

**Sistem Kromatografi.** Sistem kromatografi yang digunakan adalah LC column Inertsil® ODS-2 panjang 250 mm × diameter dalam 4,6 mm, ukuran partikel 5µm, fase gerak campuran metanol-asam asetat 1%, laju alir 1,0 mL/menit, detektor spektrofotometer ultraviolet, dan volume injeksi 20 µL.

**Optimasi Fase Gerak.** Optimasi komposisi fase gerak dilakukan dengan menyuntikan campuran larutan PH 10 µg/mL dan PT 10 µg/mL dalam air ke dalam sistem KCKT dengan variasi fase gerak campuran metanol-asam asetat 1% (20:80), (30:70), dan (40:60). Fase gerak optimal ditetapkan berdasarkan bentuk puncak-puncak PH dan PT yang diperoleh dari kromatogram dan nilai resolusi (R) dari kedua puncak zat tersebut. Waktu retensi masing-masing zat ditentukan dengan menyuntikkan masing-masing larutan baku 10 µg/mL PH dan PT ke dalam sistem KCKT.

**Uji Linearitas, Batas Deteksi (BD), dan Batas Kuantisasi (BK)** Parameter validasi linearitas, BD, dan BK ditentukan berdasarkan kurva kalibrasi masing-masing zat yang diperoleh pada sistem KCKT dengan komposisi fase gerak optimal. Larutan standar masing-masing PH dan PT dibuat dengan konsentrasi 6, 8, 10, 12, 16 dan 20 µg/mL dalam pelarut air. Masing-masing larutan disaring dengan penyaring miliphore (0,45 µm) dan filtratnya disuntikkan sebanyak 20 µL ke dalam instrumen KCKT dengan fase gerak campuran metanol dan asam asetat 1% yang optimal. Parameter linearitas dihitung berdasarkan nilai koefisien korelasi yang diperoleh dari kurva kalibrasi. Nilai BD dihitung dengan persamaan,  $BD = 3 \times sb/b$ , sedangkan nilai BK dihitung dengan persamaan,  $BK = 10 \times sb/b$  berdasarkan International Council for Harmonisation of Technical Requirements for Pharmaceuticals for Human Use (ICH) Guideline. Sb adalah simpangan baku dari larutan blanko dan b adalah slop dari kurva kalibrasi.

**Uji Kecermatan dan Keseksamaan.** Parameter kecermatan (akurasi) dan keseksamaan (presisi) ditentukan dengan

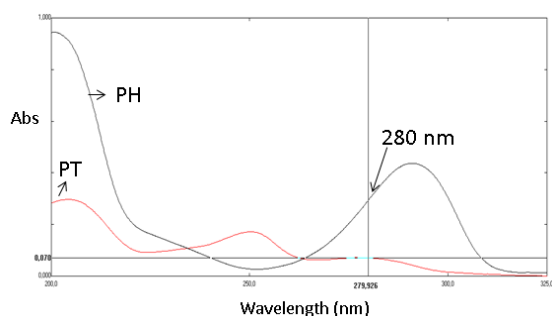
metode spiked placebo recovery, yaitu dengan pembuatan tablet simulasi yang mengandung piratazin teoklat 40 mg dan piridoksin HCl 37,5 mg, serta ditambahkan matrik tablet. Matrik tablet terdiri dari campuran amilum, Avicel® pH 102, magnesium stearat, starch®1500, talk, hingga bobot tablet 200 mg. Tablet simulasi ini dibuat tiga konsentrasi yaitu 80%, 100% dan 120% untuk masing-masing zat. Sejumlah sampel simulasi ditimbang, dilarutkan dengan 20 mL metanol ke dalam labu takar 100 mL, disonifikasi, kemudian diencerkan sampai tanda batas dengan air dan disaring. Filtrat dipipet sebanyak 0,8 mL, dimasukkan ke dalam labu ukur 25 mL, diencerkan dengan air hingga tanda batas, disaring dengan penyaring miliphore (0,45 µm), dan sejumlah 20 µL filtrat diinjeksikan ke dalam sistem KCKT dengan perbandingan fase gerak campuran metanol dan asam asetat 1% yang optimal. Pengukuran dilakukan sebanyak tiga kali untuk masing-masing konsentrasi. Kecermatan dihitung berdasarkan perolehan kembali (persen recovery), Sedangkan simpangan baku relatif atau koefisien variasi digunakan sebagai dasar untuk menentukan keseksamaan.

**Penerapan Metode KCKT untuk Estimasi Kadar Simultan PH dan PT pada Sediaan Tablet yang Beredar di Pasaran.** Estimasi kadar dilakukan pada tiga produk Tablet (A, B, dan C) yang mengandung piridoksin hidroklorida dan piratazin teoklat yang beredar di pasaran. Estimasi kadar PH dan PT dilakukan dengan menimbang masing-masing 10 buah tablet dan digerus di dalam mortar hingga homogen. Serbuk tablet ditimbang setara bobot rata-rata tablet, dimasukkan ke dalam labu takar 100 ml ditambahkan 20 mL metanol, disonifikasi, diencerkan dengan hingga tanda batas, dan disaring. Filtrat diambil sebanyak 0,8 mL, dimasukkan ke dalam labu ukur 25 mL, diencerkan dengan air, disaring dengan penyaring miliphore (0,45 µm), dan sejumlah 20 µL disuntikkan ke dalam sistem KCKT dengan perbandingan fase gerak campuran metanol

dan asam asetat 1% paling optimal. Pengukuran dilakukan dengan replikasi tiga kali untuk masing-masing tablet.

## Hasil dan Pembahasan

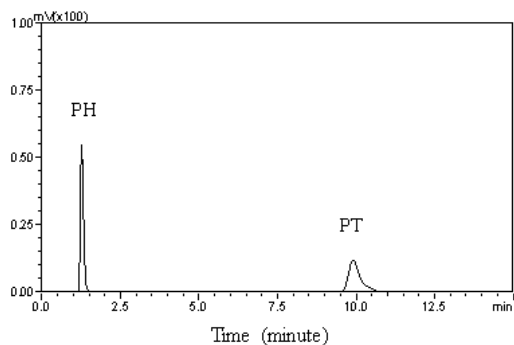
**Pemilihan Panjang Gelombang Serapan Optimal.** Pemilihan panjang gelombang serapan optimal bertujuan untuk memperoleh satu panjang gelombang yang dapat mendeteksi kedua senyawa tersebut dengan maksimal. Tablet yang beredar di pasaran mengandung piratiazin teoklat (PT) 40 mg dan piridoksin hidroklorida (PH) 37, mg, sehingga untuk menentukan panjang gelombang optimal digunakan perbandingan konsentrasi yang sama. Gambar 1 merupakan kurva serapan tumpang tindih dari PT dan PH. Gambar tersebut menunjukkan kurva serapan maksimum larutan piratiazin teoklat lebih kecil dari pada larutan piridoksin HCl pada konsentrasi yang sama. Panjang gelombang deteksi tidak dapat ditentukan pada panjang gelombang serapan maksimum PT maupun PH, karena pada panjang gelombang serapan maksimum PT, serapan PH sangat rendah, begitupula sebaliknya. Oleh karena itu panjang gelombang optimal yang digunakan adalah 280 nm, dimana pada panjang gelombang tersebut kedua zat dapat memberikan serapan yang optimal, sehingga dapat terdeteksi menggunakan KCKT.



Gambar 1. Kurva serapan tumpang tindih larutan piridoksin hidroklorida (PH) 10 µg/mL dan piratiazin teoklat (PT) 10 µg/mL di dalam air.

**Optimasi Fase Gerak.** Penetapan kadar piridoksin hidroklorida di dalam campuran vitamin B sebelumnya telah dilakukan menggunakan fase diam kolom C18 dan

fase gerak campuran metanol dan asam asetat 1% (Yantih, Widowati, & Aryani, 2011), sedangkan penetapan kadar campuran piridoksin hidroklorida dan piratiazin teoklat menggunakan KCKT hingga saat ini belum ditemukan. Untuk itu sistem kromatografi yang digunakan pada penetapan kadar campuran piridoksin hidroklorida dan piratiazin teoklat, berdasarkan sistem kromatografi yang digunakan pada penetapan kadar piridoksin hidroklorida yang dimodifikasi. Pasangan pelarut yang paling sering dipakai dalam kromatografi fase terbalik adalah air-metanol dan air-asetonitril. Metanol adalah pelarut sangat murni, mudah didapat, dan berhasil baik pada banyak pemisahan. Ada beberapa kekurangannya, seperti: viskositasnya yang tinggi cenderung menurunkan efisiensi kolom, sukar bercampur dengan cuplikan non polar, dan volume campur kecil (Johnson, Stevenso, & Terjemahan K. Padmawinata., 1991). Penentuan fase gerak optimal sangat penting untuk memastikan bahwa puncak kromatogram PT dan PH sudah terpisah secara baik dan memenuhi parameter selektivitas. Pada komposisi fase gerak dengan jumlah metanol lebih tinggi, yaitu campuran metanol-asam asetat 1% (30:70) dan (40:60) menghasilkan pemisahan yang baik, namun puncak PT terpecah menjadi dua bagian, sehingga komposisi tersebut tidak bisa digunakan. Komposisi fase gerak yang paling optimal diperoleh pada campuran metanol-asam asetat 1% (20:80) seperti ditampilkan pada Gambar 2. Pada komposisi tersebut, waktu retensi PH dan PT berturut-turut adalah 1,3 dan 9,9 menit dengan nilai resolusi (R)= 11,2. Nilai resolusi tersebut menegaskan bahwa, puncak-puncak PH dan PT sudah menunjukkan pemisahan yang cukup baik yaitu memenuhi persyaratan nilai  $R \geq 1,5$  dan puncak PT tidak terpecah menjadi dua bagian.



Gambar 2. Kromatogram campuran larutan piridoksin hidroklorida (PH) 10 µg/mL dan piratiazin teoklat (PT) 10 µg/mL pada perbandingan fase gerak metanol-asam asetat 1% (20:80).

**Linearitas, Batas Deteksi dan Batas Kuantisasi.** Linearitas menyatakan kemampuan suatu metode untuk mendapatkan hasil yang sebanding dengan kadar analit dalam suatu sampel pada kisaran konsentrasi tertentu. Linearitas dinyatakan dengan koefisien korelasi ( $r$ ), yang menunjukkan adanya hubungan linear antara luas kromatogram dan konsentrasi. Nilai koefisien korelasi memenuhi kriteria penerimaan yang telah ditentukan, yaitu  $r \geq 0,997$ . Kurva kalibrasi PH memberikan garis lurus dengan persamaan regresi linear,  $y=29936x + 25214$  dan koefisien korelasi ( $r$ ) = 0,999, sedangkan persamaan regresi linear PT,  $y=25709x + 4734,5$  dan  $r = 0,999$ . Hal ini menunjukkan konsentrasi kedua zat tersebut mempunyai hubungan yang linear dengan respon instrumen, sehingga tingkat kesalahan kurva sangat kecil. Batas deteksi (BD) dan batas kuantisasi (BK) PH secara berurutan adalah 0,21 µg/mL dan 0,70 µg/mL, sedangkan BD dan BK untuk PT secara berurutan adalah 0,22 µg/mL dan 0,72 µg/mL. Hal ini menunjukkan bahwa konsentrasi piridoksin hidroklorida dan piratiazin teoklat terkecil yang dapat terdeteksi oleh instrumen adalah 0,21µg/mL dan 0,22 µg/mL. Konsentrasi piridoksin HCl dan piratiazin teoklat terkecil yang dapat ditentukan kadarnya dengan kecermatan dan keseksamaan yang dapat di terima adalah 0,70 µg/mL dan 0,72 µg/mL

**Uji Kecermatan dan Keseksamaan.**

Kecermatan dinyatakan dengan nilai perolehan kembali (persen recovery), nilai perolehan kembali yang dapat diterima tergantung pada jumlah analit dalam matrik sampel, sedangkan keseksamaan dinyatakan dengan koefien variasi (KV), dengan kriteria  $KV \leq 2,0 \%$ . Kecermatan dan keseksamaan analisis campuran piridoksin hidroklorida dan piratiazin teoklat dalam tablet simulasi menggunakan spiked placebo recovery method, menghasilkan rata-rata perolehan kembali PH adalah 100,13% dengan KV 0,82% dan rata-rata perolehan kembali PT 99,78% dengan KV 0,60% seperti ditampilkan pada Tabel 1. Hasil pengujian validasi metode KCKT untuk penetapan piridoksin hidroklorida dan piratiazin teoklat dalam sediaan tablet menunjukkan bahwa metode analisis ini memenuhi persyaratan validitas, karena mempunyai ketepatan, ketelitian, dan linieritas yang dapat diterima.

Tabel 1. Hasil Uji Kecermatan dan Keseksamaan Analisis Campuran dalam Tablet Simulasi

Berat Sebenarnya (mg)		Berat diperoleh (mg)		Recovery (%)	
PH	PT	PH	PT	PH	PT
30,00	32,50	29,59	32,24	98,62	100,75
30,00	32,50	29,77	31,78	99,24	99,30
30,00	32,50	30,05	31,83	100,16	99,47
37,50	40,00	38,15	40,28	101,73	100,70
37,50	40,00	37,16	40,03	99,10	100,09
37,50	40,00	38,21	39,75	101,90	99,37
45,00	48,00	45,13	47,79	100,28	99,56
45,00	48,00	45,04	47,55	100,10	99,06
45,00	48,00	45,02	47,88	100,05	99,75
Rata-rata Recovery (%)				100,13	99,78
Simpangan Baku (%)				1,11	0,61
Koevisien Variasi (%)				1,11	0,61

**Penerapan Metode KCKT untuk Estimasi Kadar Simultan PH dan PT pada Sediaan Tablet yang Beredar di Pasaran.** Metode KCKT ini diterapkan pada tiga sampel tablet yang tersedia di pasaran yaitu tablet A, B, dan C. Hasil analisis tablet A mengandung kadar rata-rata piridoksin

hidroklorida 101,26 dan piratiazin teoklat, 100,21 %. Tablet B mengandung kadar rata-rata piridoksin hidroklorida 88,40% dan piratiazin teoklat 99,33%. Tablet C mengandung kadar rata-rata piridoksin hidroklorida 94,06% dan piratiazin teoklat 95,83%. Metode KCKT ini dapat diterapkan dengan baik karena dapat mengestimasi kadar piridoksin hidroklorida dan piratiazin teoklat sesuai dengan kadar yang tertera pada etiket.

### Kesimpulan

Pengembangan metode untuk estimasi kadar simultan campuran piridoksin hidroklorida dan piratiazin teoklat dalam sediaan tablet bisa dikerjakan dengan metode kromatografi cair kinerja tinggi (KCKT) dengan sistem fase terbalik, kolom Inertsil ODS-3 C18, fase gerak campuran metanol-asam asetat 1% (20:80), laju alir 1,0 mL/menit, dan detektor spektrofotometer ultraviolet pada panjang gelombang 280 nm. Hasil uji validasi metode analisis memberikan validitas yang teruji, sehingga metode dalam penelitian ini dapat diterapkan untuk estimasi kadar campuran piridoksin hidroklorida dan piratiazin teoklat dalam sediaan tablet.

### Daftar Pustaka

- Fantasia, H. C. (2014). A New Pharmacologic Treatment for Nausea and Vomiting of Pregnancy. *Nursing for Women's Health*, 18(1), 73–77.
- Johnson, E. L., Stevenso, R., & Terjemahan K. Padmawinata. (1991). *Dasar Kromatografi Cair*. Bandung: ITB.
- Khanage, S., Mohite, P., Dudhade, M., & Deshmukh, V. (2014). Separation and Determination of Prochlorperazine Maleate and Pyridoxine Hydrochloride in Tablet Formulation by RP-HPLC. *Austin Journal of Analytical and Pharmaceutical Chemistry*, 1(3), 1–5.
- Koren, G., Clark, S., Hankins, G. D. V., Caritis, S. N., Miodovnik, M., Umans, J. G., & Mattison, D. R. (2010). Effectiveness Of Delayed-Release Doxylamine and Pyridoxine for Nausea and Vomiting of Pregnancy: A Randomized Placebo Controlled Trial. *American Journal of Obstetrics and Gynecology*, 203(6), 571.e1-571.e7.
- Matok, I., Clark, S., Caritis, S., Miodovnik, M., Umans, J. G., Hankins, G., ... Koren, G. (2014). Studying the Antiemetic Effect of Vitamin B6 for Morning Sickness: Pyridoxine and Pyridoxal are Prodrugs. *Journal of Clinical Pharmacology*, 54(12), 1429–1433.
- Nawaz, M. S. (2013). A New Validated Stability Indicating RP-HPLC Method for Simultaneous Estimation of Pyridoxine Hydrochloride and Meclizine Hydrochloride in Pharmaceutical Solid Dosage Forms. *Chromatography Research International*, 2013, 1–7.
- Ravichandran, S., Selvakumar, S., Afreen, & Banu, N. (2018). RP-HPLC Method Development and Validation for The Doxylamine Succinate and Pyridoxine HCl in Its Pure and Pharmaceutical Tablet Dosage Form. *Indian Journal of Pharmaceutical Science & Research*, 8(1), 35–43.
- Richards, P., & Kumar, V. K. (2017). A New RP-HPLC Method Development And Validation For Simultaneous Estimation Of Pyridoxine Hydrochloride And Doxylamine Succinate In Bulk Drug And Pharmaceutical Tablet Dosage Form. *IOSR Journal of Pharmacy and Biological Sciences*, 12(5), 74–79.
- Widiretnani, D., Wahyuni, S. I., Kartinasari, F., & Indrayanto, G. (2009). Simultaneous Determination of Pyridoxine Hydrochloride and Doxylamine Succinate by TLC-Densitometry in Commercial Tablets: Validation of the Method. *Journal of Liquid Chromatography and Related Technologies*, 32(1), 154–165.
- Yantih, N., Widowati, D., & Aryani, T. (2011). Validation of HPLC Method for Determination of Thiamine Hydrochloride, Riboflavin, Nicotinamide, and Pyridoxine Hydrochloride in Syrup Preparation. *Canadian Journal on Scientific and Industrial Research*, 2(7), 269–278.