

Validasi Metode Penetapan Kadar Lisinopril dalam *Spiked* Plasma Secara *Ultra Performance Liquid Chromatography* Melalui Derivatisasi dengan 1-Fluoro 2,4 Dinitrobenzen

Ririn Sumiyani^{1*}, Sudibyo Martono², Sugiyanto³

ABSTRACT: A rapid, accurate, and sensitive method for determining lisinopril in spiked plasma was developed by means using an Ultra Performance Liquid Chromatography (UPLC) with 1-fluoro 2,4 dinitrobenzen (FDNB) derivatization. Lisinopril was precolumn derivatized with FDNB at optimum condition, i.e. room temperature and borate buffer at pH 11, subsequently analyzed with UPLC. Isocratic condition of acetate buffer (0.01 M, pH 3.50) : acetonitrile : metanol = 70 : 10 : 20 (v/v/v) as mobile phase, 0.3 mL/min of flow rate at λ 296 nm were applied at Acquity BEH C₁₈ column, resulting a linearity of lisinopril at range of concentration of 5,0-100 ng/mL ($Y = 410,59x + 211,91$, $r = 0,93$). The accuracy of the established method was achieved by 88,59±6,01 to 101,70± 2,56% recovery, while the precision was shown with RSD value of 2,57- 8,16 %, limit of detection (LOD) instrument of 0,73 ng/mL and limit of quantification (LOQ) 2,44 ng/mL, with $R^2 = 0,9987$ dan $r = 0,9993$. In addition, the resulted LOD and LOQ more or less similar with the published HPLC-MS-MS method (1.03-10.0 ng/mL). Hence, it could be concluded that the developed UPLC method can be used as an alternative method for determining lisinopril in plasma.

Keywords: Lisinopril, FDNB, derivatization, UPLC

ABSTRAK: Penetapan kadar lisinopril dalam *spiked* plasma secara *Ultra Performance Liquid Chromatography* (UPLC) melalui derivatisasi dengan 1-fluoro 2,4 dinitrobenzen (FDNB) merupakan metode yang cepat, sensitif dan akurat. Derivatisasi *precolumn* lisinopril dan FDNB optimum pada suhu kamar, suasana dapar borat pH 11,0, dilanjutkan analisis secara UPLC isokratis menggunakan kolom Acquity BEH C₁₈ dan fase gerak dapar asetat (0,01 M pH 3,50): asetonitril: metanol (70: 10: 20, v/v/v), laju alir 0,3 mL/menit pada λ 296 nm, menghasilkan linieritas kadar lisinopril dalam *spiked* plasma pada rentang 5,0 -100 ng/mL terhadap luas area lisinopril-DNB dengan persamaan $Y = 410,59x + 211,91$ dengan $R^2 = 0,9987$ dan $r = 0,9993$. Akurasi metode ditunjukkan dengan nilai % rekovery sebesar 88,59±6,01 smpai dengan 101,70± 2,56 %. Ketelitian ditunjukkan dengan nilai RSD 2,57- 8,16 %, sedangkan Batas Deteksi Instrumen = 0,73 ng/mL dan Batas Kuantitasi = 2,44 ng/mL. Hasil Batas Deteksi penelitian ini relatif sama dengan Batas Deteksi penetapan kadar lisinopril secara HPLC-MS (1,03-10,0 ng/mL). Dengan demikian dapat disimpulkan bahwa metode ini berpotensi dikembangkan sebagai metode alternatif pengganti HPLC-MS untuk penetapan lisinopril dalam plasma.

Kata kunci: Lisinopril, FDNB, derivatisasi, UPLC

- ¹ Laboratory of Pharmaceutical Chemistry, Faculty of Pharmacy, Surabaya University, Surabaya, Indonesia
- ² Laboratory of Pharmaceutical Chemistry, Faculty of Pharmacy, Gadjah Mada University, Yogyakarta, Indonesia
- ³ Laboratory of Pharmacology and Toxicology, Faculty of Pharmacy, Gadjah Mada University, Yogyakarta, Indonesia

Korespondensi :

Ririn Sumiyani
email:
ririn_sum@yahoo.com
ririn_sum@staff.ubaya.ac.id

PENDAHULUAN

Lisinopril (LN) dengan nama kimia (2S)-1-[(2S)-6-amino-2-[[[(1S)-1-carboxy-3-phenylpropyl] amino] hexanoyl] pyrrole -2-carboxylic acid, adalah dipeptida sintetik (lisil-prolin) yang merupakan pilihan utama untuk pengobatan hipertensi, juga untuk gagal jantung dan setelah infark miokard (1, 2). Lisinopril adalah inhibitor enzim pengubah angiotensin atau *ACE Inhibitor* yang merupakan senyawa aktif yang analog dengan lisin enalaprilat. Secara *in vitro* lisinopril lebih aktif dibanding enalaprilat. Lisinopril diabsorpsi secara lambat, bervariasi dan tidak sempurna (sekitar 30%) setelah pemberian oral (2). Obat anti hipertensi golongan inhibitor enzim pengubah angiotensin atau *ACE Inhibitor* adalah salah satu dari 48 jenis obat yang menjadi prioritas Badan Pengawas Obat dan Makanan Republik Indonesia (BPOMRI) untuk dilakukan uji bioekivalensi (3). Prinsip uji bioekivalensi adalah membandingkan proses penyerapan, metabolisme dan ekskresi obat yang diuji dengan obat inovatornya. Oleh karena itu diperlukan penetapan kadar obat dalam darah (plasma) dari waktu ke waktu, sehingga suatu metode penetapan kadar obat dalam darah yang valid mutlak diperlukan.

Uji bioekivalensi lisinopril memakai HPLC-Tandem Spektra-Massa telah dilakukan oleh Zhou *et al.* (4) dan Qin *et al.* (5, 6). Pengukuran HPLC-Tandem Spektra-Massa (HPLC-MS-MS) memberikan hasil yang sensitif dan akurat, tetapi biayanya sangat mahal, oleh karena itu perlu dikembangkan metode lain yang lebih murah.

Lisinopril di daerah UV-Vis mempunyai serapan rendah karena minim gugus kromofor, oleh karena itu analisis dengan spektrofotometer biasanya dilakukan melalui derivatisasi dengan cara direaksikan dengan senyawa penderivat untuk membentuk suatu senyawa yang berfluoresensi atau ditambah gugus kromofor sehingga sensitivitasnya meningkat (1, 7).

Analisis lisinopril secara spektrofotometri menggunakan 1-Fluoro 2,4 Dinitrobenzen (FDNB) telah dilakukan oleh Paraskevas *et al.* (1). Dalam metode ini digunakan larutan lisinopril dalam akuades, yang selanjutnya direaksikan dengan FDNB dalam asetonitril pada pH 8,2 (dapar borat), lalu dipanaskan pada suhu 60°C selama 45 menit. Derivat lisinopril diukur pada panjang gelombang (λ) 356,5 dan 405,5 nm.

Kurva kalibrasi menunjukkan linear ($r > 0,996$ pada kedua λ tersebut). Batas kuantitasi adalah $3,49 \times 10^{-5}$ M dan $5,69 \times 10^{-5}$ M untuk λ 356,5 dan 405,5 nm. Akurasi dan presisi metode memenuhi persyaratan dengan nilai *recovery* 99,2-100,4% pada 405,5 nm dan 97,9-104,3% pada 356,5 nm, sedangkan nilai *Relative Standard Deviation* (RSD) 0,48-0,92% pada λ 405,5 nm dan 0,35-0,51% pada 356,5 nm.

Selain Paraskevas *et al.* (1), derivatisasi lisinopril dengan FDNB juga dilaporkan oleh Abdel-Razak *et al.* (8). Dalam penelitian tersebut digunakan Lisinopril 0,25% (w/v) dalam metanol. Reaksi diamati dengan spektrofotometer pada λ 400 nm, pH 10, suhu 80°C dengan waktu reaksi 30 menit. Kelemahan metode ini adalah produk derivatisasi hanya stabil dalam waktu kurang dari 30 menit. Telah diketahui bahwa kelarutan lisinopril dalam metanol lebih besar dibandingkan kelarutan lisinopril dalam air (1, 8), sehingga reaksi dalam pelarut metanol lebih cepat dibandingkan dalam air. Oleh karena itu dalam penelitian ini, reaksi derivatisasi lisinopril dan FDNB dilakukan dengan cara melarutkan lisinopril dalam metanol.

Analisis lisinopril dalam *spiked* plasma melalui derivatisasi dengan FDNB secara *Ultra Performance Liquid Chromatography* (UPLC) hingga saat ini belum pernah dilaporkan, sehingga metode UPLC ini dipilih untuk memvalidasi metode penetapan kadar lisinopril dalam *spiked* plasma melalui derivatisasi dengan FDNB. Analisis secara UPLC dilakukan dengan menggunakan kolom Acquity UPLC® BEH C₁₈ 1,7 μ m (2,1 mm x 50 mm) (Waters). Selektifitas, linieritas, batas deteksi, batas kuantitasi, akurasi dan presisi merupakan parameter-parameter yang divalidasi di dalam penelitian ini. Metode analisis yang telah tervalidasi pada penelitian ini, dapat digunakan sebagai metode alternatif untuk uji bioekivalensi. Metode ini lebih murah dibandingkan metode-metode yang ada yang telah digunakan selama ini, yaitu HPLC tandem spektra-massa.

METODE PENELITIAN

Bahan

Lisinopril baku pembanding derajat pro analisis (Sigma), serta Na₂B₄O₇·2H₂O, NaOH dan KCl derajat pro analisis (E. Merck), Akuabides

(PT. Ikapharmindo Putramas), asam asetat pekat (HAc), metanol (MeOH), dan asetonitril (ACN) derajat pro HPLC diperoleh dari Merck, dan 1-fluoro-2,4-dinitrobenzen (FDNB) derajat derivatisasi untuk *Gas Chromatography*.

Alat

Spektrofotometer (Shimadzu), pH meter, seperangkat alat UPLC Acquity Waters dilengkapi detektor UV-Vis dengan kolom Acquity BEH C₁₈ (5µm) *pre-packed* kolom 50 mm x 2,6 mm: 1,7 µm dilengkapi dengan kolom *guard* (Waters). Selain itu digunakan juga sentrifus Biofuge, *Ultrasonic Bath* (Branson 1200), mikropipet ukuran 20-200 µL, 200-1000 µL (Socorex Acura 821) dan ukuran 0,5-5,0 mL (*Brand Transferpette*) serta alat-alat gelas yang lazim digunakan di laboratorium analisis.

Optimasi reaksi derivatisasi

1. Pembuatan larutan standar: Lisinopril 1 mg/mL dibuat menggunakan pelarut metanol, sedangkan larutan FDNB 1 mg/mL dibuat dengan pelarut asetonitril. Pembuatan pereaksi ini harus dilakukan dan ditangani secara hati-hati, karena dapat mengiritasi kulit. Dapar borat 0,125 M yang mengandung KCl 0,125 M dibuat dengan menimbang H₃BO₃ dan KCl yang sesuai dan dibuat pada pH yang diinginkan (dibuat pH 8; 8,5; 9,0; 9,5; 10,0; 10,5 ; 11,0 dan 11,5) dengan menambahkan NaOH 1,0 M sejumlah tertentu secara hati-hati hingga pH yang diinginkan tercapai. pH larutan yang diperoleh diukur menggunakan pH meter.
2. Derivatisasi lisinopril dan penentuan panjang gelombang maksimum: Larutan lisinopril dipipet sebanyak 100,0 µL, lalu ditambahkan 500,0 µL dapar borat, 300,0 µL FDNB dan 2,1 mL asetonitril. Campuran larutan dihomogenkan, lalu ditambah 100 µL HCl 0,1 N dan ditambah asetonitril sampai 5,0 mL. Larutan yang dihasilkan diukur dengan spektrofotometer pada rentang panjang gelombang 200–600 nm. Optimasi pH, suhu reaksi, dan waktu reaksi derivatisasi dilakukan dengan cara tersebut di atas. Untuk optimasi *mol ratio* FDNB/lisinopril dan waktu kestabilan produk derivatisasi dilakukan menggunakan UPLC. Analisis secara spektrofotometri dilakukan pada kondisi optimum reaksi. Setelah didapatkan λ

maksimum lisinopril-DNB, λ maksimum yang diperoleh digunakan pada analisis UPLC.

Optimasi parameter UPLC pada penetapan kadar lisinopril melalui derivatisasi dengan FDNB

1. Pembuatan fase gerak dengan komposisi hasil optimasi: Fase gerak terdiri dari dapar asetat pH 3,5 pada kadar 0,01 M : ACN : MeOH pada perbandingan 70:20:10, 70:15:15 dan 70:10:20 (v/v/v) pada laju alir 0,3 mL/menit dilakukan optimasi, selanjutnya dilakukan optimasi pH (3,5; 4,5 dan 5,5) pada fase gerak optimum. Setelah itu dilakukan optimasi laju alir (0,2 ; 0,3 dan 0,4 mL/menit) pada komposisi fase gerak dan pH optimum. Selain itu dilakukan optimasi *mol ratio* FDNB / lisinopril dan waktu derivatisasi dilanjutkan uji kesesuaian sistem.
2. Preparasi sampel untuk uji akurasi dan presisi: Plasma yang digunakan diperoleh dari Palang Merah Indonesia (PMI), disimpan pada temperatur -20°C sampai siap dianalisis. Sampel plasma 250,0 µL dicampur dengan 250,0 µL lisinopril yang *dispiked* (kadar akhir lisinopril 5–100,0 ng/mL), divortex 10 detik, dideproteinasi dengan asetonitril 750 µL dengan vortex 20 detik dan disentrifus 5000 rpm 10 menit. Supernatan diambil 250,0 µL, ditambahkan dapar borat 200,0 µL dan FDNB sejumlah tertentu sesuai dengan jumlah *mol ratio* terpilih dan dilakukan derivatisasi sebagaimana yang telah dijelaskan. Hasil derivatisasi disaring dengan penyaring *milipore* 0,2 µm dan diukur dengan UPLC pada λ maksimum lisinopril-DNB. Dari data yang diperoleh dibuat kurva linier kadar lisinopril terhadap luas area (mV) lisinopril-DNB.
3. Uji kesesuaian sistem: Uji kesesuaian sistem dilakukan untuk memastikan keefektifan sistem operasional pada hasil optimasi yang dilakukan. Uji dilakukan dengan cara membuat larutan lisinopril kadar kecil (25 ng/mL) dan besar (45 ng/mL) masing-masing 6 replikasi, lalu dilakukan derivatisasi, dan kemudian hasil diinjeksikan pada UPLC.

Validasi metode analisis

Validasi metode meliputi selektivitas, linieritas dan Batas Deteksi serta Batas Kuantitasi, ketepatan (*accuracy*) dan ketelitian (*repeatability*).

HASIL DAN PEMBAHASAN

Optimasi pH dan suhu untuk reaksi derivatisasi lisinopril dan FDNB

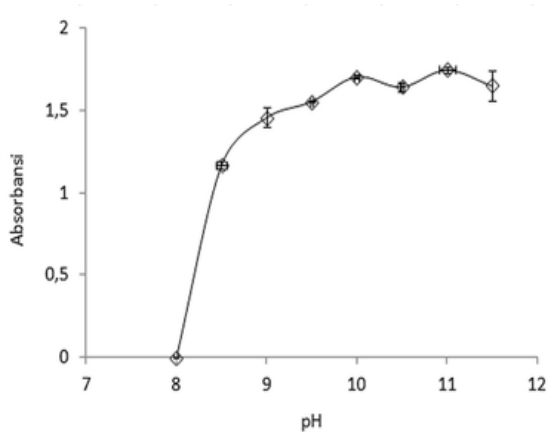
Suhu reaksi dan pH pelarut mempengaruhi reaksi derivatisasi Lisinopril dan FDNB, oleh sebab itu dilakukan optimasi pH pelarut dan suhu reaksi untuk memperoleh hasil derivatisasi yang maksimal. Mol *ratio* dan waktu derivatisasi juga turut dioptimasi.

Reaksi derivatisasi lisinopril optimum terjadi pada pH 11,0 (Gambar 1), sedangkan untuk optimasi suhu dilakukan optimasi pada suhu

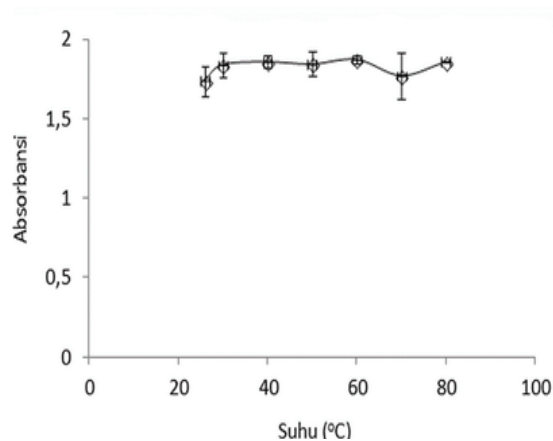
kamar, 30, 40, 50, 60, 70 dan 80°C. Variasi suhu tidak memberikan perbedaan bermakna terhadap hasil reaksi. Oleh karena itu selanjutnya dipilih suhu kamar sebagai suhu reaksi (Gambar 2).

Optimasi kondisi *Ultra Performance Liquid Chromatography* (UPLC)

Optimasi kondisi UPLC dilakukan sebelum dilakukan optimasi *mol ratio* waktu kestabilan produk derivatisasi. Optimasi kondisi UPLC ini meliputi perbandingan fase gerak, pH fase gerak, dan laju alir. Hasil optimasi komposisi fase gerak dapat dilihat pada Tabel 1.



Gambar 1. Kurva hubungan pH (dapar borat) terhadap luas area (mV) lisinopril-DNB



Gambar 2. Kurva hubungan suhu terhadap luas area (mV) lisinopril-DNB.

Tabel 1. Hasil optimasi komposisi fase gerak berbagai perbandingan untuk lisinopril-DNB pada laju alir 0,3 mL/menit pada λ 296 nm ($n = 5$).

Komposisi Fase gerak ^a	t_R^b lisinopril-DNB (menit)	Luas area (mV)	N^c	Tailing factor	Rs^d
70 : 20 : 10	5,887± 0,01	4.372.336±227.136,4	6.502,46± 35,35	1,040±0,002	8,24± 0,03
70 : 15 : 15	5,663± 0,01	4.375.026±239.151,8	6.719,96± 55,80	1,057±0,005	7,47± 0,02
70 : 10 : 20	4,615± 0,01	4.354.518±248.661,1	7.018,09± 81,02	1,033±0,005	5,87± 0,04

^aKomposisi fase gerak larutan dapar asetat (0,01 M, pH 3,5): asetonitrile : metanol dalam v/v/v.

^b t_R = waktu retensi (menit).

^c N = lempeng teoritis.

^d Rs = resolusi

Komposisi fase gerak dapar asetat (0,01 M, pH 3,5):asetonitril: metanol = 70:10:20 (v/v/v) menghasilkan nilai N (jumlah lempeng teoritis) terbesar, yaitu 7.018,09 dibandingkan komposisi fase gerak yang lain, walaupun luas area pada komposisi ini sedikit lebih kecil (< 1%) dari luas area pada komposisi fase gerak 70:15:15 (v/v/v) (Tabel 1). Nilai N tinggi akan menghasilkan puncak yang lebih ramping dan pemisahan yang lebih baik. Sehingga komposisi fase gerak dapar asetat (0,01 M, pH 3,5): asetonitril:metanol = 70:10:20 (v/v/v) dipilih sebagai fase gerak terbaik dan digunakan untuk analisis berikutnya.

Optimasi pH fase gerak dilakukan dengan memvariasikan pH pada nilai pH 3,5; 4,5 dan

5,5. Komposisi fase gerak dapar asetat (0,01 M, pH 3,5) : asetonitril: metanol = 70:10:20 (v/v/v) menghasilkan nilai N (jumlah lempeng teoritis) terbesar yaitu 7.018,09 dibandingkan dengan fase gerak pada pH 4,5 dan pH 5,50 (Tabel 2). Dengan demikian disimpulkan bahwa pH = 3,5 merupakan kondisi pH optimum. Semakin besar nilai N maka akan dihasilkan puncak yang lebih sempit dan pemisahan yang lebih baik.

Optimasi laju alir pada komposisi fase gerak buffer asetat (0,01 M pH 3,5) : asetonitril : metanol = 70:10:20 (v/v/v) adalah langkah optimasi selanjutnya yang dilakukan. Laju alir 0,2; 0,3 dan 0,4 mL/menit adalah nilai laju alir yang dioptimasi untuk kondisi UPLC (Tabel 3). Laju alir 0,2 mL/

Tabel 2. Hasil Optimasi pH 3,5–5,5 pada Komposisi Fase Gerak Bufer Asetat (0,01 M) : Asetonitril : Metanol Perbandingan (70:10:20, v/v/v), Kecepatan Alir 0,3 mL/menit dan λ 296 nm (n = 5).

Komposisi Fase gerak ^α	pH fase gerak	t _R ^β lisinopril-DNB (menit)	Luas area (mV)	N ^γ	Tailing factor	Rs ^φ
70:10:20	3,5	4,595± 0,51	4.545.176,00±248.661,10	7.018,09±81,02	1,045±0,019	6,84± 0,02
	4,5	4,500± 0,02	4.504.522,40±225.829,39	6.450,30±53,17	1,039±0,002	6,75± 0,03
	5,5	4,377± 0,01	4.527.831,80±221.254,52	6.497,33±28,35	1,048±0,002	8,24± 0,03

^αKomposisi fase gerak larutan bufer asetat (0,01 M, pH 3,5) : asetonitril : metanol dalam v/v/v.

^βt_R = waktu retensi (menit).

^γN = lempeng teoritis

^φRs = resolusi.

Tabel 3. Hasil Optimasi Kecepatan Alir (0,2; 0,3 dan 0,4 mL/menit) pada Komposisi Fase Gerak Bufer Asetat (0,01 M, pH 3,5) : Asetonitril : Metanol = 70:10:20 (v/v/v) (n = 5).

Komposisi Fase gerak ^α	Laju Alir (mL/min)	t _R ^β lisinopril-DNB (menit)	Luas area (mV)	N ^γ	Tailing factor	Rs ^φ
70:10:20	0,2	7,126± 0,01	8.569.273,00±54.446,40	5.487,11±28,60	1,059±0,001	6,89±0,02
	0,3	4,601± 0,01	5.673.698,40±15.483,28	5.259,34±33,44	1,0616±0,002	6,49±0,02
	0,4	3,501± 0,03	4.236.580,20±74.481,66	4.402,44±63,10	1,0514±0,017	5,81±0,03

^αKomposisi fase gerak larutan bufer asetat (0,01 M, pH 3,5) : asetonitril : metanol dalam v/v/v.

^βt_R = waktu retensi (menit).

^γN = lempeng teoritis.

^φRs = resolusi.

menit, komposisi fase gerak dapar asetat (0,01 M, pH 3,5) : asetonitril: metanol = 70:10:20 (v/v/v) menghasilkan nilai N (jumlah lempeng teoritis) terbesar yaitu $5.487,11 \pm 28,60$ dibandingkan laju alir 0,3 mL/menit yaitu $5.259,34 \pm 33,44$ (selisih ± 2 %). Namun, pada laju alir ini, waktu retensi lisinopril-DNB 1,5x lebih lama ($t_R = 7,15$ menit) dibandingkan waktu retensi lisinopril-DNB pada laju alir 0,3 mL/menit ($t_R = 4,60$ menit). Sehingga disimpulkan bahwa kondisi optimum analisis Lisinopril-DNB secara UPLC adalah pada komposisi fase gerak isokratik-dapar asetat (0,01 M, pH 3,5) : asetonitril : metanol = 70:10:20 (v/v/v) dengan laju alir 0,3 mL/menit.

Optimasi mol ratio dan waktu derivatisasi

Optimasi mol ratio dilakukan pada rentang mol ratio FDNB/lisinopril 2/1-106/1 (Gambar 3). Reaksi derivatisasi Lisinopril dengan FDNB terjadi pada semua rentang mol ratio yang dipilih (data tidak ditunjukkan), akan tetapi terpilih mol ratio 76/1- 86/1 mengingat kurva tersebut landai. Hal ini terjadi kemungkinan karena struktur lisinopril yang meruah, juga karena adanya sifat amfoter Lisinopril, yang memiliki gugus karboksilat dan gugus amin primer.

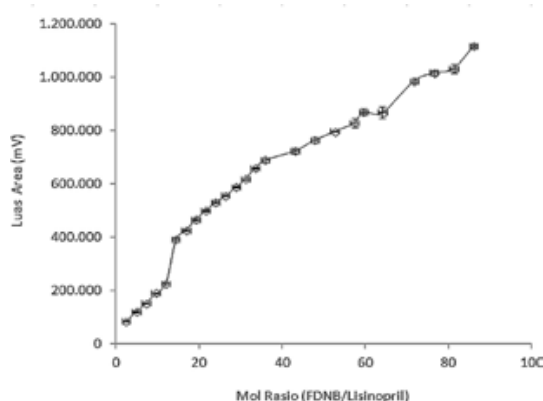
Reaksi derivatisasi lisinopril berjalan sangat lambat karena struktur lisinopril, sebagaimana yang juga dinyatakan oleh para peneliti lain

(9), oleh karena itu waktu kestabilan produk derivatisasi yang optimum harus ditentukan.

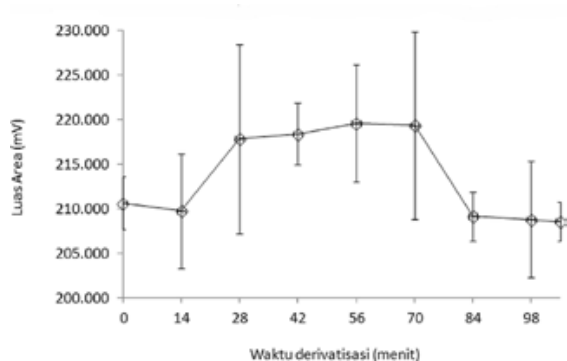
Waktu derivatisasi optimum adalah 56 menit dengan luas area lisinopril-DNB $209.588 \pm 6.568,68$, sedangkan untuk 70 menit luas area = $20.9343 \pm 10.489,37$ (Gambar 4). Walaupun terdapat perbedaan 0,12%, namun dapat diartikan bahwa perbedaan luas area produk derivatisasi 56 menit dan 70 menit tidak bermakna. Dengan demikian disimpulkan bahwa produk derivatisasi dapat dilakukan mulai waktu derivatisasi 56-70 menit.

Selanjutnya dilakukan uji kesesuaian sistem (Tabel 4). Diperoleh nilai *Relative Standard Deviation* (RSD) dari *Retention Time* (t_R) lisinopril-DNB setara lisinopril kadar 30,0 ng/mL $0,578 \leq 1\%$, *Tailing factor* RSD = $1,919 \leq 2$, luas area RSD = $0,919 \leq 1\%$ lempeng teoritis $3776,745 \pm 39,290 >$ dari 2000 dan resolusi $11.593 > 2$. Parameter-parameter ini memenuhi persyaratan yang diterima yaitu RSD keterulangan dari (t_R) $\leq 1\%$ (untuk $n = 5$), faktor *tailing* (T) ≤ 2 , resolusi (Rs) $> 2,0$ dan nilai *theoretical plates* (N) $>$ dari 2000, serta faktor kapasitas $>$ dari 2,0 (10).

Selain lisinopril kadar 30,0 ng/mL, uji kesesuaian sistem juga dilakukan pada kadar 12,0 ng/mL (data tidak ditunjukkan) yang menghasilkan nilai RSD waktu retensi lisinopril-DNB adalah $0,62\% \leq 1\%$, *Tailing factor* RSD = 1.979



Gambar 3. Kurva hubungan mol ratio (FDNB/Lisinopril) dan luas area Lisinopril-DNB



Gambar 4. Waktu kestabilan produk derivatisasi Lisinopril-DNB terhadap luas puncak

Tabel 4. Hasil Uji Kesesuaian Sistem Lisinopril Kadar 30,0 ng/mL pada Kondisi Fase Gerak Buffer Asetat (0,01 M, pH 3,50) : Asetonitril : Metanol = 70:10:20 (v/v/v), Laju alir 0,3 mL/menit (n = 6).

Replikasi	t _R ^β Lisinopril- DNB (menit)	Luas area (mV)	N ^γ	Tailing factor	Rs ^φ
1	5,200	12.252	3.748,11	1,272	11,504
2	5,203	12.532	3.826,85	1,308	10,108
3	5,145	12.475	3.746,04	1,233	11,736
4	5,135	12.328	3.755,80	1,260	13,511
5	5,144	12.263	3.756,12	1,273	11,457
6	5,158	12.357	3.827,55	1,277	11,243
Rata-rata	5,164	12.367,83	3776,75	1,271	11,593
SD (±)	0,030	113,619	39,290	0,024	1,100
RSD (%)	0,578	0,919	1,040	1,919	9,491

^βt_R = waktu retensi (menit).

^γN = lempeng teoritis.

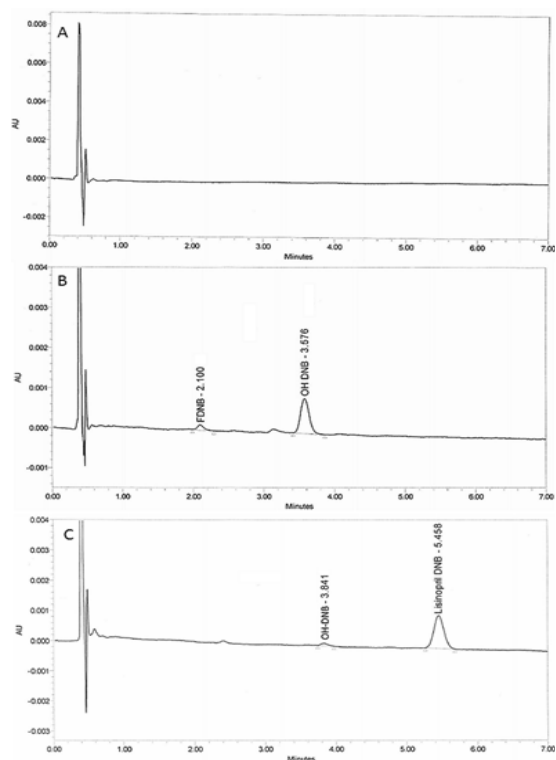
^φRs = resolusi.

≤ 2, luas area RSD = 1,841 ≤ 1%, lempeng teoritis 3.733,737 ± 438,202 > dari 2000 dan resolusi 10,240 > 2. Dari hasil tersebut disimpulkan bahwa metode ini memenuhi uji kesesuaian sistem.

Validasi Metode Analisis

Validasi metode analisis dilakukan dengan parameter uji selektivitas, linieritas, batas deteksi, batas kuantitasi, akurasi dan presisi.

Selektivitas metode *UPLC* untuk penetapan kadar lisinopril dalam *spiked* plasma dapat dilihat pada kromatogram dan dihitung nilai resolusi (Rs) antara OH-DNB dengan produk derivatisasi lisinopril-DNB setara lisinopril 10 ng/mL. Lisinopril-DNB dan OH-DNB dibedakan dengan melihat waktu retensi yaitu waktu retensi OH-DNB 2,359 menit dan lisinopril-DNB 5,458 menit. Selektivitas dibuktikan dengan pemisahan yang bagus antara analit dan komponen lain (seperti matrik, impuritis, produk degradasi dan metabolit) yang ditunjukkan dengan resolusi analit lebih dari 2,5 (11, 12). Dari hasil yang diperoleh dapat disimpulkan bahwa selektivitas pada metode ini memenuhi persyaratan validasi. Kromatogram blanko plasma, FDNB dalam *spiked* plasma dan lisinopril-DNB dalam *spiked* plasma ditampilkan pada Gambar 5.

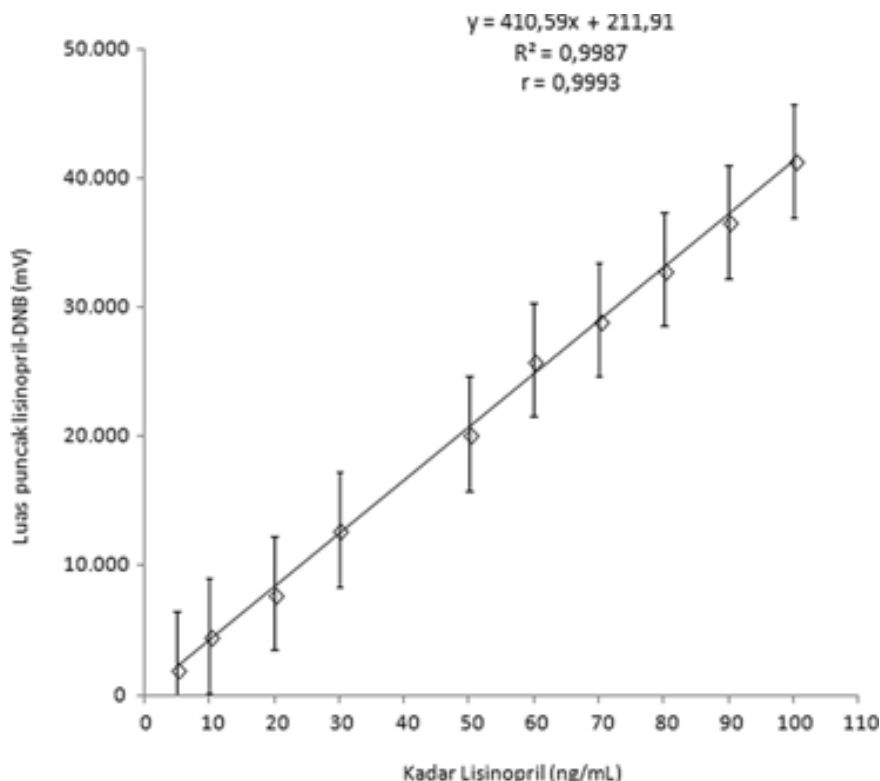


Gambar 5. Kromatogram: (A) blanko plasma, (B) FDNB dalam *spiked* plasma, dan (C) lisinopril-DNB setara lisinopril 30 ng/mL dalam *spiked* plasma. Kondisi analisis: fase diam: kolom Acquity BEH C₁₈ (1,7 μm) *pre-packed* kolom (50 mm x 2,6 mm) dilengkapi dengan kolom *guard* (Waters), fase gerak : kondisi isokratik, Bufer Asetat (0,01 M) : asetonitril : metanol (70:10:20, v/v/v), laju alir 0,3 mL/menit dan detektor UV pada λ 296 nm.

Uji linieritas dilakukan dengan cara membuat kurva baku dalam *spiked* plasma pada kadar 5,0–100 ng/mL dan didapatkan kurva hubungan antara kadar lisinopril dalam *spiked* plasma dan luas area lisinopril-DNB adalah $Y = 410,59x + 211,91$ dan $r = 0,9993$ (Gambar 6). Kriteria evaluasi garis regresi tidak diatur dalam panduan validasi metode analisis yang dipublikasikan oleh European Medicines Agency (2011), tetapi dapat ditemukan dalam panduan bioanalisis yang dipublikasikan oleh UNODC (13), yang menyatakan bahwa nilai $r > 0,99$ seringkali digunakan sebagai kriteria penerimaan linieritas. Dengan demikian dapat disimpulkan bahwa kurva yang dihasilkan linier sehingga dapat digunakan sebagai kurva baku dan perhitungan batas deteksi dan batas kuantitasi dari instrumen.

Nilai % rekovery untuk lisinopril dalam *spiked* plasma pada kadar 20, 50 dan 80 ng/mL didapatkan $98,96 \pm 7,90 - 109,84 \pm 5,96\%$ (Tabel 5). Nilai % rekovery ini telah memenuhi persyaratan validasi. Kadar analit 10–100 ppb nilai % rekovery yang diperbolehkan adalah 80–100%. Dengan demikian akurasi metode yang ditunjukkan dengan nilai % rekovery memenuhi persyaratan validasi.

Uji ketelitian yang dilakukan pada validasi metode *UPLC* ini adalah *repeatability*/keterulangan, yaitu penentuan berulang yang dilakukan pada satu laboratorium dengan satu peralatan tertentu, oleh seorang analis dalam interval waktu yang pendek. Uji ini dilakukan dengan membuat 6 replikasi sampel pada kadar 30,0 ng/mL dan 50,0 ng/mL yang dilakukan secara *spiked* pada plasma (Tabel 6), selanjutnya



Gambar 6. Kurva kadar baku lisinopril terhadap Luas puncak Lisinopri-DNB dalam *spiked* plasma. Kondisi analisis: fase diam: kolom Acquity BEH C_{18} (1,7 μ m) pre-packed kolom (50 mm x 2,6 mm) dilengkapi dengan kolom guard (Waters), fase gerak : kondisi isokratik, Bufer Asetat (0,01 M, pH 3,5); asetonitril : metanol (70:10:20, v/v/v), laju alir 0,3 mL/menit, dan detector UVVIS λ 296 nm.

dilakukan derivatisasi dengan prosedur sama dengan prosedur pada uji selektivitas. Uji presisi memberikan 2.46-7.98%. Untuk kadar analit 100 ppb, ketelitian (presisi) yang diterima jika RSD \leq

15%, sedangkan untuk analit 10 ppb, ketelitian yang diterima jika RSD \leq 25 %. Sehingga, hasil uji ketelitian (Tabel 6) yang dilakukan telah memenuhi nilai RSD yang telah ditentukan, RSD \leq 15%.

Tabel 5. Hasil uji ketepatan metode UPLC penetapan kadar lisinopril kadar 20,0 ; 50,0 dan 80,0 ng/mL dalam spiked plasma pada kondisi fase gerak bufer asetat (0,01 M, pH 3,5) : asetonitril : metanol (70:10:20, v/v/v), laju alir 0,3 menit/mL (n = 6).

Kadar lisinopril (ng/mL)	Luas area terukur (mV)	Kadar lisinopril Terhitung (ng/mL)	% Rekoveri	Rata-rata % Rekoveri	SD (%)	RSD (%)
5	1.933	5,26	105,12	109,84	5,96	5,43
	1.843	5,04	100,77			
	2.123	5,71	114,30			
	2.013	5,45	108,98			
	2.123	5,71	114,30			
	2.149	5,78	115,55			
20	8.456	21,02	105,09	100,20	2,97	2,96
	7.946	19,78	98,92			
	8.212	20,43	102,14			
	7.753	19,32	96,59			
	7.970	19,84	99,21			
	7.974	19,85	99,26			
50	22.545	55,06	110,12	98,96	7,90	7,98
	18.767	45,93	91,86			
	18.990	46,47	92,94			
	21.220	51,86	103,72			
	18.686	45,74	91,47			
	21.202	51,82	103,63			
80	32.686	79,56	99,45	102,27	2,54	2,48
	33.222	80,86	101,07			
	34.495	83,93	104,92			
	34.666	84,35	105,43			
	32.838	79,93	99,91			
	33.800	82,26	102,82			
100	40.605	98,70	98,70	100,50	5,05	5,02
	39.824	96,81	96,81			
	40.478	98,39	98,39			
	40.238	97,81	97,81			
	45.461	110,43	110,43			
	41.489	100,83	100,83			

Hasil validasi metode analisis pada kondisi ini terbukti memenuhi persyaratan selektivitas yaitu resolusi lisinopril-DNB $\geq 2,5$, kurva baku lisinopril dalam *spike* plasma dibuat dari kadar 5,0-100,0 ng/mL didapatkan persamaan regresi $Y = 410,59x$

+ 211,91 dengan $R^2 = 0,9987$ dan $r = 0,9993$, serta batas deteksi (LOD) dari instrumen = 0,73 ng/mL dan batas kuantitasi (LOQ) = 2,44 ng/mL.

Nilai LOQ yang diperoleh memberikan rentang nilai LOQ yang setara dengan yang pernah

Tabel 6. Hasil uji ketelitian metode UPLC penetapan kadar lisinopril kadar 5,0; 20,0; 50,0; 80,0; dan 100,0 ng/mL dalam spiked plasma pada kondisi fase gerak bufer asetat (0,01 M, pH 3,5) : asetoneitril : metanol (70:10:20, v/v/v), laju alir 3 menit/mL (n = 6).

Kadar lisinopril (ng/mL)	Luas puncak terukur (mV)	Kadar lisinopril terhitung (ng/mL)	Rata-rata kadar (ng/mL)	SD	RSD
5	1.933	5,26	5,49	0,30	5,43%
	1.843	5,04			
	2.123	5,71			
	2.013	5,45			
	2.123	5,71			
	2.149	5,78			
20	8.456	21,02	20,04	0,59	2,96%
	7.946	19,78			
	8.212	20,43			
	7.753	19,32			
	7.970	19,84			
	7.974	19,85			
50	22.545	55,06	49,48	3,95	7,98%
	18.767	45,93			
	18.990	46,47			
	21.220	51,86			
	18.686	45,74			
	21.202	51,82			
80	32.686	79,56	81,82	2,03	2,48%
	33.222	80,86			
	34.495	83,93			
	34.666	84,35			
	32.838	79,93			
	33.800	82,26			
100	40.605	98,70	100,50	5,05	5,02%
	39.824	96,81			
	40.478	98,39			
	40.238	97,81			
	45.461	110,43			
	41.489	100,83			

dilaporkan oleh para peneliti lain (4-6) untuk penetapan kadar Lisinopril dalam *spiked* plasma. Rentang nilai LOQ yang dilaporkan tersebut 1,03-10 ng/mL. Dengan demikian dapat disimpulkan bahwa penetapan kadar lisinopril dalam *spiked* plasma melalui metode derivatisasi dengan FDNB secara UPLC mempunyai potensi sebagai metode alternatif penetapan kadar secara HPLC-MS-MS dengan nilai sensitivitas yang relatif sama.

Obat golongan antihipertensi golongan β -adrenergik *Blocking Agents*, *Calcium channel blocker* dan *angiotensin II receptor blocker* banyak dipengaruhi oleh enzim sitokrom P450, sedangkan inhibitor ACE dan obat antihipertensi yang lain tidak terpengaruh. Kebanyakan inhibitor ACE (misalnya, benazepril hidroklorida, cilazapril, enalapril, natrium fosinopril, perindopril, erbumin, quinapril, ramipril, dan trandolapril) adalah *prodrugs* yang dimetabolisme di hati, namun tidak demikian halnya dengan kaptopril dan lisinopril. Dengan demikian, metabolit seharusnya tidak didapatkan pada plasma setelah

pemberian lisinopril, dan analisis lisinopril dalam plasma seharusnya tidak mendeteksi adanya metabolit. Oleh sebab itu, untuk memastikan bahwa penetapan kadar lisinopril dalam *spiked* plasma tidak terganggu oleh metabolit lisinopril ataupun senyawa endogen dari plasma, maka uji plasma dari hewan uji yang telah diberi lisinopril per oral perlu dilakukan.

KESIMPULAN

Reaksi derivatisasi lisinopril dalam pelarut metanol dengan 1-fluoro 2,4 dinitrobenzen (FDNB) optimum terjadi pada suasana dasar borat pH 11,0, suhu kamar dengan waktu derivatisasi 60 menit.

Penetapan kadar lisinopril dalam *spiked* plasma secara *Ultra Performance Liquid Chromatography* (UPLC) melalui derivatisasi dengan FDNB memenuhi persyaratan validasi dan memiliki potensi untuk dikembangkan sebagai metode alternatif pengganti penetapan kadar lisinopril dalam plasma secara HPLC-MS.

DAFTAR PUSTAKA

1. Paraskevas G, Atta-Politou J, Koupparis M. Spectrophotometric determination of lisinopril in tablets using 1-fluoro-2,4-dinitrobenzene reagent. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 2002; 29: 865-872.
2. Brunton LL, Chabner BA, Knollmann BC. *Goodman & Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics* 12th Ed. McGraw-Hill. New York. 2014.
3. Badan Pengawasan Obat dan Makanan Republik Indonesia. *Obat Wajib Uji Bioekuivalensi*. Jakarta. 2011.
4. Zhou N, Liang Y, Chen B, Wang P, Chen X, Liu F. Development and validation of LC-MS method for the determination of lisinopril in human plasma and its application in a bioequivalence study. *Journal of Chromatography Science* 2008; 46: 848-853.
5. Qin W, Zhang Z, Tian Y, Xu F, Wang N, Chen Y. Rapid quantification of lisinopril in human plasma by liquid chromatography/tandem mass spectrometry. *Biomed Chromatogr* 2007; 21(4): 415-421.
6. Qin F, Wang D, Yang S, Jing L, Xiong Z, Li F. Quantitative determination of lisinopril in human plasma by high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry and its application in a pharmacokinetic study. *Biomed Chromatogr* 2012; 26(6): 691-696.
7. Elsebaei F and Zhu Y. Enhanced selectivity approach for fast analysis of enalaprilat, lisinopril and benazepril in pharmaceutical dosage forms and spiked human plasma by ion chromatography. *African J Pharmacy Pharmacol* 2013; 7(35): 2504-2513.
8. Abdel-Razak O, Belal SF, Bedair MM, Barakat NS, Haggag RS. Spectrophotometric and polarographic determination of enalapril and lisinopril using 2,4-dinitrofluorobenzene. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 2003; 31: 701-711.
9. Zaky M, El-Sayedl MY, El-Megharbel SM, Taleb SA, Refat MS. Synthesis, Chemical Structure Elucidation and Biological Studies on the Effect of Some Vital Metal Ions on Lisinopril. *J Mex Chem Soc* 2014; 58(2): 142-151.
10. U.S. Department of Health and Human Services, Food and Drug Administration,

- Center for Drug Evaluation and Research (CDER), Center for Biologics Evaluation and Research (CBER). Analytical Procedures and Methods Validation for Drugs and Biologics. Guidance for Industry. New York. 2015.
11. Bonfilio R, Cazedey ECL, de Araujo MB, Salgado HRN. Analytical Validation of Quantitative High-Performance Liquid Chromatographic Methods in Pharmaceutical Analysis: A Practical Approach. *Critical Rev in Anal Chem* 2012; 42(1): 87-100.
 12. e Silva HR, dos Santos FK, da Luz GM, Chorilli M, Gremião MPD. Validation of high-performance liquid chromatographic method for analysis of fluconazole in microemulsions and liquid crystals. *Braz J Pharm Sci* 2014; 50(2): 381-389.
 13. UNODC. Guidance for the Validation of Analytical Methodology and Calibration of Equipment used for testing of Illicit Drugs in Seized Material and Biological Specimens. 2009.