

Pengembangan dan Validasi Metode Analisis Amlodipin Besilat dan Identifikasi Cemarannya dalam Sediaan Tablet

Analytical Method Development and Validation Of Amlodipine Besylate and Identification Its Impurities in Tablets Dosage Form

Muhammad Haqqi Hidayatullah^{1*}, Slamet Ibrahim², Benny Permana²

¹Fakultas Farmasi, Universitas Muhammadiyah Surakarta, Jl. A. Yani Tromol Pos 1, Sukoharjo, Indonesia

²KK Farmakokimia, Sekolah Farmasi, Institut Teknologi Bandung, Jalan Ganesha 10, Bandung, Indonesia

*E-mail: mhh996@ums.ac.id

Received: 20 Oktober 2022; Accepted: 17 Desember 2022; Published: 31 Desember 2022

Abstrak

Amlodipin besilat merupakan salah satu contoh obat oral untuk pengobatan hipertensi yang termasuk kelas penghambat saluran kalsium dihidropiridin. Amlodipin tablet termasuk sediaan farmasi sehingga syarat sediaan farmasi yang baik harus terpenuhi, yaitu berkhasiat, berkualitas dan aman. Keamanan sediaan farmasi dapat dipengaruhi oleh keberadaan cemaran organik. Oleh karena itu perlu dilakukan pengembangan metode analisis cemaran dengan metode degradasi paksa karena sulit untuk memperoleh baku pembanding cemaran. Sistem Kromatografi Cair Kinerja Tinggi (KCKT) yang digunakan adalah fase diam kolom Eclipse Plus C18 (150 x 4,6 mm, 5 µm), fase gerak campuran trietilamin (TEA) : metanol (40:60 %v/v) dengan kecepatan alir 1 mL/menit, detektor UV 237 nm dan volume injeksi 10 µL. Validasi metode analisis memberikan hasil linieritas dengan nilai R² sebesar 0,9996, batas deteksi adalah 18,46 µg/mL dan nilai batas kuantitasi adalah 61,54 µg/mL. Parameter presisi memberikan nilai koefisien variasi sebesar 1,18-1,26%. Persen perolehan kembali sebesar 98,07-102,44% ± 0,47-1,14 dan nilai rentang proporsional (R² = 0,9993) pada rentang uji. Sistem KCKT memenuhi syarat uji kesesuaian sistem. Terdapat 2 dari 5 puncak produk degradasi yang terdeteksi pada degradasi paksa kondisi asam dan basa. Aplikasi metode analisis pada sampel komersial memberi kan hasil kadar Amlodipin 90,79-95,68% dan tidak terdeteksi adanya cemaran.

Kata Kunci: Amlodipin, metode analisis, degradasi paksa, validasi metode, cemaran

Abstract

Amlodipine besylate is one of the oral drugs for the treatment of hypertension which belongs to the class of dihydropyridine calcium channel blockers. Amlodipine tablets are a part of pharmaceutical preparations so the requirements for good pharmaceutical preparations must be met, they were efficacious, quality, and safe. The safety of pharmaceutical preparations can be affected by the presence of organic impurities. So, it is necessary to develop an analytical method for impurities with a stress test method because it is difficult to obtain a reference standard for the comparison of impurities. The High-Performance Liquid Chromatography (HPLC) system used was Eclipse Plus C18 column (150 x 4.6 mm, 5 µm) as stationary phase, the mobile phase was a mixture of triethylamine (TEA): methanol (40:60 %v/v) with flow rate 1 mL/min, UV detector 237 nm and injection volume 10 µL. The validation of the analytical method had linearity results with an R² value of 0.9996, the limit of detection was 18.46 µg/mL and the limit of quantitation limit value was 61.54 µg/mL. The precision parameter gave a coefficient of variation of 1.18-1.26%. The percent recovery is 98,07-102,44% ± 0,47-1,14 and the value of the range was proportional (R² = 0.9993) in the range parameter. The selected HPLC system complied with the system suitability test requirements. There are 2 of 5 peaks of degradation products detected at stress test in acid and base stressors. The application of the analytical method on commercial samples gave the results of Amlodipine levels of 90.79-95.68% and no impurities were detected.

Keywords: Amlodipine, analytical method, force degradation, method validation, impurity

PENDAHULUAN

Amlodipin (**Gambar 1**) dengan penamaan kimia 2-[(2 aminoetoksi) metil]-4-(2-klorofenil)-1,4-dihidro-6-metil-3,5 asam piridindikarboksilat 3-etil 5-metil ester. Amlodipin berperan sebagai penghambat kanal kalsium sehingga memiliki manfaat sebagai antihipertensi untuk pengobatan angina (Tiwari dkk., 2015). Amlodipin termasuk dalam golongan penghambat saluran kalsium dihidropiridin oral. Amlodipin memiliki waktu paruh yang paling panjang dibandingkan obat penghambat saluran kalsium dihidropiridin oral lain. Amlodipin tersedia sebagai Amlodipin besilat, yang awalnya disetujui pada tahun 1987 oleh FDA (Bulsara dan Cassagnol, 2021). Amlodipin besilat berperan sebagai penghambat saluran kalsium dengan mekanisme menghambat masuknya awal kalsium sehingga menyebabkan penurunan tekanan darah (Tang dkk., 2016). Selain berperan sebagai antihipertensi, Amlodipin besilat dapat digunakan dalam terapi angina dengan mekanisme menghambat masuknya ion kalsium transmembran ke dalam otot polos pembuluh darah dan otot jantung (Tiwari dkk.,



Gambar 1. Struktur kimia Amlodipin Besilat

2015).

Amlodipin merupakan sediaan farmasi harus memenuhi kriteria sediaan farmasi yang baik, yaitu keamanan, efikasi dan farmasetis. Adanya cemaran organik pada produk farmasi dapat mempengaruhi keamanan dari produk

obat. Keberadaan cemaran organik pada produk obat harus ditetapkan untuk menjaga kualitas produk obat (WHO, 2003). Aspek keamanan dilakukan dengan pengujian rutin sebelum produk dirilis (Basak et al., 2007).

Metode analisis diperlukan untuk mengidentifikasi keberadaan cemaran pada sediaan Amlodipin. Pengujian stabilitas obat di bawah kondisi stres dapat dilakukan untuk menguji cemaran pada produk obat karena jumlah hasil degradasi yang timbul selama penyimpanan jumlahnya sangat rendah (Blessy dkk., 2014). Induksi dilakukan dengan beberapa kondisi stres untuk meningkatkan jumlah hasil degradasi yang terbentuk sehingga mempermudah untuk menganalisis hasil degradasi yang terbentuk (Bakshi dan Singh, 2002).

Metode analisis kemudian dilakukan validasi berdasarkan pedoman ICH (ICH, 2005). Tahapan yang perlu dilakukan adalah mengisolasi, mengidentifikasi dan menetapkan kadar degradasi (Ali et al., 2012). Modifikasi metode dilakukan jika metode yang ada tidak memenuhi kriteria keberterimaan validasi kemudian lakukan validasi kembali (Shah et al., 2012).

Amlodipin merupakan salah satu obat antihipertensi yang banyak digunakan di Indonesia (Tutoli et al., 2021; Udayani and Riastini, 2018; Fatimah dan Mutmainah, 2022; Yulianti dan Chiburdanidze, 2018). Tablet Amlodipin sebagai sediaan obat perlu dijaga keamanannya dari keberadaan cemaran. Cemaran organik merupakan salah satu unsur yang dapat memengaruhi kualitas obat (ICH, 2003). Cemaran yang muncul pada saat penyimpanan produk sediaan farmasi harus dapat diidentifikasi untuk memastikan kualitas dari sediaan obat. Metode analisis diperlukan untuk mengidentifikasi keberadaan cemaran pada sediaan Amlodipin.

Pengembangan metode analisis cemaran memerlukan waktu yang lama karena untuk melihat adanya cemaran membutuhkan waktu penyimpanan yang lama. Degradasi paksa dilakukan untuk mengefisienkan waktu dalam pengembangan metode analisis cemaran dalam sediaan farmasi (Blessy dkk., 2014). Degradasi paksa dilakukan dengan memberikan kondisi paparan yang ekstrem. Setelah diberikan paparan kondisi ekstrem, kemudian dilakukan pengembangan metode analisis untuk mengidentifikasi cemaran.

Metode analisis untuk mengidentifikasi cemaran dari tablet Amlodipin dengan KCKT sistem kromatografi gradien (Tiwari dkk., 2015). Sistem gradien tidak bisa diaplikasikan pada semua instrument KCKT karena tidak semua KCKT memiliki sistem gradien sehingga perlu dilakukan pengembangan metode yang lebih sederhana yaitu sistem isokratik. Metode kromatografi menjadi pilihan karena kemampuan pemisahan senyawa secara simultan, identifikasi, penentuan senyawa kimia dan penetapan kadar (Hanwar et al., 2020; Moffat et al., 2011; Skoog et al., 2013).

Jumlah cemaran berupa hasil degradasi pada umumnya sangat kecil sehingga dibutuhkan metode analisis yang sensitif, selektif, akurat dan presisi (ICH, 2005). Baku pembanding cemaran sulit diperoleh sehingga untuk pengembangan metode analisis dilakukan dengan cara degradasi paksa dengan berbagai kondisi.

METODE PENELITIAN

Instrumen

Peralatan yang digunakan dalam penelitian ini adalah Kromatografi Cair Kinerja Tinggi (KCKT) Agilent Technologies 1220 Infinity LC, kolom kromatografi cair Eclipse Plus C18 5 μm (150 x 4,6 mm), perangkat lunak Agilent

OpenLAB CDS ChemStation, Ultrasonikator AE, timbangan analitik Mettler Toledo AG104.

Bahan

Bahan yang digunakan adalah baku pembanding Amlodipin Besilat dari PT Kimia Farma, Metanol Pro KCKT (Merck; Darmstadt, Jerman), Trietilamin (TEA) (Merck; Darmstadt, Jerman), Asam Sulfat (H_2SO_4) (Merck; Darmstadt, Jerman), Natrium Hidroksida (NaOH) (Merck; Darmstadt, Jerman), Hidrogen Peroksida (H_2O_2) (Merck; Darmstadt, Jerman), Akua Bidestilata (Ikapharmindo; Jakarta, Indonesia).

Sistem Kromatografi

Sistem yang digunakan adalah fase diam berupa kolom kromatografi cair Eclipse Plus C18 5 μm (150 x 4,6 mm), fase gerak TEA (pH 3,0) : metanol dengan perbandingan 40:60 dengan elusi isokratik dan laju alir 1 mL/menit. Panjang gelombang 237 nm dan volume injeksi 10 μL .

Larutan trietilamina dibuat dengan melarutkan 7,0 mL trietilamina P dalam 800 mL air kemudian atur pH hingga $3,0 \pm 0,1$ dengan penambahan asam fosfat P, encerkan dengan air hingga 1000,0 mL

Preparasi fase gerak dilakukan dengan mencampurkan trietilamin pH 3,0 dan metanol pro KCKT dengan perbandingan 40:60 kemudian disaring dengan menggunakan kertas saring Whatman No 41 lalu dilakukan diawaudarakan dengan sonikasi selama 15 menit.

Preparasi Larutan Induk

Larutan induk Amlodipin Besilat dibuat dengan konsentrasi 600 $\mu\text{g/mL}$ dalam fase gerak. Sebanyak 15 mg baku Amlodipin Besilat dilarutkan dalam labu takar 25,0 mL.

Uji Kesesuaian Sistem KCKT

Uji Kesesuaian Sistem KCKT dilakukan pada standar kerja 60 µg/mL sebanyak 6 kali dan dievaluasi nilai simpangan baku relatif luas area dan waktu retensi, resolusi, faktor ikutan, faktor kapasitas dan angka pelat teoritis.

Metode Stres (Sahu et al., 2010)

a. Hidrolisis Asam

Sejumlah 1,0 mL larutan standar Amlodipin Besilat 600 µg/mL ditambahkan 1 mL HCl 0,1 M diinkubasi pada suhu 80°C selama 24 jam.

b. Hidrolisis Basa

Sejumlah 1,0 mL larutan standar Amlodipin Besilat 600 µg/mL ditambahkan 1 mL NaOH 0,1 M diinkubasi pada suhu 80°C selama 24 jam.

c. Hidrolisis Netral

Sejumlah 1,0 mL larutan standar Amlodipin Besilat 600 µg/mL ditambahkan 1 mL aquades diinkubasi pada suhu 80°C selama 24 jam.

d. Fotolisis

Sejumlah 1,0 mL larutan standar Amlodipin Besilat 600 µg/mL diberi paparan sinar matahari selama 2 hari durasi 2 jam per hari pada vial bening tertutup.

e. Oksidatif

Sejumlah 1,0 mL larutan standar Amlodipin Besilat 600 µg/mL ditambahkan 1 mL H₂O₂ 30%, disimpan pada suhu ruang selama 5 hari. Larutan diencerkan hingga konsentrasi 60 µg/mL.

f. Panas

Sampel padat dipanaskan pada suhu 50°C selama 60 hari dalam oven. Kemudian dilarutkan hingga konsentrasi 60 µg/mL.

Validasi Metode Analisis

a. Selektivitas

Selektivitas dilakukan dengan melakukan analisis terhadap larutan baku, pelarut dan sampel hasil degradasi paksa.

Kriteria keberterimaan dinilai dengan melihat adanya puncak lain dengan resolusi yang cukup.

b. Linearitas

Seri konsentrasi larutan uji Amlodipin Besilat dibuat sebanyak 6 konsentrasi. Seri konsentrasi yang dibuat 24 – 84 µg/mL. Dibuat kurva kalibrasi antara respon terhadap konsentrasi kemudian dihitung persamaan regresi, koefisien korelasi, koefisien variasi regresi linear, batas deteksi, dan batas kuantitasi.

c. Presisi

Sebanyak 6 larutan sampel 60 µg/mL dibuat dengan menimbang sampel yang setara dengan 15 mg Amlodipin Besilat dilarutkan pada labu takar 25,0 mL. Dihitung nilai simpangan baku relatif untuk presisi pada hari yang sama (*intraday*) dan presisi pada hari yang berlainan (*interday*).

d. Akurasi

Uji akurasi dilakukan dengan metode sampel adisi standar Amlodipin Besilat. Sampel adisi dibuat dengan penambahan standar Amlodipin Besilat 80-120 % pada larutan sampel 60 µg/mL. Ditentukan persen perolehan kembali dari masing-masing penambahan standar.

e. Rentang

Uji rentang dilakukan dengan seri penimbangan sampel yang berbeda sehingga diperoleh konsentrasi 24 – 84 µg/mL.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Studi Degradasi Paksa

Degradasi paksa yang dilakukan pada Amlodipin menunjukkan tidak terdegradasi pada kondisi hidrolisis netral, oksidatif (H₂O₂), panas dan fotolisis. Degradasi paksa pada suasana hidrolisis asam dan basa menunjukkan Amlodipin Besilat terdegradasi.

Studi degradasi paksa pada kondisi asam membentuk tiga produk degradasi dan dua produk degradasi pada kondisi basa. Spesifisitas dievaluasi dengan parameter waktu retensi dan waktu retensi relatif. Konsentrasi untuk melakukan degradasi paksa adalah 600 µg/mL. Waktu retensi (*Retention Time/RT*) dan waktu retensi relatif (*Relative Retention Time/RRT*) hasil degradasi paksa asam ditunjukkan pada **Tabel 1**.

Tabel 1. Nilai RT dan RRT Sampel Hasil Degradasi Paksa Asam

Puncak	RT	RRT ^{a)}
1	3,300	0,45
2	4,922	0,68
3	5,222	0,72
4	7,291	1,00 ^{b)}

Keterangan : a) perbandingan antara RT puncak cemaran dengan RT puncak Amlodipin, b) puncak Amlodipin

Tabel 2. Nilai RT dan RRT Sampel Hasil Degradasi Paksa Basa

Puncak	RT	RRT ^{a)}
1	2,492	0,35
2	4,642	0,64
3	7,213	1,00 ^{b)}

a) perbandingan antara RT puncak cemaran dengan RT puncak Amlodipin, b) puncak Amlodipin

Kromatogram hasil studi degradasi paksa asam menunjukkan terdapat 3 puncak baru yang terbentuk. Produk hasil degradasi memiliki RRT 0,45; 0,68 dan 0,72 terhadap puncak Amlodipin yang memiliki RT 7,291. Sampel terdegradasi sebesar 32,3%. Pada kondisi degradasi paksa pada kondisi basa dengan penambahan 0,1 M NaOH selama 24 jam pada suhu 80°C menghasilkan 2 puncak hasil degradasi baru. Puncak baru yang terbentuk muncul dengan RRT 0,35 dan 0,64 terhadap puncak utama Amlodipin dengan RT 7,213 (**Tabel 2**).

Produk degradasi tidak terbentuk pada kondisi degradasi paksa dengan metode hidrolisis netral dengan penambahan air. Produk degradasi juga tidak terbentuk pada degradasi paksa pada metode degradasi oksidatif dengan paparan H₂O₂ selama lima hari. Hal ini menunjukkan bahwa Amlodipin stabil terhadap stres oksidatif. Amlodipin juga stabil terhadap paparan sinar matahari langsung selama dua hari. Pada kondisi paparan suhu 50°C selama 2 bulan, Amlodipin tidak terdegradasi. Hal ini menunjukkan bahwa Amlodipin tahan terhadap paparan panas.

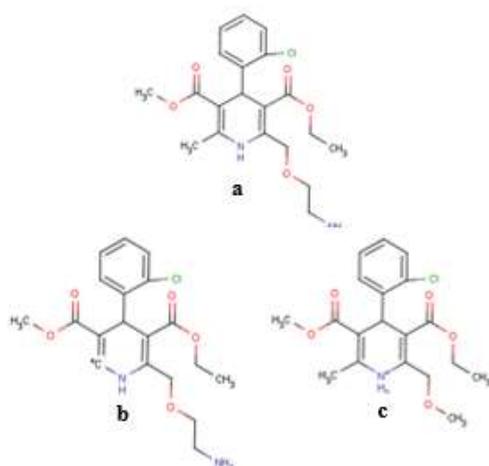
Identifikasi Cemaran

Cemaran yang terbentuk dari degradasi paksa dilakukan identifikasi. Identifikasi cemaran dilakukan dengan membandingkan RRT hasil penelitian dengan RRT pada penelitian. Tiwari dkk., 2015. RRT diperoleh dari perbandingan antara RT puncak cemaran terhadap RT puncak Amlodipin. Ketika terdapat puncak dengan nilai RRT yang sama, maka dapat diperkirakan bahwa senyawa yang terbentuk juga sama. Perbandingan RRT dilakukan karena standar cemaran sulit diperoleh.

Tabel 3. Perbandingan nilai RRT puncak hasil degradasi metode asam dan referensi

Urutan Puncak	Hasil Degradasi	Referensi ^{*)}
1	0,45	0,17
2	0,68	0,67
3	0,72	0,89
4	1,00	1,00
5		1,54

*)Tiwari et al., 2015



Gambar 2. Struktur kimia (a) Amlodipin, (b) Struktur Cemarannya 1 dan (c) Struktur Cemarannya 2

Pada degradasi paksa metode asam dengan penambahan HCl 0,1 M pada suhu 80°C memberikan 3 puncak baru dengan nilai RRT 0,45; 0,68 dan 0,72. Sedangkan pada penelitian referensi (Tiwari dkk., 2015) muncul 4 puncak baru selain puncak utama Amlodipin. Hasil perbandingan nilai RRT menunjukkan terdapat satu puncak yang memiliki nilai RRT yang mirip antara hasil penelitian dan referensi yaitu puncak 2 hasil penelitian dengan nilai RRT 0,68 dengan puncak 2 pada referensi dengan nilai RRT 0,67 (**Tabel 3, Gambar 3a**). Berdasarkan perbandingan RRT menunjukkan bahwa kedua puncak tersebut merupakan senyawa yang identik. Pada penelitian Tiwari dkk., 2015, hasil analisis Spektroskopi Massa menunjukkan bahwa rumus molekul yang mungkin untuk RRT 0,68 adalah $(C_{19}H_{22}N_2O_5Cl)^+$ (cemarannya 1) dengan massa m/z 393,0 (**Gambar 2b**). Cemarannya 1 merupakan hasil degradasi dari Amlodipin yang kehilangan gugus metil pada cincin 1,4-dihidropiridin dan muatan pada gugus amina

terminal berpindah ke atom karbon kelima di 1,4-dihidropiridin.

Terdapat 2 puncak baru yang terbentuk pada degradasi paksa metode basa dengan paparan NaOH 0,1 M pada suhu 80°C Puncak baru yang terbentuk memiliki nilai RRT 0.35 dan 0.64 terhadap puncak Amlodipin. Pada penelitian (Tiwari dkk., 2015) terdapat 9 puncak baru yang muncul.

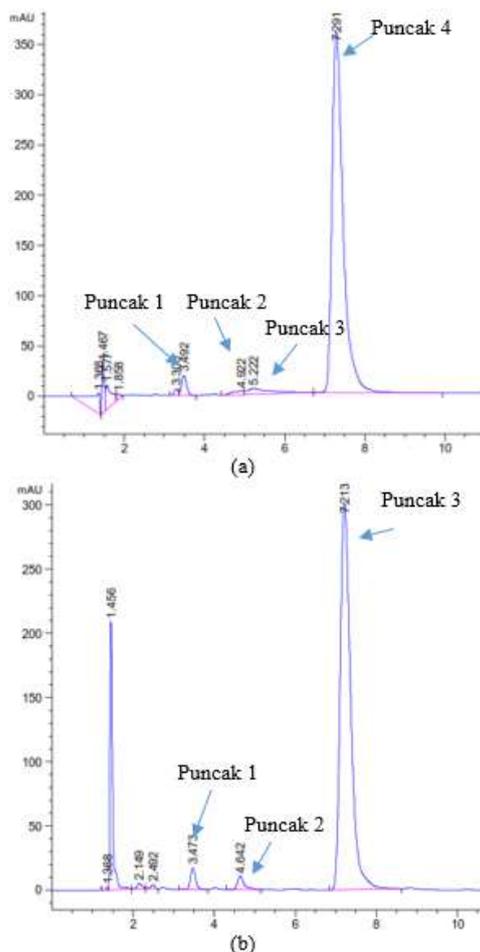
Tabel 4. Perbandingan nilai RRT puncak hasil degradasi metode basa dan referensi

Urutan Puncak	Hasil Degradasi	Referensi ^{*)}
1	0,35	0,17
2	0,64	0,45
3	1,00	0,52
4		0,59
5		0,63
6		0,67
7		1,00
8		1,47
9		1,54

^{*)}Tiwari et al., 2015

Puncak yang memiliki RRT yang mirip antara hasil penelitian dan referensi yaitu puncak 2 hasil penelitian dengan nilai RRT 0,64 dan puncak 5 dari referensi yang memiliki RRT 0,63 (**Tabel 4, Gambar 3b**). Perbandingan nilai RRT dapat disimpulkan bahwa kedua puncak tersebut merupakan senyawa yang identik.

Hasil analisis Spektroskopi Massa pada penelitian Tiwari dkk., 2015 menunjukkan bahwa puncak dengan nilai RRT 0,64 adalah $(C_{19}H_{23}NO_5Cl)^+$ (cemarannya 2) yang memiliki massa m/z 380.83 (**Gambar 2c**). Cemarannya 2 terbentuk dari terputus gugus metamin pada gugus samping di posisi karbon 2 pada cincin 1,4-dihidropiridin.



Gambar 3. Kromatogram hasil degradasi paksa (a) asam dan (b) basa

Konsentrasi cemaran dihitung dengan metode Normalisasi Area. Normalisasi area merupakan metode untuk menghitung kadar dengan membandingkan luas area bawah

kurva dari puncak yang akan dihitung dengan total luas area bawah kurva pada kromatogram. Metode normalisasi area dapat dilakukan jika tidak terdapat standar dari senyawa yang akan ditetapkan kadarnya.

Konsentrasi masing-masing puncak yang terbentuk pada degradasi paksa asam adalah puncak 1 : 0,51%, puncak 2 : 0,84% dan puncak 3 : 2,9%. Sedangkan konsentrasi untuk puncak pada degradasi paksa basa adalah puncak 1 : 0,34% dan puncak 2 : 1,79%.

Optimasi Sistem KCKT

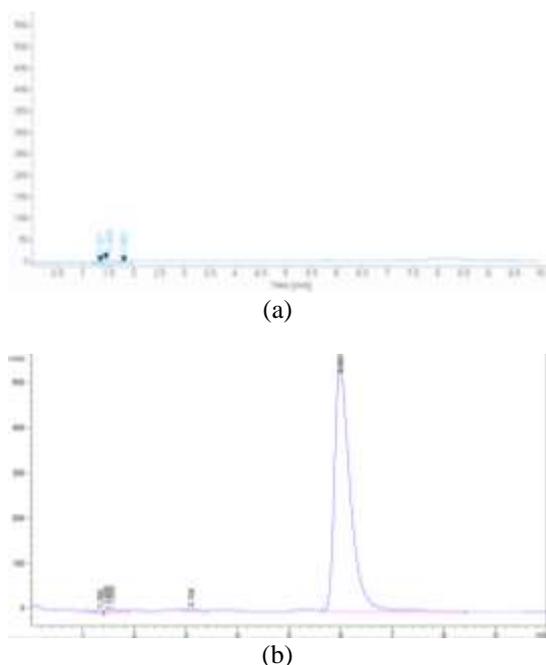
Analisis yang dilakukan menggunakan sistem kromatografi fase terbalik. Sistem kromatografi fase terbalik adalah jenis analisis kromatografi dimana fase gerak yang digunakan lebih polar daripada fase diamnya. Pada penelitian ini, fase diam yang digunakan adalah kolom oktadesil silika atau C18 yang tersusun dari rantai hidrokarbon sebanyak 18 yang terikat pada satu atom Silika (Si) sehingga memberikan sifat non polar pada fase diam. Penggunaan fase diam C18 paling banyak dipilih pada analisis Amlodipin karena sifat fisikokimia dari Amlodipin yang merupakan senyawa non polar.

Jenis elusi yang digunakan pada

Tabel 5. Hasil Optimasi Komposisi Fase Gerak dan Laju Alir Sistem KCKT

Perbandingan Fase Gerak		Laju alir (mL/menit)	Waktu retensi (menit)
TEA	Metanol		
0	100	0,8	1,802
		0,9	1,599
		1,0	1,435
5	95	0,8	1,824
		0,9	1,623
		1,0	1,486
10	90	0,8	1,903
		0,9	1,757
		1,0	1,611
15	85	0,8	2,143
		0,9	1,906
		1,0	1,775
40	60	0,8	7,062
		0,9	6,298
		1,0	5,627

penelitian ini adalah elusi isokratik. Elusi isokratik merupakan jenis elusi dengan menggunakan fase gerak yang tetap perbandingannya selama analisis. Elusi isokratik ini dipilih karena kemudahan dalam analisis dan hanya membutuhkan satu pompa. Elusi isokratik memiliki beberapa keunggulan diantaranya sederhana, biaya lebih rendah dan tidak memerlukan ekuilibrasi ulang kolom



Gambar 4. Perbandingan kromatogram (a) pelarut dan (b) standar Amlodipin 600 µg/ml

pada injeksi berturut-turut (García-Álvarez-Coque dkk., 2006).

Fase gerak yang digunakan adalah kombinasi TEA dan metanol. Trietilamin digunakan sebagai larutan penyangga untuk mempertahankan pH fase gerak. Penggunaan buffer pada fase gerak digunakan untuk menjaga kestabilan pH fase gerak dan mengoptimalkan bentuk puncak yang terbentuk. Pemilihan pH pada fase gerak mempertimbangkan pKa dari analit. Selain itu, konsentrasi buffer yang rendah memberikan reproduibilitas yang baik (Dolan, 2018). Metanol merupakan pelarut polar protik dan banyak digunakan sebagai fase gerak. Metanol banyak digunakan karena memiliki kelebihan yaitu dapat mendeteksi *ghost peak* dan tahan terhadap presipitasi pada pencampuran dengan beberapa jenis larutan penyangga (Shimadzu, 2019). Sehingga dipilih campuran trietilamin dan metanol sebagai fase gerak pada penelitian ini.

Optimasi sistem KCKT dilakukan berdasarkan komposisi fase gerak dan laju

alir. Variasi laju alir yang digunakan pada rentang 0,8-1 mL/menit. Percobaan dilakukan dengan berbagai variasi komposisi fase gerak dan dimulai dari fase gerak tunggal yaitu metanol.

Dari hasil optimasi, jumlah TEA pada perbandingan fase gerak meningkatkan retensi Amlodipin. Pada waktu analisis 2 menit, terdapat puncak dari pelarut sehingga diperlukan penyesuaian untuk meretensi Amlodipin lebih lama. Laju alir yang lebih besar mempercepat waktu retensi pada keseluruhan komposisi fase gerak. Berdasarkan hasil optimasi sistem KCKT, maka sistem yang digunakan adalah fase diam berupa kolom kromatografi cair Eclipse Plus C18 5 µm (150 x 4,6 mm), fase gerak terpilih TEA:metanol dengan perbandingan 40:60 dengan elusi isokratik dan laju alir 1 mL/menit, panjang gelombang 237 nm, dan volume injeksi 10 µL (**Tabel 5**).

Uji Kesesuaian Sistem

Uji kesesuaian sistem dilakukan untuk memastikan bahwa sistem KCKT yang telah dioptimasi sesuai untuk tujuan analisis. Uji kesesuaian sistem dilakukan menyuntikkan standar Amlodipin Besylate sebanyak enam kali berturut-turut dengan konsentrasi 60 µg/mL. Parameter uji kesesuaian sistem yang dilakukan adalah penyuntikan ulang larutan, resolusi (Rs), angka lempeng teoritis (N), faktor kapasitas (k') dan faktor ikutan (τ). Kriteria keberterimaan masing-masing parameter uji telah ditetapkan (USP, 2017).

Penyuntikan ulang larutan baku dilakukan untuk memastikan persyaratan presisi telah terpenuhi. Resolusi merupakan kemampuan kolom untuk melakukan pemisahan antara dua komponen pada saat analisis. Angka lempeng teoritis menunjukkan bahwa pemisahan saksama senyawa satu dan lainnya atau biasa disebut efisiensi kolom. Faktor kapasitas atau

Tabel 6. Hasil Uji Kesesuaian Sistem KCKT Penetapan Amlodipin

Parameter Uji	Kriteria Keberterimaan ^{*)}	Hasil Uji
SBR Penyuntikan Berulang	$SD \leq 2\%$	Luas area : 1,613% Waktu retensi : 0,045%
Resolusi	$\geq 1,5$	7,74
Angka Pelat Teoritis	> 2000	3346
Faktor Kapasitas	$1 < k' < 10$	2,91
Faktor Ikutan	≤ 2	1,56

^{*)} USP, 2017

yang dapat disebut faktor retensi dapat diperoleh dari waktu retensi masing-masing yang berdekatan. Hasil uji kesesuaian parameter pada sistem yang teroptimasi memenuhi syarat keberterimaan sesuai pada **Tabel 6**.

Validasi Metode Analisis

Validasi metode analisis merupakan suatu prosedur sistematis untuk memastikan bahwa metode analisis memenuhi persyaratan dan sesuai dengan tujuan penggunaan. Parameter validasi metode analisis antara lain spesifisitas, linieritas, akurasi, presisi, presisi antara dan rentang (ICH, 2005).

a. Spesifisitas

Uji spesifisitas dilakukan dengan membandingkan kromatogram baku pembanding Amlodipin Besilat dan kromatogram pelarut. Hasil kromatogram menunjukkan bahwa tidak terdapat puncak lain yang mengganggu puncak Amlodipin Besilat (**Gambar 4**). Oleh karena itu, dapat disimpulkan bahwa metode analisis KCKT telah memenuhi syarat spesifisitas.

b. Linieritas

Syarat kriteria keberterimaan linieritas adalah nilai koefisien korelasi (R) $> 0,999$ (AOAC, 2002). Seri larutan baku pada konsentrasi 24-84 $\mu\text{g/mL}$ kemudian diinjeksikan sebanyak tiga replikasi. Hasil uji linearitas menunjukkan nilai R^2 sebesar 0,9996 (**Tabel 7**) sehingga memenuhi kriteria keberterimaan.

c. Batas Deteksi dan Batas Kuantisasi

Perhitungan batas deteksi dan batas kuantisasi diperoleh dari kurva linieritas dengan menggunakan nilai standar deviasi. Nilai batas deteksi dan batas kuantisasi ditentukan dengan rumus berikut (Lister, 2005):

$$\text{Batas Deteksi} = \frac{3,3 \times \text{standar deviasi}}{\text{gradien kurva linieritas}}$$

$$\text{Batas Kuantisasi} = \frac{10 \times \text{standar deviasi}}{\text{gradien kurva linieritas}}$$

Perhitungan batas deteksi dan batas kuantisasi menggunakan standar deviasi residual dan gradien kurva linieritas (**Tabel 7**).

d. Presisi

Nilai yang diuji pada parameter presisi adalah koefisien variasi (KV) atau simpangan baku relatif (SBR). Nilai syarat keberterimaan untuk sediaan obat berdasarkan FDA adalah $< 2\%$ sedangkan berdasarkan **Tabel 7** yang diperoleh dari persamaan Horwitz, nilai syarat keberterimaan bergantung pada konsentrasi analit yang akan dianalisis. Semakin kecil konsentrasi analit yang akan dianalisis maka syarat keberterimaan semakin ketat. Syarat keberterimaan untuk presisi analisis Amlodipin adalah $RSD < 2,7\%$ karena konsentrasi analit pada sampel berada pada rentang 1-10% (AOAC, 2019). Konsentrasi analit pada sampel maka syarat keberterimaan untuk presisi analisis Amlodipin adalah $< 2,7\%$ (Rivera dan Rodríguez, 2011). Nilai RSD untuk parameter presisi *intraday* adalah 1,24

Tabel 7. Hasil Validasi Metode Penetapan Amlodipin dengan KCKT

Parameter	Hasil Uji
Spesifisitas	Tidak ada puncak yang mengganggu puncak Amlodipin
Linieritas	$r^2 = 0,9996$
Batas Deteksi	18,46 µg/mL
Batas Kuantitasi	61,54 µg/mL
Presisi Intraday	1,24 %
Presisi Interday	1,21 %
Akurasi (% recovery ± RSD)	98,07-102,44% ± 0.47-1.14
Rentang	$r^2 = 0,9993$

% dan pada uji presisi *interday* adalah 1,21 % (Tabel 7). Nilai Horwitz Ratio (Horrat) pada uji presisi *intraday* adalah 0,45 dan pada uji presisi *interday* adalah 0,42.

e. Akurasi

Nilai persen perolehan kembali dihitung untuk masing-masing konsentrasi. Nilai keberterimaan persen perolehan kembali untuk konsentrasi analit 1-10% adalah 97-103% (AOAC, 2019).

Nilai persen perolehan kembali pada pengujian akurasi ini adalah 98,07-101,44% (Tabel 7) sehingga metode analisis ini telah memenuhi syarat keberterimaan akurasi.

dengan konsentrasi 600 µg/mL untuk masing-masing sampel lalu dianalisis dengan sistem KCKT yang telah divalidasi. Hasil analisis sampel menunjukkan kadar Amlodipin antara 90,79-95,68% (Tabel 8) dan tidak terdapat adanya cemaran pada sediaan (Gambar 5). Kadar Amlodipin pada sampel memenuhi syarat pada Farmakope Indonesia yaitu 90-110%.

Tabel 8. Konsentrasi Amlodipin dalam Tablet Amlodipin Komersial

Sampel	Persen klaim (%)	Kandungan (mg/tablet)
Tablet Generik A	94,19	9.42
Tablet Generik B	90,79	9.08
Tablet Generik C	91,99	9.20
Tablet Branded D	92,64	9.26
Tablet Branded E	95,68	9.57

*) klaim kandungan per tablet 10 mg

(b)

Gambar 5. Hasil Analisis pada sampel Tablet Amlodipin komersial (a) Tablet Generik A, (b) Tablet Branded D

f. Rentang

Pengujian rentang dilakukan pada rentang konsentrasi 24-84 µg/mL. Pengujian rentang proporsional pada rentang konsentrasi uji dengan nilai R^2 adalah 0,9993 (Tabel 7).

Aplikasi Metode Analisis pada Sampel Komersial

Metode analisis yang telah divalidasi kemudian diaplikasikan pada sampel Tablet Amlodipin yang terdapat di pasaran untuk menganalisis Amlodipin dan cemarannya. Analisis dilakukan terhadap 5 merk Tablet Amlodipin yang terdiri dari 3 Tablet Amlodipin Generik dan 2 Tablet Amlodipin Branded. Dibuat konsentrasi larutan sampel

KESIMPULAN

Pengembangan metode analisis untuk Amlodipin dan cemaran pada Tablet Amlodipin menggunakan kromatografi cair kinerja tinggi (KCKT) dengan fase diam berupa kolom Eclipse Plus C18 5 µm (150 x 4,6 mm), fase gerak TEA:methanol (40:60 v/v) 237 nm, laju alir 1,0 mL/menit dan volume injeksi 10 µL memenuhi persyaratan

uji kesesuaian sistem dan parameter validasi berupa spesifisitas, linearitas, batas deteksi, batas kuantisasi, akurasi, presisi dan rentang.

Sistem kromatografi dapat mengidentifikasi keberadaan 5 puncak produk degradasi dimana 2 puncak diantaranya sudah

dikarakterisasi struktur kimianya. Kadar Amlodipin pada produk komersial yang dianalisis antara 90,79-95,68% dan tidak terdapat puncak cemaran pada sampel produk komersial.

Daftar Pustaka

- Ali, N.W., Abbas, S.S., Zaazaa, H.E.-S., Abdelrahman, M.M., Abdelkawy, M., 2012. Validated stability indicating methods for determination of nitazoxanide in presence of its degradation products. *Journal of Pharmaceutical Analysis* 2, 105–116.
- AOAC, 2019. Official methods of analysis of the Association of Analytical Chemist. Association of Official Analytical Chemist, Inc. Virginia USA.
- Bakshi, M., Singh, S., 2002. Development of validated stability-indicating assay methods—critical review. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 28, 1011–1040.
- Basak, A.K., Raw, A.S., Al Hakim, A.H., Furness, S., Samaan, N.I., Gill, D.S., Patel, H.B., Powers, R.F., Yu, L., 2007. Pharmaceutical impurities: Regulatory perspective for Abbreviated New Drug Applications. *Advanced Drug Delivery Reviews* 59, 64–72.
- Blessy, M., Patel, R.D., Prajapati, P.N., Agrawal, Y.K., 2014. Development of forced degradation and stability indicating studies of drugs—A review. *Journal of Pharmaceutical Analysis* 4, 159–165.
- Bulsara, K.G., Cassagnol, M., 2021. Amlodipine. StatPearls Publishing.
- Dolan, John. 2018. A Guide to HPLC and LC-MS Buffer Selection. ACE-HPLC : Aberdeen, Scotland
- Fatimah, U. Mutaminah, N., 2022, Evaluasi Rasionalitas Pengobatan Pada Pasien Diabetes Melitus Tipe 2 Di Puskesmas Tawang Sari Sukoharjo Tahun 2021, Naskah Publikasi. Universitas Muhammadiyah Surakarta
- García-Álvarez-Coque, M.C., Torres-Lapasió, J.R., Baeza-Baeza, J.J., 2006. Models and objective functions for the optimisation of selectivity in reversed-phase liquid chromatography. *Analytica Chimica Acta* 579, 125–145.
- Hanwar, D., Handayani, V.R., Suhendi, A., 2020. Validasi Metode HPLC untuk Analisis Kurkumin pada Ekstrak Rimpang Temulawak (*Curcuma xanthorrhiza* Roxb.). *The 12th University Research Colloquium 2020*, 371-378.
- ICH, 2003, Q1A (R2) : Stability Testing Of New Drug Substances And Products, *Stability Testing of New Drug Substances and Products*, ICH : EU.
- ICH, 2005. Q2 (R1) : Validation Of Analytical Procedures: Text And Methodology. ICH : EU
- Kemenkes RI, 2020, Farmakope Indonesia Edisi VI. Kemenkes RI : Jakarta
- Lister, A.S., 2005. 7 Validation of HPLC methods in pharmaceutical analysis, in: *Separation Science and Technology*. Elsevier, pp. 191–217.

- Moffat, A.C., Osselton, M.D., Widdop, B., Watts, J. (Eds.), 2011. Clarke's analysis of drugs and poisons: in pharmaceuticals, body fluids and postmortem material, Fourth edition. ed. Pharmaceutical Press, London ; Chicago.
- Rivera, C., Rodríguez, R., 2011. Horwitz Equation as Quality Benchmark In ISO/IEC 17025 Testing Laboratory. Firm of industrial engineers, S.C. : Mexico.
- Sahu, K., Patel, P., Karthikeyan, C., Trivedi, P., 2010. The ICH guidance in practice: Stress degradation studies on irbesartan and development of a validated stability-indicating UPLC assay. *Acta Chromatographica* 22, 189–205.
- Shah, B.P., Jain, S., Prajapati, K.K., Mansuri, N.Y., 2012. Stability Indicating Hplc Method Development. *IJPSR*, 2012; Vol. 3(9): 2978-2988.
- Shimadzu, 2019. 7 Key Differences in the Use of Methanol and Acetonitrile. <https://www.shimadzu.com/an/service-support/technical-support/lib/methanol-acetonitrile.html> (accessed on September 17th 2021)
- Skoog, D.A., West, D.M., Holler, F.J., Crouch, S.R., 2013. *Fundamentals of Analytical Chemistry*. Cengage Learning: Boston, Massachusetts, USA.
- Tang, L., Gamal El-Din, T.M., Swanson, T.M., Pryde, D.C., Scheuer, T., Zheng, N., Catterall, W.A., 2016. Structural basis for inhibition of a voltage-gated Ca²⁺ channel by Ca²⁺ antagonist drugs. *Nature* 537, 117–121.
- Tiwari, R.N., Shah, N., Bhalani, V., Mahajan, A., 2015a. LC, MS n and LC–MS/MS studies for the characterization of degradation products of Amlodipine. *Journal of Pharmaceutical Analysis* 5, 33–42.
- Tutoli, T.S., Rasdiana, N., Tahala, F., 2021. Pola Penggunaan Obat Antihipertensi Pada Pasien Hipertensi. *Tipe 1*, 127–135.
- Udayani, N.N.W., Riastini, N.W., 2018. Perbedaan Efektivitas Penggunaan Obat Amlodipin Tunggal Dengan Kombinasi Amlodipin Dan Lisinopril Pada Pasien Hipertensi Rawat Inap Di RS "X" Tabanan Tahun 2017. *Jurnal Ilmiah Medicamento* (4) No.2
- USP, 2017. *United States Pharmacopeia*, ed 40. United States Pharmacopeia Convention, Rockville.
- WHO (2003): *Effective medicines regulation : ensuring safety , efficacy and quality*, *WHO Policy Perspectives on Medicines*, WHO. 1–6.
- Yulianti, T., Chiburdanidze, A., 2018, Ketepatan Pemilihan Obat Antihipertensi Pada Pasien Hipertensi Rawat Jalan di Surakarta, *The 7th University Research Colloquium*, 663-668