

## Analisa Vitamin B1, B6 dan B12 Secara Simultan dengan Metode Kromatografi Pasangan Ion

### Simultaneous Analysis of B1, B6 and B12 with Ion Pair Chromatography

Diana<sup>(a)\*</sup>

<sup>(a)</sup>Fakultas Farmasi Universitas Katolik Widya Mandala Surabaya

#### Article info:

Received Date : 03/10/2022

Revised Date : 07/10/2022

Accepted Date : 07/10/2022

#### Keywords:

Validation

Ion Pair

HPLC

B complex

#### Corresponding Authors:

Diana, Fakultas Farmasi Universitas Katolik

Widya Mandala Surabaya, Jl. Raya Kalisari

Selatan No. 1 Surabaya, 60112,

(031)99005299, ext 10604

Email: [diana\\_tan@ukwms.ac.id](mailto:diana_tan@ukwms.ac.id)

#### Abstrak:

Kromatografi pasangan ion dapat digunakan untuk meretensi senyawa yang memiliki muatan, bersifat polar dan memisahkan analit yang bervariasi kepolaran dan hidrofobitasnya. Hal yang tidak dapat dilakukan dengan mudah pada metode kromatografi fase balik biasa. Pemisahan senyawa pada kolom menggunakan kromatografi pasangan ion dilakukan untuk menganalisa kadar Thiamine Mononitrate (Vitamin B1), Pyridoxine HCl (Vitamin B6) dan Cyanocobalamine (Vitamin B12) secara simultan. Validasi juga dilakukan untuk membuktikan performa metode analisa yang diusulkan. Dari penelitian ini dibuktikan bahwa kromatografi pasangan ion dapat menjadi metode alternatif yang lebih efisien untuk menganalisa sediaan tablet oral dengan kandungan B1, B6 dan B12.

#### Abstract

Ion pair chromatography has ability to retain charged analyte, polar in nature and separate compound that have various polarity and hydrophobicity. Something that can't be easily done using reversed phase chromatography. Separation of analyte using Ion pair chromatography was evaluated for simultaneous assay of Thiamine Mononitrate (Vitamin B1), Pyridoxine HCl (Vitamin B6) and Cyanocobalamin (Vitamin B12). Validation was also conducted to evaluate performance of analytical method proposed. This study proved that Ion Pair Chromatography can be an efficient alternative method to analyze oral tablet containing B1, B6 and B12.

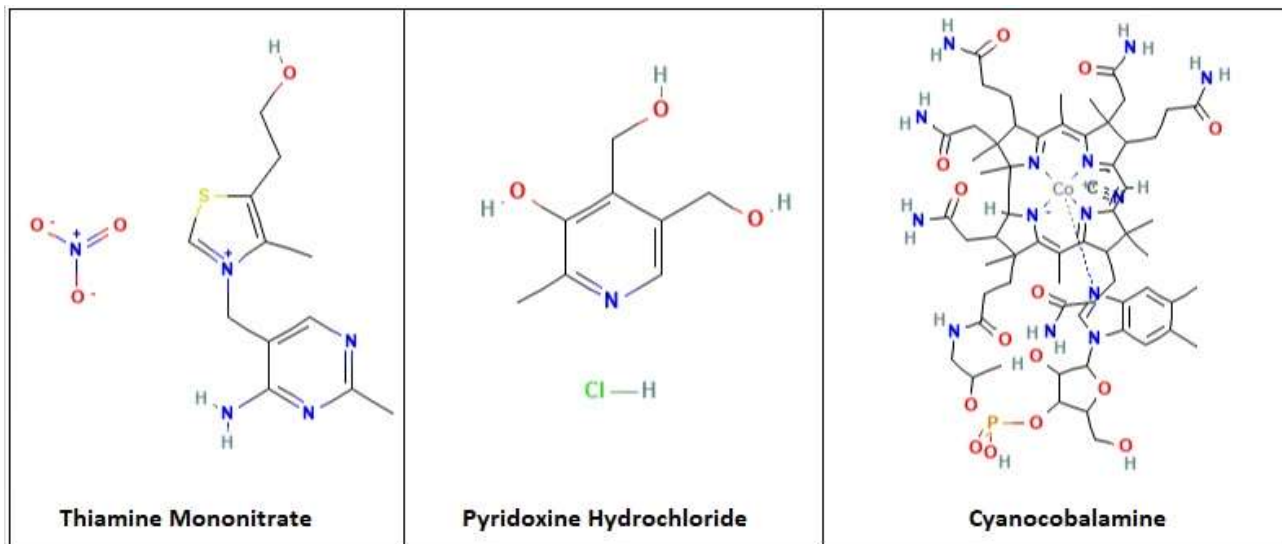
## PENDAHULUAN

Kombinasi Thiamine Mononitrate (Vitamin B1), Pyridoxine HCl (Vitamin B6) dan Cyanocobalamine (Vitamin B12) umum dijumpai dalam bentuk kombinasi pada sediaan tablet oral yang digunakan untuk mencegah dan mengatasi kondisi defisiensi Vitamin B. Vitamin B1 merupakan koenzim esensial yang berperan dalam metabolisme karbohidrat. Kekurangan vitamin B1 akan menyebabkan serangkaian gejala neuropati perifer, lemah otot dan paralisis yang dikenal sebagai penyakit beri-beri. Vitamin B6 terlibat dalam metabolisme asam amino, karbohidrat dan lemak, serta berperan dalam pembentukan haemoglobin. Defisiensi B6 menimbulkan gejala anemia, dermatitis, serta simptom neurologis lain. Sementara Vitamin B12 merupakan koenzim yang berfungsi dalam sintesa asam nukleat dan berperan dalam reaksi pembentukan energi dalam sel (Sweetman, 2008).

Farmakope Indonesia VI mencantumkan metode analisa kadar Vitamin B1, B6 dan B12

dalam monografinya masing-masing. Analisa dilakukan dengan menggunakan Kromatografi Cair Kinerja Tinggi (KCKT/HPLC) dengan kondisi yang berbeda antar senyawa (Kementerian Kesehatan RI, 2020). Penerapan metode kompendial ini pada sediaan kombinasi B1, B6 dan B12 akan memakan lebih banyak waktu dan biaya serta menghasilkan limbah yang lebih besar dalam pengerjaannya.

Penelitian ini bertujuan untuk memberikan alternatif metode analisa yang dapat mengevaluasi kadar Vitamin B1, B6 dan B12 secara simultan sehingga lebih sederhana dan efisien dalam penggunaannya. Validasi metode analisa juga dilakukan untuk membuktikan performa dari metode untuk dapat melakukan analisa kadar Vitamin B1, B6 dan B12 dalam sediaan tablet oral mengikuti ketentuan Farmakope dan ICH (ICH, 2022).



**Gambar 1.** Struktur Kimia B1, B6 dan B12 (Kim dkk., 2023)

## METODE PENELITIAN

### Alat dan Bahan

Alat dan bahan yang digunakan pada penelitian ini adalah instrument KCKT (Agilent® 1200) yang dilengkapi dengan detektor diode array (DAD). Kolom *encapped* oktadesil silika (Phenomenex®) dengan dimensi 150 x 4.6 mm, 5 µm digunakan sebagai fase diam. Reagen Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (Merck®), sodium heksan sulfonat (TCI®), air murni (menggunakan sistem pemurnian air Milli-Q®) dan metanol *pro HPLC* (Merck®) sebagai komponen fase gerak. Thiamine Mononitrate, Pyridoxine HCl, Cyanocobalamine serta bahan lain sebagai analit dan pembuatan sediaan simulasi tablet. Alat dan bahan lain yang digunakan adalah kertas saring Whatmann® 0,45 µm untuk menyaring fase gerak dan larutan uji,

neraca analitik, mikropipet, dan alat gelas lain yang umum digunakan dalam proses analisa.

### Pembuatan Fase Gerak

Fase gerak dibuat dengan mencampurkan metanol *pro HPLC* dan air murni dengan perbandingan 23: 77 dengan kandungan 2 g sodium heksan sulfonat tiap liter fase gerak dan 40mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> yang diadjust ke pH 3.

### Kondisi analisa dan Larutan Uji

Kromatografi dijalankan pada kondisi isokratik dengan laju alir 1,0 mL/menit, volume penginjekan 10 µL, suhu oven 25°C, dan deteksi pada panjang gelombang 361 nm untuk B1 dan B6 serta 275 nm untuk B12. Larutan uji dipreparasi dengan menimbang setara 1 tablet sediaan dengan kandungan B1 100 mg, B6 100 mg dan B12 5 mg

dan melarutkan dalam fase gerak. Analit diamati pada konsentrasi B1 dan B6 100 ppm serta B12 5 ppm setelah dilarutkan dalam fase gerak. Semua preparasi dilakukan dalam kondisi gelap dan alat gelas aktinik digunakan untuk menjaga stabilitas analit.

### Validasi Metode Analisa

Validasi metode analisa dilakukan atas parameter spesifisitas, linieritas, akurasi, presisi, *range* mengikuti kategori 1 untuk analisis kuantitatif komponen utama dalam sediaan. Linieritas dilakukan pada rentang konsentrasi 40-120 ppm untuk B1 dan B6, dan B12 pada 2-6 ppm. Akurasi dilakukan pada rentang kadar 80% – 120% dan keterulangan hasil analisa kadar dari sampel homogen dilakukan untuk mendapatkan data presisi.

### HASIL DAN PEMBAHASAN

Metode fase balik (*Reversed Phase*) pada kromatografi cair kinerja tinggi merupakan mode analisa yang paling populer dan rutin digunakan dalam industri farmasi (Dolan, 2008). Mode kromatografi ini sesuai untuk analisa senyawa farmasi yang umumnya berupa senyawa organik yang bersifat asam atau basa lemah. Pada fase balik, fase diam bersifat non-polar dan fase gerak yang digunakan bersifat polar. Beberapa fase gerak yang digunakan pada pemisahan fase balik antara lain air, metanol, acetonitrile atau tetrahydrofuran. Penggunaan fase gerak polar ini mengeliminir penggunaan fase gerak non-polar yang banyak digunakan pada mode fase normal seperti heksan dan kloroform yang bersifat mudah menguap dan toksik (Christian, 2013).

Fase diam yang umum digunakan pada mode fase balik adalah kolom silika yang direaksikan sehingga memiliki ikatan dengan atom Karbon dengan rantai 8 atau 18 (Christian, 2013). Karena merupakan standar emas pada analisa senyawa farmasi, instrumentasi KCKT untuk penggunaan fase balik dengan kolom C8 maupun C18 seringkali dijumpai sebagai perangkat dasar pada industri farmasi (Dolan, 2008).

Meski dapat digunakan pada pemisahan pada cukup banyak senyawa, mode fase balik memiliki kelemahan pada pemisahan senyawa yang bersifat polar ataupun memiliki muatan (Dolan, 2008). Thiamine mononitrate merupakan senyawa organik yang bersifat basa dengan muatan positif dari atom Nitrogen pada cincin Thiazole (Kim dkk., 2023). Pada pemisahan menggunakan mode fase balik biasa, Thiamine mononitrate tidak teretensi dan terelusi pada waktu yang sama dengan pelarut.

Retensi pyridoxine hydrochloride pada mode fase balik tidak lebih baik. Dengan 4 hidrogen donor dan 4 hidrogen akseptor, topological surface area 73,3 Å dan log P -0,95 (Kim dkk., 2023; Wishart dkk., 2006), nilai faktor kapasitas yang diperoleh kurang dari 2.

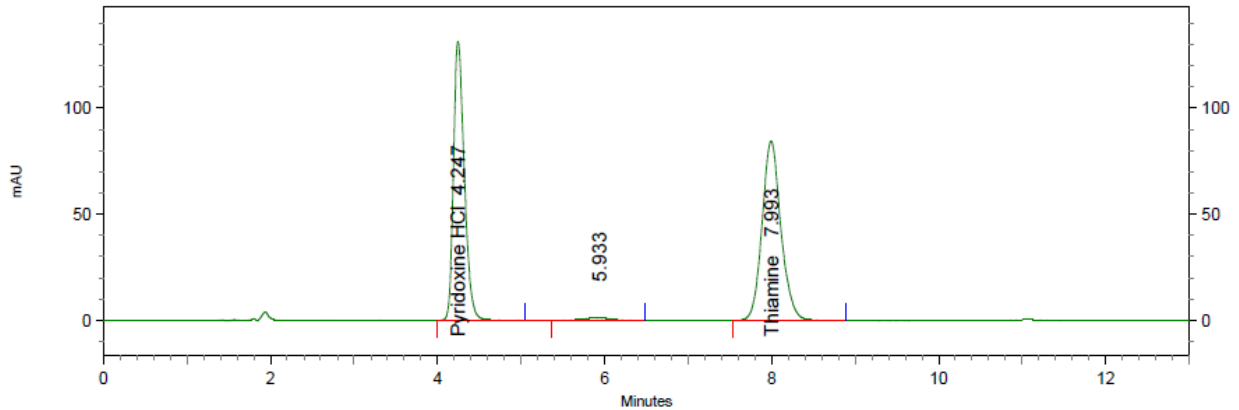
Sementara cyanocobalamine teretensi dengan cukup baik pada sistem yang sama. Dengan melihat variabilitas sifat fisika kimia analit, penggunaan mode kromatografi pasangan ion menjadi alternatif yang lebih baik untuk diterapkan pada jenis sampel ini (Knox, 1976).

Pemisahan campuran analit menggunakan metode pasangan ion dapat dilihat pada Gambar 2. Retensi analit secara berturut-turut menghasilkan nilai  $k'$  = 1,8; 2,9 dan 4,3. Pemisahan antar analit baik ditandai dengan nilai  $R_s > 2$ . Asimetri puncak menghasilkan nilai 1,12 untuk B1, 1,3 pada B6 dan 1,17. Uji linieritas menunjukkan hasil seperti yang ditampilkan pada Gambar 3 dengan nilai  $r$  hitung mendekati 1. Uji akurasi pada tiga tingkatan kadar 80%, 100% dan 120% memberikan rata-rata penerimaan kembali sebesar 99,50% dengan  $rsd$  0,41 untuk Thiamine mononitrate, 99,84%  $\pm$  1,12 untuk Pyridoxine HCl dan 101,30%  $\pm$  0,41 untuk Cyanocobalamine. Tidak satupun akurasi jatuh dalam rentang di luar 98,0%-102,0%. Uji presisi dilakukan pada parameter keterulangan/ *repeatabilitas* dengan hasil  $rsd$  dari 6x pengulangan preparasi analisa sampel sebesar 0,83%; 0,56% dan 1,73% berturut-turut untuk Pyridoxine, Cyanocobalamine dan Thiamine mononitrate. Ketiganya memenuhi persyaratan ICH dengan nilai  $< 2\%$ . Dari hasil validasi metode analisa rentang dibuktikan pada kadar 80–120 ppm untuk B1 dan B6 serta 4–6 ppm untuk B12.

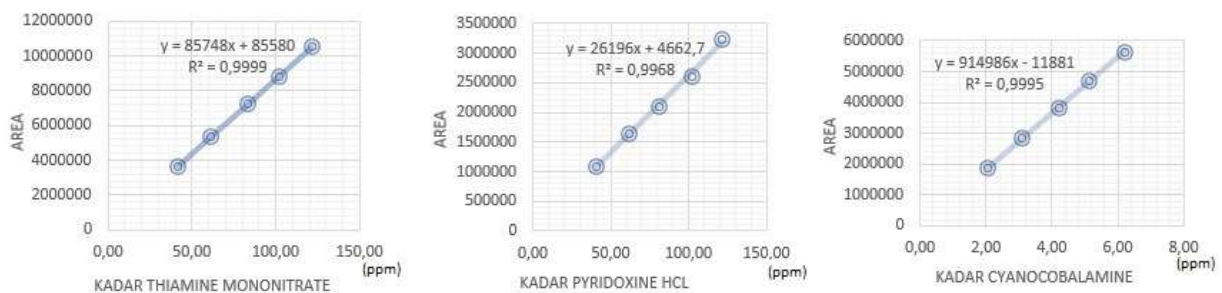
Pada mode kromatografi pasangan ion, analisa dilakukan dengan menggunakan instrumentasi yang sama dengan fase balik dengan menambahkan reagen pasangan ion (*ion pair*) yang memiliki muatan berbeda dengan analit yang akan dianalisa. Pada metode ini reagen pasangan ion yang digunakan adalah sodium heksan sulfonat yang bermuatan negatif. Mekanisme retensi yang diajukan terkait mode ini antara lain adalah pemodelan partisi, pemodelan adsorpsi, dan pemodelan elektrostatik (Weiss, 2016).

Pemodelan partisi mengasumsikan senyawa analit berinteraksi dengan reagen pasangan ion yang memiliki muatan berbeda dan membentuk senyawa non polar yang dapat berinteraksi dengan fase diam. Pada pemodelan adsorpsi, rantai alkil dari reagen pasangan ion yang bersifat hidrofobik diasumsikan berinteraksi dan terikat pada fase diam non polar menyebabkan fase diam memiliki muatan. Muatan tersebut bertindak seakan-akan sebagai “penukar ion” pada analit dengan muatan berbeda (Weiss, 2016).

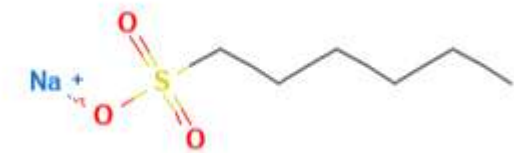
Pada pemodelan elektrostatik, diasumsikan reagen pasangan ion dan pasangan ion bebasnya, menciptakan lapisan elektrostatik dengan muatan yang berbeda. Analit akan mengalami atraksi elektrostatik pada reagen pasangan ion yang menyebabkan keduanya seakan-akan teradsorpsi pada fase diam dan meningkatkan retensi senyawa dalam kolom (Weiss, 2016).



**Gambar 2.** Kromatogram dengan puncak B6 pada tR 4,247; B12 pada tR 5,933; B1 pada tR 7,993



**Gambar 3.** Kurva linieritas



**Gambar 4.** Sodium heksan sulfonat (Kim dkk., 2023)

Metode ini menggunakan reagen pasangan ion sodium heksan sulfonat (Gambar 4) yang bermuatan negatif. Muatan tersebut berkebalikan dengan muatan positif yang terdapat pada analit. Hal lain yang perlu diperhatikan adalah memastikan analit berada dalam kondisi terionisasi. Pemilihan pH 3 pada fase gerak dilakukan untuk memaksimalkan interaksi antara reagen pasangan ion dan analit. Kromatografi pasangan ion juga sensitif terhadap konsentrasi ion yang dapat berkompetisi untuk berpasangan dengan reagen pasangan ion dan menciptakan muatan elektrostatis selama pemisahan berlangsung.

#### DAFTAR PUSTAKA

Agilent Technologies, 2016, *The LC Handbook: Guide to LC Columns and Method Development*, USA.

Christian, G.D., Gargupta, P.K., & Schug, K.A., 2013, *Analytical Chemistry*, 7th ed. John Wiley & Sons, Inc.

Meski sangat bermanfaat dalam menganalisa analit bermuatan dan memiliki kepolaran yang tinggi, metode pasangan ion juga memiliki kekurangan yang perlu diperhatikan untuk mendapatkan metode dengan keterulangan yang baik. Metode pasangan ion membutuhkan waktu ekuilibrasi yang lebih lama dibandingkan dengan metode fase balik biasa untuk mencapai sistem yang stabil. Selain itu eluasi secara gradien tidak begitu direkomendasikan dengan alasan yang sama, meski bukan berarti tidak dapat dilakukan (Dolan, 2008).

#### KESIMPULAN

Kromatografi pasangan ion dapat menjadi alternatif metode analisa yang mudah, terjangkau serta dapat diaplikasikan pada analit yang bermuatan dan bersifat polar, khususnya kombinasi Vitamin B1, B6 dan B12.

#### UCAPAN TERIMA KASIH

Ucapan terima kasih penulis haturkan pada semua pihak yang memungkinkan penelitian ini untuk dapat ditulis dan diterbitkan.

Dolan, J.W., 2008, Ion Pairing-Blessing or Curse, *LCGC Europe*, 21(5):258-263.

ICH, 2022, Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology, *International Conference on Harmonization (ICH)*, Q2(R2), Geneva.

Kementerian Kesehatan RI, 2020, Farmakope Indonesia Edisi VI, Jakarta: Kementerian Kesehatan RI.

Kim, S., Chen, J., Cheng, T., Gindulyte, A., He, J., He, S., Li, Q., Shoemaker, B. A., Thiessen, P. A., Yu, B., Zaslavsky, L., Zhang, J. & Bolton, E.E., 2023, PubChem 2023 update, *Nucleic Acids Research*, 51(D1): D1373–D1380, <https://doi.org/10.1093/NAR/GKAC956>.

Knox, J.H., Laird, G.R., 1976, Soap chromatography—a new high-performance liquid chromatographic technique for separation of ionizable materials: Dyestuff intermediates,

*Journal of Chromatography A*, 122(C):17–34, [https://doi.org/10.1016/S0021-9673\(00\)82234-7](https://doi.org/10.1016/S0021-9673(00)82234-7).

Sweetman, S. (Ed.), 2008, *Martindale: The Complete Drug Reference 36*, London: Pharmaceutical Press.

Weiss, J., 2016, *Handbook of Ion Chromatography*, Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim, Germany.

Wishart, D.S., Knox, C., Guo, A.C., Shrivastava, S., Hassanali, M., Stothard, P., Chang, Z., & Woolsey, J., 2006, DrugBank: a comprehensive resource for in silico drug discovery and exploration, *Nucleic Acids Research*, 34(Database issue):D668–D672, <https://doi.org/10.1093/NAR/GKJ067>.