

ANALISIS GLIKOSIDA KARDIOAKTIF DIGOKSIN MENGGUNAKAN ULTRA PERFORMANCE LIQUID CHROMATOGRAPHY (UPLC)

Triana Nurul Meirina, Atu Purnama Dewi, Harold Eka Atmaja, Vycke Yunivita Kusumah Dewi, Rovina Ruslami*

Laboratorium Farmakokinetik, Fakultas Kedokteran, Universitas Padjadjaran

Jl. Eijkman No. 38 Bandung 40161, Jawa Barat-Indonesia

*Alamat korespondensi: pharmacokinetic.lab@fk.unpad.ac.id

Abstrak: Digoksin merupakan glikosida kardioaktif, salah satu senyawa yang penting dalam terapi yang saat ini tersedia sebagai obat untuk pengobatan penyakit jantung. Penggunaan obat ini meningkat sejalan dengan bertambahnya penderita penyakit jantung. Oleh karena itu, perlu dilakukan penelitian dan monitoring penggunaan obat ini pada penderita penyakit jantung dalam proses terapi kesembuhan. Tujuan dari penelitian ini adalah untuk mengetahui metode analisis digoksin dengan menggunakan alat *Ultra Performance Liquid Chromatography* (UPLC). Digoksin yang digunakan adalah Fargoksin (*Injection* 0,25 mg/mL, ampoule/berbentuk cairan). Pengenceran digoksin dilakukan dengan penambahan pelarut metanol. Kolom yang digunakan adalah kolom BEH C18. Optimasi metode analisis yang dilakukan meliputi perbandingan pelarut yang digunakan, suhu kolom, dan laju alir. Setelah melakukan optimasi, diperoleh kondisi fasa gerak yang optimum adalah larutan air-asetonitril (72:28%), laju alir 0,3 mL/menit, waktu selama \pm 6 menit, suhu kolom off, dan detektor yang digunakan adalah spektrofotometer UV dengan panjang gelombang 218 nm. Pengulangan analisis dengan menggunakan hasil yang diperoleh secara optimum dilakukan sebanyak sepuluh kali. Berdasarkan data tersebut, proses analisis dengan menggunakan UPLC dapat berlangsung lebih cepat dibandingkan dengan menggunakan HPLC.

Kata kunci: UPLC, Digoksin, Bioanalisis

Abstract: Cardioactive glycoside Digoxin is one of the important compounds in therapy that is currently available as a drug for the treatment of heart disease. The use of these drugs increases as the growth of heart disease patient, so it is necessary to research and to monitor these drugs in patients with heart disease in the process of healing therapy. The purpose of this study was to examine the method of digoxin analysis by using *Ultra Performance Liquid Chromatography* (UPLC). Digoxin used was Fargoksin (*Injection* 0.25 mg/mL, ampoule/liquid forms). Methanol was used to prepare digoxin solutions. A BEH C18 column was used. Optimization was conducted by selecting experimental conditions to include composition of eluent used, column temperature, and flow rate of mobile phase. It was found that the optimal conditions were: mobile phase, water:acetonitrile (72:28, v/v); flow rate, 0.3 mL/min; elution time, 6 minutes; column temperature, ambient (room temperature); and detection of eluates, UV detector at 218 nm. The analysis of a digoxin sample has been done using the optimal experimental conditions. In order to get the best analytical data, a ten replicates experiment has been done. Based on data collected, it was found that using UPLC, analysis time was shorter than analysis time in analysis using HPLC.

Keywords: UPLC, Digoxin, Bioanalyze

PENDAHULUAN

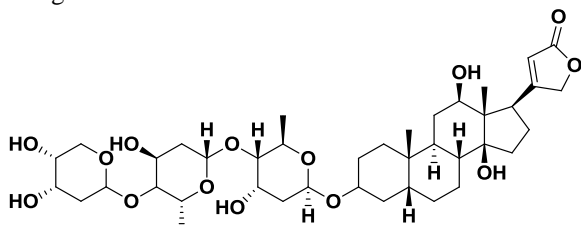
Digoksin (Gambar 1) adalah glikosida kardioaktif yang merupakan obat jantung sekunder yang diisolasi dari daun *Digitalis lanata* dan *Digitalis purpurea* melalui konversi enzimatik dari masing-masing obat glikosida jantung primer, lanatosida A dan C. Digoksin merupakan obat yang paling sering digunakan dalam pengobatan kongestif pada kegagalan jantung. *Digitalis lanata* (*Scrophulariaceae*) merupakan tanaman obat yang signifikan sebagai sumber senyawa lanatosida C dan digoksin, telah diketahui bahwa lanatosida C diubah menjadi digoksin melalui deglukosilasi oleh enzim *digilanidase* pada daun dan yang kemudian mengalami deasetilasi (Ikeda *et al.*, 1992). Digoksin berbentuk kristal glikosida, obat ini mempengaruhi tidak hanya otot-otot jantung, tetapi juga otot lurik dan

rangka, tubulus ginjal dan pusat saraf lainnya. Dengan demikian penentuan konsentrasi digoksin dalam darah, otot jantung dan ginjal adalah suatu hal yang penting dalam konfirmasi racun mematikan yang disebabkan senyawa ini (Adamowicz *et al.*, 2002). Hingga saat ini mekanisme aksi dari digitalis (digoksin) dalam hati manusia telah dipelajari secara ekstensif, termasuk dasar klinis dan molekuler dari terapeutik dan efek racunnya (Lelievre & Lechat, 2007).

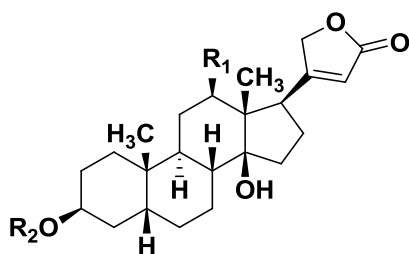
Digoksin, sebuah *cardenolide digitalis*, masih menjadi obat pilihan untuk pengobatan gagal jantung kongestif, yaitu bertindak sebagai inhibitor selektif dari Na^+ , K^+ ATPase enzim.

Senyawa-senyawa *cardenolide digitalis* (Gambar 2) dibagi menjadi enam jenis, berdasarkan jenisnya terdapat tipe A sampai F. Glikosida dari tipe A, seperti

lanatosida A, adalah yang paling melimpah, sedangkan senyawa tipe C, seperti lanatosida C dan digoksin, adalah yang sering digunakan secara klinis sebagai obat.



Gambar 1. Struktur kimia dari digoksin



Gambar 2. Struktur kimia Cardenolides

Inti dari senyawa steroid glikosida tipe C berbeda dari glikosida A hanya pada posisi C-12 β yaitu terdapat gugus hidroksil (OH) pada glikosida tipe C (Tabel 1). Lanatoside C dan digoksin turunannya secara industri diperoleh dari daun *Digitalis lanata* dan lanatosida A merupakan hasil produk samping (Padua *et al.*, 2005).

Tabel 1. Senyawa Cardenolides

Cardenolides	Tipe	R ²	R ¹
Lanatosida A	A	Glc- β 1-4- α -Ac-Dox- β 1-4-Dox- β 1-4-Dox- β 1	H
Digitosin	A	Dox- β 1-4-Dox- β 1-4-Dox- β 1	H
Lanatosida C	C	Glc- β 1-4- α -Ac-Dox- β 1-4-Dox- β 1-4-Dox- β 1	OH
Digoksin	C	Dox- β 1-4-Dox- β 1-4-Dox- β 1	OH

Glc, glukosa; Dox, digitoxose; α -AcDox, α -acetyldigitoxose

Digoksin memiliki rumus empiris C₄₁H₆₄O₁₄ dengan massa molekul 780,938 g/mol. Beberapa penelitian telah dilakukan untuk analisis digoksin menggunakan alat HPLC (*High Performance Liquid Chromatography*) dengan menggunakan detektor UV (Jedlicka *et al.*, 2003; Todorovic *et al.*, 2009).

Digoksin digunakan sebagai obat untuk manajemen kegagalan jantung. Fungsi utamanya adalah untuk menjaga stabilitas klinis dan kapasitas latihan pada pasien dengan gagal jantung simtomatik. Untuk pasien dengan sinus, biasanya digoksin digunakan sebagai *second-line drug* setelah diuretik.

Dosis yang dianjurkan untuk penggunaan digoksin tidak boleh melebihi 0,25 mg/hari dan akan lebih rendah pada wanita dan orang tua (Terrence & MacDonald, 2003).

Parameter yang digunakan merujuk pada beberapa sumber. Konsentrasi fasa gerak antara asetonitril-air yang digunakan adalah sebesar 28:72 (%) (Jedlicka *et al.*, 2003), sedangkan penelitian yang dilakukan oleh Kelly *et al.* (1995) fasa gerak yang digunakan adalah asetonitril-air 23:77 (%). Kondisi yang digunakan adalah kondisi isokratik dengan laju alir 1,1 mL/menit (Jedlicka *et al.*, 2003; Todorovic *et al.*, 2009). Panjang gelombang yang digunakan berasal dari berbagai sumber sebagai perbandingan, panjang gelombang yang digunakan dari detektor HPLC-UV sebesar 218 nm (Jedlicka *et al.*, 2003), pada penelitian Todorovic *et al.* (2009) digoksin terdeteksi pada panjang gelombang 220 nm. Waktu analisis yang digunakan juga bervariasi dengan menggunakan HPLC dengan detektor UV yaitu terdapat waktu analisis selama 6 menit (Milenkovic *et al.*, 2010), 8 menit (Jedlicka *et al.*, 2003), 12 menit (Todorovic *et al.*, 2009; Adamowicz *et al.*, 2002), 13 menit (Sauvage & Marquet, 2007) dan 14 menit (Kelly *et al.*, 1995)

BAHAN DAN METODE

Peralatan

UPLC yang digunakan merupakan UPLC H-Class dengan detektor TUV produk Waters. Perangkat lunak yang digunakan adalah Empower dari Waters. Kolom yang digunakan adalah kolom Acquity UPLC BEH C18 100 x 2,1 mm (Waters). Peralatan gelas dan beberapa pipet mikro.

Bahan kimia

Digoksin yang digunakan merupakan obat komersial Fargoxin *Injection* 0,25 mg/mL, berbentuk *ampoule* (cairan). Asetonitril (ACN) dengan HPLC *Gradient Grade* dan Metanol dengan HPLC *Gradient Grade* yang diperoleh dari Merck. Air yang digunakan adalah air Milli-Q yang dihasilkan dari alat pengolahan air Sartorius Stedim.

Metode Penelitian

Pengenceran digoksin

Digoksin (Fargoksin, *Injection* 0,25 mg/mL, *ampoule*) diencerkan dari konsentrasi 250 ppm menjadi konsentrasi 10 ppm, menggunakan metanol 40% hingga volumenya 5 mL, sehingga diperoleh larutan stok dengan konsentrasi 10 ppm.

Analisis UPLC

Digoksin dengan konsentrasi 10 ppm diinjeksikan ke dalam UPLC dengan parameter yang telah diatur, yaitu perbandingan fasa gerak, laju alir, suhu kolom, dan panjang gelombang.

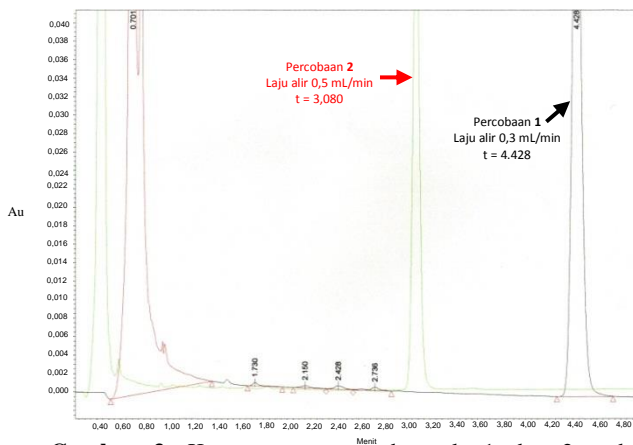
HASIL DAN PEMBAHASAN

Pada penelitian ini telah dilakukan percobaan dengan melakukan sembilan variasi parameter pengukuran seperti yang tercantum pada Tabel 2.

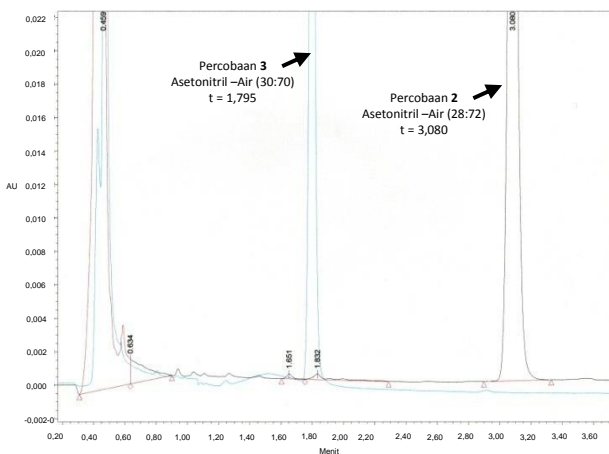
Tabel 2. Variasi parameter dalam metode analisis digoksin

Percobaan ke-	Parameter			
	ACN (%)	Air (%)	Suhu Kolom (°C)	Laju alir (mL/menit)
1	28	72	35	0,3
2	28	72	35	0,5
3	30	70	35	0,5
4	28	72	32	0,5
5	28	72	38	0,5
6	28	72	30	0,5
7	25	75	30	0,5
8	25	75	off	0,5
9	28	72	off	0,5

Pada percobaan ke-1 dan ke-2 dilakukan perbedaan laju alir, yaitu sebesar 0,3 dan 0,5 mL/menit secara berurutan (Gambar 3).



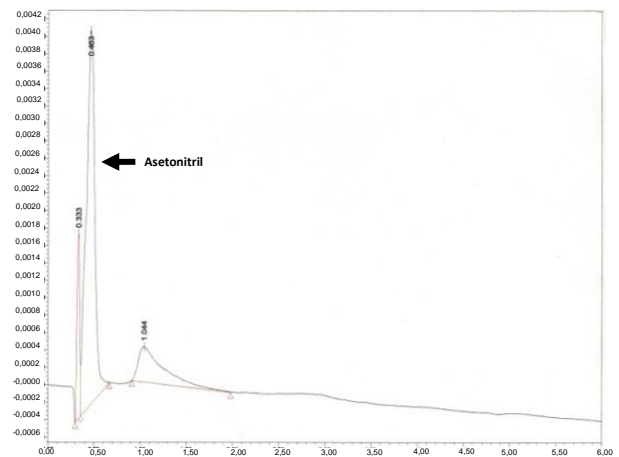
Gambar 3. Kromatogram percobaan ke-1 dan 2 pada kondisi fasa gerak air-asetonitril (28:72%), suhu kolom 35°C dan laju alir yang berbeda.



Gambar 4. Kromatogram percobaan ke-2 dan 3 pada kondisi suhu kolom 35°C, laju alir 0,5 mL/menit, dan fasa gerak yang berbeda.

Dari kedua percobaan tersebut, pada percobaan ke-2 dengan laju alir 0,5 mL/menit diperoleh *baseline* yang lebih baik. Berdasarkan data ini, diambil kesimpulan kondisi optimum untuk laju alir adalah 0,5 mL/menit.

Kemudian selanjutnya dilakukan optimasi untuk perbandingan fasa gerak. Pada percobaan ke-3 (Gambar 4), fasa gerak diubah konsentrasinya dengan perbandingan asetonitril-air sebesar 30:70%. Dengan menggunakan perbandingan asetonitril-air (30:70%), *baseline* terlihat kurang bagus sehingga perbandingan untuk fasa gerak yang digunakan diubah kembali menjadi asetonitril-air (28:72%).



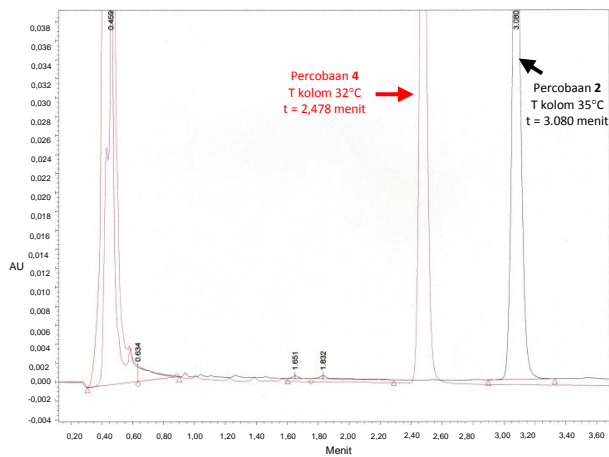
Gambar 5. Kromatogram pelarut asetonitril

Dari kromatogram asetonitril, terdapat puncak pada menit 0,333 dan 0,463 (Gambar 5). Hal ini dikarenakan berasal dari pelarut asetonitril yang digunakan memberikan serapan di awal waktu. Dapat diketahui dari hasil injeksi saat *equilibrate*, saat belum ada sampel yang diinjeksikan.

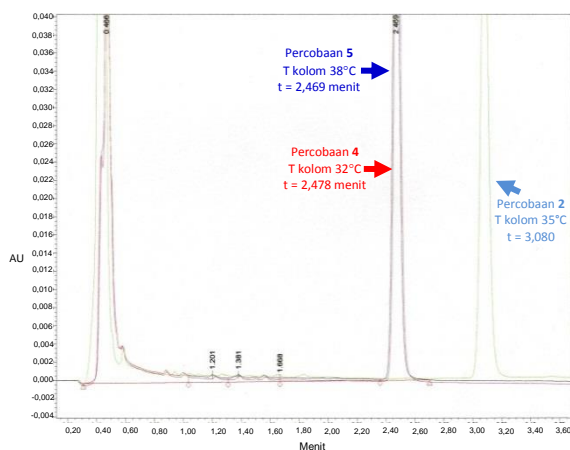
Pada percobaan ke-4 dan 5 dengan kondisi fasa gerak dan laju alir yang sama dengan percobaan ke-2, dilakukan perubahan suhu kolom untuk mendapatkan suhu optimal. Suhu diubah menjadi 32°C untuk percobaan ke-4 (Gambar 6) dan 38°C untuk percobaan ke-5 (Gambar 7). *Baseline* yang terbentuk pada percobaan ke-4 kurang bagus sehingga dilakukan optimasi pada rentang suhu yang lain.

Berikut ini perbandingan antara percobaan ke-2, ke-4, dan ke-5 (Gambar 7), dengan kondisi fasa gerak air-asetonitril (28:72%), laju alir 0,5 mL/menit dan perbedaan suhu kolom menggunakan pengaturan suhu kolom 32, 35 dan 38°C secara berurutan.

Dari data percobaan ke-4 dan ke-5, suhu kolom membuat puncak terlalu maju sehingga dikhawatirkan puncak yang merupakan serapan dari digoksin dapat terpengaruh dengan puncak gangguan yang berasal dari fasa gerak dan matriks pelarut.



Gambar 6. Kromatogram percobaan ke-2 dan 4 pada kondisi fasa gerak air-asetonitril (28:72%), laju alir 0,5 mL/menit, dan suhu kolom yang berbeda.

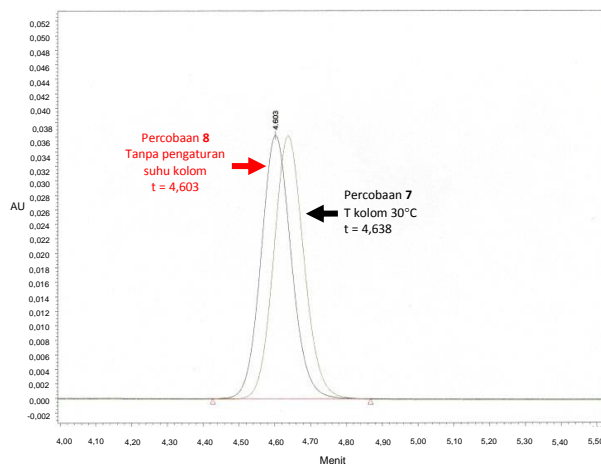


Gambar 7. Kromatogram percobaan ke-2, 4, dan 5 pada kondisi fasa gerak air-asetonitril (28:72%), laju alir 0,5 mL/menit, dan suhu kolom yang berbeda.

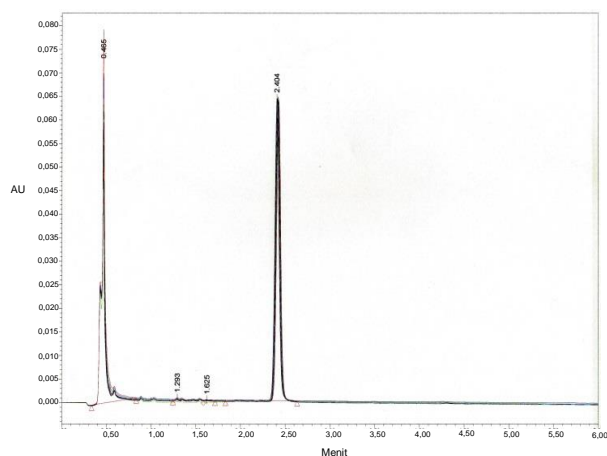
Kemudian selanjutnya dilihat kromatogram dari hasil perbandingan fasa gerak pada konsentrasi asetonitril-air sebesar 25:75% dengan membandingkan perubahan yang menggunakan suhu 30°C dan yang tanpa menggunakan pengaturan suhu pada kolom pada percobaan berikutnya (Gambar 8).

Pada percobaan ke-7 dan ke-8, menggunakan perbedaan pengaturan suhu kolom, yaitu: 30°C untuk percobaan ke-7 dan tanpa pengaturan suhu kolom untuk percobaan ke 8, sedangkan perbandingan asetonitril-air sebesar 25:75% dan laju alir sebesar 0,5 mL/menit tetap sama.

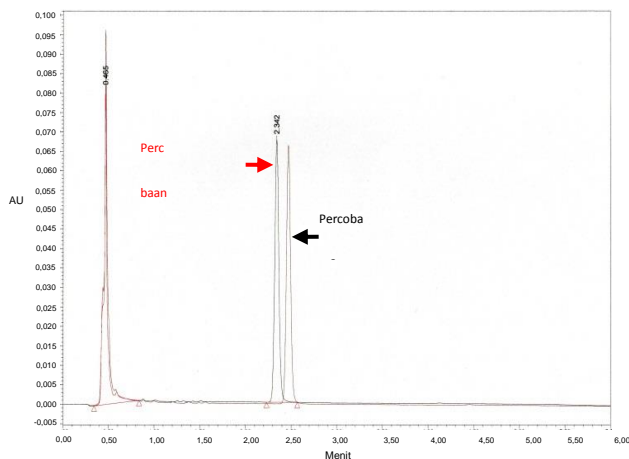
Dari data tersebut, untuk *baseline* lebih rata pada injeksi tanpa pengaturan suhu, tetapi pengaruh konsentrasi fasa gerak, asetonitril-air 25:75%, intensitas puncak menurun sehingga dilakukan percobaan lagi dengan menggunakan perbandingan reagen asetonitril-air 28:72% tanpa pengaturan suhu kolom sesuai dengan kromatogram pada Gambar 9.



Gambar 8. Kromatogram percobaan ke-7 dan 8 pada kondisi fasa gerak air-asetonitril (25:75%), laju alir 0,5 mL/menit, dan suhu kolom yang berbeda.



Gambar 9. Kromatogram percobaan ke-6 dan 9 pada kondisi fasa gerak air-asetonitril (28:72%), laju alir 0,5 mL/menit, dan suhu kolom yang berbeda



Gambar 10. Kromatogram pada kondisi fasa gerak air-asetonitril (28:72%), laju alir 0,5 mL/menit, dan tanpa pengaturan suhu kolom yang tumpang tindih setelah 10 kali injeksi.

Pada percobaan ke-6 dan ke-9, menggunakan perbedaan pengaturan suhu kolom, yaitu: 30°C untuk percobaan ke-6 dan tanpa pengaturan suhu kolom untuk percobaan ke 9, sedangkan perbandingan asetonitril-air sebesar 28:72% dan laju alir sebesar 0,5 mL/menit tetap sama. Setelah mendapatkan kondisi optimum, hari berikutnya diinjeksi kembali sesuai dengan kondisi yang diperoleh, yaitu: fase gerak terdiri atas asetonitril-air, 28:72%; laju alir 0,5 mL/menit; tanpa pengaturan suhu kolom; dan panjang gelombang pada absorbansi maksimum ditentukan pada 218 nm.

Hasil yang optimum ini selanjutnya dilakukan pengulangan sebanyak sepuluh kali. Untuk pengulangan sepuluh kali diperoleh hasil kromatogram yang tumpang tindih menandakan bahwa analisis digoksin stabil pada kondisi tersebut (Gambar 10).

KESIMPULAN

Berdasarkan data yang diperoleh dari hasil percobaan yang telah dilakukan untuk optimasi analisis digoksin dengan menggunakan UPLC (*Ultra Performance Liquid Chromatography*), diperoleh kondisi optimum untuk analisis digoksin dengan menggunakan UPLC (*Ultra Performance Liquid Chromatography*), yaitu: fase gerak terdiri atas asetonitril-air, 28:72% (v/v); laju alir 0,5 mL/menit; suhu kolom *off*; dan panjang gelombang pada absorbansi maksimum 218 nm.

Dalam penelitian ini juga membuktikan bahwa dengan menggunakan UPLC, waktu analisis lebih cepat (kurang dari 3 menit) dan jumlah pelarut lebih sedikit (0,5 mL/menit) dibandingkan dengan penelitian yang menggunakan HPLC (waktu 6-14 menit dan pelarut mencapai 1,1 mL/menit).

UCAPAN TERIMA KASIH

Peneliti mengucapkan terima kasih kepada Universitas Padjadjaran yang telah memberikan dukungan dana penelitian.

DAFTAR PUSTAKA

- Adamowicz, P., Chudzikiewicz, E., & Kala, M. (2002). Digoxin in a forensic laboratory-An analysis of cases. *Z Zagadnien Nauk Sqdowych*, **XLIX**, 114-127.
- Ikeda, Y., Fujii, Y., & Yamazaki, M. (1992). Determination of lanatoside C and digoxin in *Digitalis lanata* by HPLC and its application to analysis of the fermented leaf powder. *Journal of Natural Products*, **55**(6), 748-752.
- Jedlicka, A., Grafnetterova, T., & Miller, V. (2003). HPLC method with UV detection for evaluation of digoxin tablet dissolution in acidic medium after solid-phase extraction. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, **33**, 109-115.
- Kelly, K.L., Kimball, B.A., & Johnston, J.J. (1995). Quantitation of digitoxin, digoxin, and their

metabolites by high-performance liquid chromatography using pulsed amperometric detection. *Journal of Chromatography A*, **711**, 289-295.

- Lelievre, L.G. & Lechat, P. (2007). Mechanisms, manifestations, and management of digoxin toxicity. *Heart Metab*, **35**, 9-11.
- Milenkovic, M.Z., Marinkovic, V.D., Sibinovic, P.S., Palic, R.M., & Milenovic, D.M. (2010). An HPLC method for the determination of digoxin in dissolution samples. *J. Serb. Chem. Soc.* **75**(11), 1583-1594.
- Padua, R.M., Oliveira, A.B., Filho, J.D.S., Vieira, G.J., Takahashi, J.A., & Braga, F.C. (2005). Biotransformation of digitoxigenin by *Fusarium Ciliatum*. *J. Braz. Chem. Soc.*, **16**(3B), 614-619.
- Sauvage, F.L. & Marquet, P. (2007). Determination of digoxin in serum by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. Thermo Scientific, Application note: **384**.
- Terrence, J.C. & Mac Donald, P.S. (2003). *Digoxin in heart failure and cardiac arrhythmias*. St. Vincent's Hospital, Darlinghurst, NSW. **179**, 98-102.
- Todorovic, Z.B., Lazic, L.M., Veljkovic, V.B., & Milenovic, D.M. (2009). Validation of an HPLC-UV method for determination of digoxin residues on the surface of manufacturing equipment. *J. Serb. Chem. Soc.* **74**(10), 1143-1153.