

PENENTUAN ENERGI AKTIVASI AMLODIPIN BESILAT PADA pH 1, 6 dan 10 DENGAN  
METODE KROMATOGRAFI CAIR KINERJA TINGGI

Tri Minarsih

Akademi Analisis Kesehatan Pekalongan

Koresponden : Tri Minarsih Akademi Analisis Kesehatan Pekalongan

Email : [Triminarsih@gmail.com](mailto:Triminarsih@gmail.com)

Abstrak

Dalam ICH Tripartite Guideline Q1A (R2), uji stabilitas merupakan bagian yang penting pada proses pengembangan produk obat. Masih jarang dilakukan penelitian terhadap uji stabilitas golongan kalsium channel bloker terutama amlodipin besilat. Pada penelitian ini dilakukan penentuan energi aktivasi pada pH 1, 6 dan 10. Energi aktivasi bisa menggambarkan ketergantungan stabilitas obat terhadap suhu dan pH. Amlodipine besilat dibuat pH 1, 6 dan 10, disimpan pada suhu 40, 60 dan 80°C selama 3, 8 dan 24 jam. Metode penetapan yang digunakan adalah Kromatografi Cair Kinerja Tinggi (KCKT) fase terbalik. Fase diam yang digunakan kolom VP-ODS C-18, ukuran 150 x 4,6 mm, dengan diameter dalam 5 µm, fase gerak acetonitril : Kalium dihidrogen fosfat 50 mM 50:50, pH 3. Laju alir yang digunakan 1,0 mL/min, detector Uv-vis pada panjang gelombang 239 nm.

Reaksi degradasi amlodipin besilat termasuk reaksi orde satu semu. Nilai energi aktivasi amlodipin besilat pada pH 1 sebesar 9433 kal/mol, pada pH 6 sebesar 7359 kal/mol dan pada pH 10 sebesar 5266 kal/mol. Nilai energi aktivasi dipengaruhi oleh pH dan suhu; bahwa pada suasana yang semakin asam, diperoleh energi aktivasi yang semakin besar, dan dengan meningkatnya suhu menyebabkan nilai tetapan laju degradasi amlodipin besilat meningkat.

Kata Kunci: Amlodipin besilat, KCKT, Energi aktivasi, pH, suhu

Pendahuluan

Uji stabilitas dapat digunakan untuk melihat bagaimana kualitas bahan baku obat atau variasi produk obat selama jangka waktu tertentu dengan adanya faktor lingkungan yang

berbeda-beda misalkan suhu, kelembaban atau cahaya, serta dapat digunakan sebagai rekomendasi untuk kondisi penyimpanan, periode test ulang dan *shelf life*. Dua aspek yang memegang peranan penting dalam

menetapkan *shelf-life* adalah bahan obat aktif serta produk degradasi yang umumnya terbentuk selama penelitian stabilitas (Anonim, 2003).

Agar konstanta laju reaksi atau kecepatan penguraian berguna pada formulasi sediaan farmasi, perlu dinilai ketergantungan reaksinya pada suhu. Energi aktivasi menyatakan jumlah energi yang harus diterima oleh molekul-molekul yang bereaksi untuk dapat beraksi. Makin tinggi panas aktivasi, makin besar ketergantungan stabilitas terhadap suhu (Lachman L dkk., 1994). Energi aktivasi beberapa senyawa obat menunjukkan ketergantungan terhadap pH (Kenneth dkk., 1992)

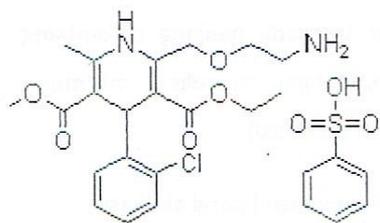
Suhu merupakan salah satu faktor penting dalam penentuan stabilitas senyawa obat. Hal ini memungkinkan peramalan stabilitas produk pada suhu penyimpanan biasa dari data yang diperoleh pada kondisi yang melebihi keadaan normal (Lachman L dkk., 1994). Energi aktivasi menyatakan jumlah energi yang harus diterima oleh molekul-molekul yang bereaksi untuk dapat beraksi. Makin tinggi panas aktivasi, makin besar ketergantungan stabilitas sediaan

terhadap suhu (Lachman L dkk., 1994). Energi aktivasi beberapa senyawa obat menunjukkan ketergantungan terhadap pH (Kenneth dkk., 1992)

Uji stabilitas juga harus menguji kelemahan obat terhadap proses hidrolisis pada rentang pH yang luas ketika berada dalam bentuk larutan atau suspensi (Anonim, 2003). Laju reaksi di dalam larutan air seringkali secara nyata ditandai dengan ketergantungan pada pH larutan, kebanyakan hal ini terjadi akibat proses katalisis. Pemahaman atas ketergantungan pH – laju reaksi ini dapat memberikan pengertian yang dalam pada mekanisme terjadinya proses katalisis dan juga memberikan informasi mengenai stabilitas obat yang sifatnya praktis (Voight, 1995).

Aktivitas farmakologi suatu obat tergantung dari 2 faktor yaitu kerapatan struktur kimia dan stereokimianya. Perubahan pada farmakofornya bisa menyebabkan perubahan secara farmakologi ataupun toksisitasnya. Untuk alasan tersebut, maka studi stabilitas obat penting dilakukan, karena dapat menggambarkan efikasi dan toksisitas (Alvarez-Lueje dkk., 2008).

Amlodipin adalah generasi ketiga dari *Calcium Channel blocker* (kelas dihidropiridin) yang efeknya panjang serta efektif digunakan pada pengobatan hipertensi dan angina pectoris (Anonim, 2008). Beberapa keuntungan penggunaan amlodipin besilat dibandingkan dengan obat lain dalam golongannya adalah penggunaannya yang sehari cukup sekali, efek samping yang relatif kecil serta sedikitnya interaksi dengan obat lain (Marcia, 2003). Adanya gugus 1,4 dihidropirin dan substitusi cincin lipofilik pada posisi 4, rantai alkil pendek pada posisi 2 dan 6, gugus ester dengan rantai panjang alkoksi pada posisi 3 dan 5 tersebut, maka kita dapat memprediksikan bahwa golongan *Calcium Channel blocker* merupakan senyawa yang tidak stabil (Alvarez-Lueje dkk., 2008).



Gambar 1. Struktur Amlodipin besilat

Untuk melakukan uji stabilitas pada sampel produk obat dibutuhkan suatu metode yang stabil, seperti

direkomendasikan oleh panduan *International Conference on Harmonisation (ICH)* (Anonim, 2003).

KCKT merupakan metode analisis yang paling efektif pada banyak analisis baik pada degradasi senyawa obat murni ataupun interaksi antara obat dan zat tambahan. Metode KCKT merupakan metode yang stabil dan spesifik untuk senyawa dengan bobot molekul kecil. KCKT fase terbalik digunakan lebih dari 85% untuk menetapkan uji stabilitas suatu obat (Ahuja & Dong, 2005). Di dalam *European Pharmacopeia*, untuk penetapan kadar amlodipin besilat digunakan metode KCKT fase terbalik (Anonim, 2005).

Metode-metode analisis yang pernah digunakan untuk penetapan amlodipin besilat antara lain: spektrofotometri, KCKT fase terbalik dengan detektor fluoresensi, KCKT tandem spektrofotometri massa dan Kromatografi Lapis Tipis Kinerja Tinggi (Bharat dkk., 2007).

Masih jarang dilakukan penelitian terhadap uji stabilitas golongan *Calcium Channel blocker* terutama amlodipin besilat. Uji

stabilitas yang telah dilakukan terhadap amlodipin besilat antara lain adalah: uji degradasi diperkuat menggunakan pengaruh panas, cahaya, asam kuat, basa kuat dan pengaruh oksidasi (Chitangle dkk., 2008 dan Shah dkk., 2008), uji stabilitas pada berbagai kombinasi bahan tambahan pada sediaan padat (Abdoh dkk., 2004), uji stabilitas pada 2 sediaan cair (Nahata dkk., 1999), uji stabilitas kimia beserta uji farmakokinetik (Pollen dkk., 1991), uji stabilitas kombinasi dengan atenolon dalam tablet multi komponen tipe *monolayer* dan *bilayer* (Sajian dkk., 2008).

#### Metode Penelitian

a. Bahan yang digunakan antara lain: Baku pembanding amlodipin besilat dari PT Kalbe Farma Indonesia, asetonitril, metanol pro KCKT, kalium dihidrogen fosfat, asam fosfat pro analisis (E.Merck), natrium hidroksida, membran filter 0,4  $\mu\text{m}$  dari Sibata, aqua bidestilata dari PT Otsuka dan kertas saring

b. Alat yang digunakan antara lain: Seperangkat Kromatografi Cair Kinerja Tinggi buatan Shimadzu tipe LC-10 ADVP yang dilengkapi dengan detektor

UV/VIS SPD-10 AV VP, *degasser* DGU-14 A, *injector* Rheodyne, Kolom analisis C-18 Shimadzu Shim-pack VP-ODS ukuran 150 x 4,6 mm i.d, 3  $\mu\text{m}$ , filtration Unit untuk KCKT, Spektrofotometer UV-Vis Genesis 10, pH meter (Hanna), *ultrasonic bath* (Sibata), Sentrifugator (Sibata), Timbangan analitik Metler Toledo kepekaan 0,1 mg.

c. Cara Kerja:

Terdiri dari :

1. Optimasi dan validasi metode Kromatografi Cair Kinerja Tinggi yang akan digunakan.

Optimasi metode KCKT yang digunakan beserta validasi metode tersebut, yang meliputi, presisi, akurasi, linearitas, selektivitas, LOD dan LOQ. Detektor yang digunakan pada metode Kromatografi Cair Kinerja Tinggi adalah detektor uv pada panjang gelombang 239 nm, dengan laju alir 1 mL/menit (dari hasil optimasi).

2. Penentuan Energi aktivasi

Amlodipin Besilat pada pH 1, 6 dan 10

Ditimbang 100 mg amlodipin besilat dilarutkan dengan metanol sampai 50,0 mL. Larutan tersebut dipipet 10,0 mL, ditambahkan larutan

bufer pH 1, 6 dan 10 dan ditepatkan hingga volume 100,0 mL (diperoleh larutan dengan konsentrasi 200 µg/mL). Larutan tersebut disimpan selama 0, 3, 6 dan 24 jam pada suhu kamar, 40°C, 60°C dan 80°C. Setelah batas penyimpanan pada masing-masing suhu, larutan tersebut dimasukkan dalam air es untuk menghentikan reaksinya, diambil sejumlah tertentu, diencerkan dengan fase gerak hingga konsentrasi 100 µg/mL dan diinjeksikan pada sistem KCKT. Kemudian berdasarkan luas area dan tinggi area yang didapat maka dapat ditentukan % amlodipin besilat sisa dari masing-masing pH, waktu penyimpanan dan suhu yang berbeda-beda. Dari data ini nantinya dapat dihitung energi aktivasi amlodipin besilat pada masing-masing pH.

Data aplikasi pada penetapan stabilitas amlodipin besilat terhadap pengaruh suhu terdiri dari tetapan peruraian (k) amlodipin besilat pada masing-masing suhu, kemudian dibuat kurva profil suhu vs log k, serta menghitung energi aktivasi pada masing-masing suhu tersebut.

## Hasil dan Pembahasan

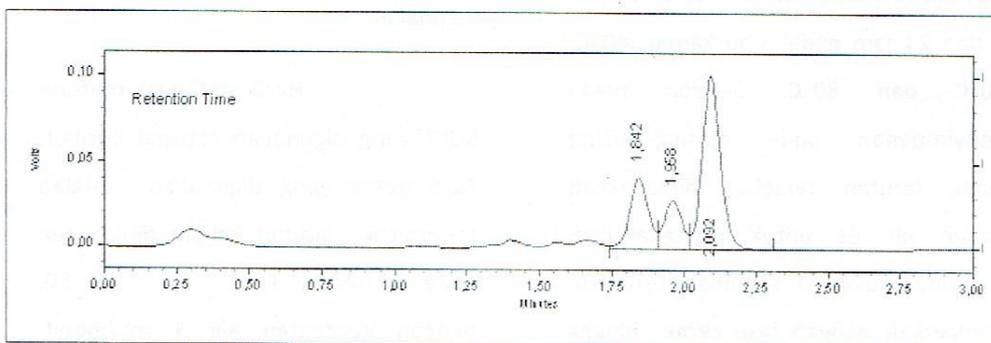
a. Optimasi dan Validasi metode Kromatografi Cair Kinerja Tinggi yang digunakan.

Hasil optimasi metode KCKT yang digunakan sebagai berikut: Fase gerak yang digunakan adalah asetonitril : larutan kalium dihidrogen fosfat 50 mM pH 3 50 : 50, dengan kecepatan alir 1 mL/menit. Detektor yang digunakan adalah detektor Uv dengan panjang gelombang 239 nm.

Hasil validasi metode KCKT yang pertama adalah : Selektivitas metode tersebut. Selektivitas ditentukan melalui perhitungan daya resolusi ( $R_s$ ) (Harmita, 2004).  $R_s$  antara senyawa dan produk degradasi pada pH 1 pemanasan suhu 80°C penyimpanan 24 jam adalah 1,35 dan 1,18 (terdapat 2 produk degradasi) sehingga metode ini tidak mempunyai selektivitas yang bagus, karena pada metode KCKT nilai  $R_s \geq 2$  diharapkan dicapai dalam optimasi dan validasi metode (Snyder dkk., 1997). Nilai  $R_s < 2$  menunjukkan bahwa metode tidak dapat memisahkan senyawa dan produk degradasinya dengan baik, tetapi dalam penelitian ini

produk degradasi hanya dihasilkan pada sampel pH 1, pemanasan pada suhu 80°C penyimpanan 24 jam saja,

sehingga selektivitas yang tidak bagus tidak berpengaruh banyak pada hasil penelitian.



**Gambar 2.** Profil Kromatogram larutan amlodipin besilat dan produk degradasinya pada pH 1 dan suhu 80°C penyimpanan 24 jam pada konsentrasi 100 µg/mL, dalam fase gerak asetonitril : larutan kalium dihidrogen fosfat (50 mM pH 3) 50 : 50

Hasil uji keterulangan berdasarkan luas area RSD = 1,42% dan berdasarkan tinggi puncak RSD = 1,89%, dapat disimpulkan metode mempunyai keterulangan yang baik, karena keterulangan dapat diterima jika RSD dari pengujian  $\leq 2,00\%$  (Ermer & Miller, 2005). Hasil uji linearitas dapat dilihat pada tabel 1.

**Tabel . 1** Hasil uji linearitas metode KCKT berdasarkan luas area dan tinggi puncak untuk pembuatan kurva baku amlodipin besilat konsentrasi (10-150  $\mu\text{g/mL}$ ) dalam fase gerak asetonitril : larutan kalium dihidrogen fosfat (50 mM pH 3) 50 : 50 (n=6)

Konsentrasi amlodipin besilat ( $\mu\text{g/mL}$ )	Luas Area (dibagi 40000)	Tinggi Puncak (dibagi 8000)
10	9,54525	9,4460
50	50,57965	55,4561
80	79,6680	84,6406
100	100,26248	108,1332
130	135,39745	144,7905
150	154,49915	164,8863

Data yang diperoleh selanjutnya diproses dengan metode kuadrat terkecil, untuk selanjutnya dapat ditentukan nilai kemiringan (slope), intersep dan koefisien korelasinya (Gandjar & Rohman, 2007).

Persamaan regresi yang dihasilkan berdasar luas area  $r = 0,9996$ ;  $y = 1,0403x - 1,8396$ , berdasar tinggi puncak  $r = 0,9996$ ;  $y = 1,1128x - 1,8816$ . Hal ini ditunjukkan dengan nilai  $r$  yang dihasilkan, yaitu  $\geq 0,999$  (Ahuja & Dong, 2005).

Berdasarkan luas area dengan menggunakan persamaan regresi  $y = 1.0403x - 1,8396$ , memberikan rata-rata % *recovery* antara 100,07-101,17% sehingga dapat disimpulkan bahwa metode KCKT yang digunakan, berdasarkan luas area masih memiliki ketepatan (*accuracy*) yang baik karena masih berada dalam kisaran 98-102% (Ahuja & Dong, 2005). Hasil % *recovery* berdasarkan tinggi puncak dengan menggunakan persamaan regresi  $y = 1.1128x - 1,8816$ , memiliki rata-rata % *recovery* antara 96,64-104,02 %, dan tidak berada dalam rentang 98-102%

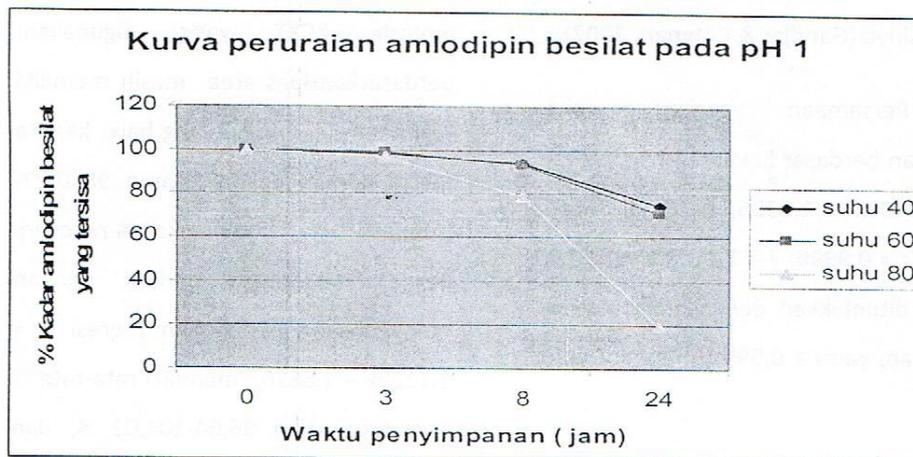
sehingga dapat disimpulkan data berdasarkan tinggi puncak tidak memiliki ketepatan yang baik. LOD adalah 0,1 µg/mL dan LOQ adalah 0,4 µg/mL.

b. Penentuan Energi aktivasi

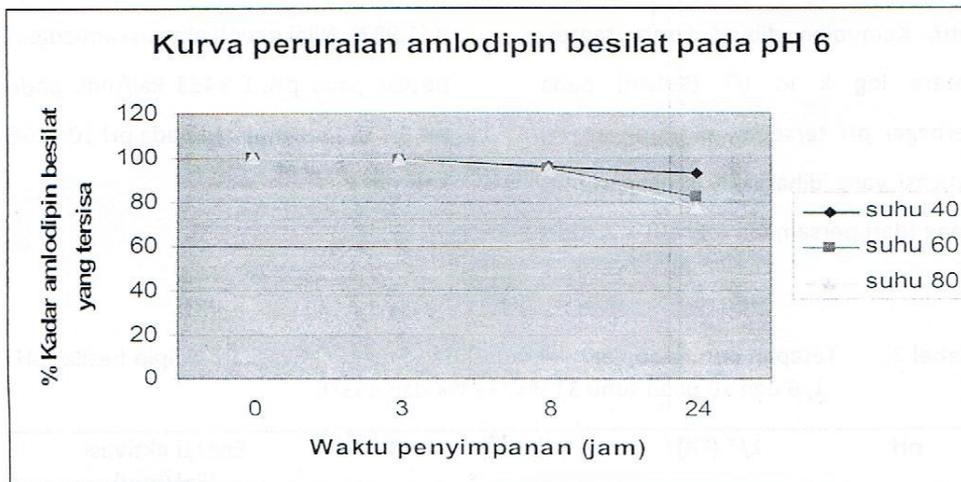
Amlodipin Besilat pada pH 1, 6 dan 10

Penentuan Energi aktivasi amlodipin besilat pada pH 1, 6 dan 10 dilakukan dengan membuat larutan amlodipin besilat pH 1, 6 dan 10 pada suhu 40°C, 60°C dan 80°C, selama 3, 8 dan 24 jam ((Alvarez-Lueje dkk., 2008). Sebelum penyimpanan dan setelah waktu penyimpanan, larutan amlodipin besilat tersebut diinjeksikan ke dalam sistem KCKT. Penetapan stabilitas amlodipin besilat pada pH alkalis, dilakukan pada pH 10, karena pada

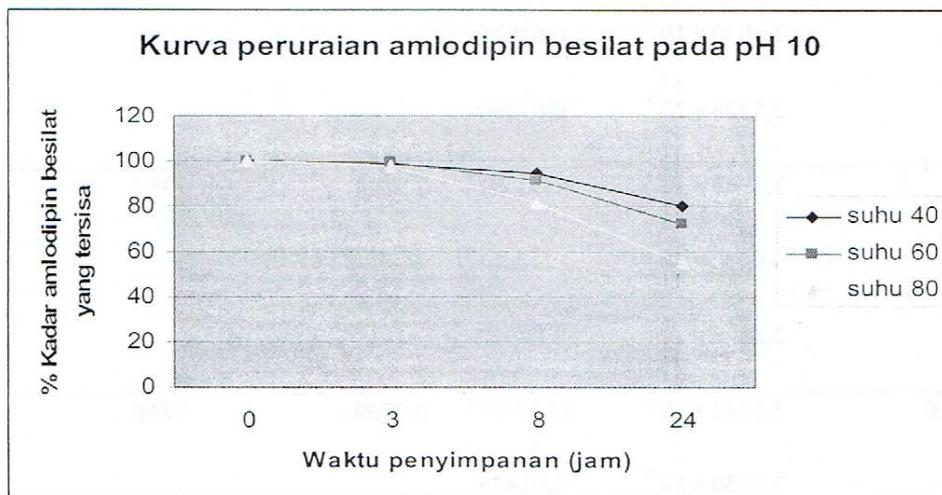
waktu orientasi pada pH 11, amlodipin besilat tanpa pemanasan sudah mengalami penurunan konsentrasi yang sangat besar(> 10%). Data luas area yang diperoleh kemudian dimasukkan dalam persamaan regresi yang telah diperoleh pada uji linearitas sehingga dapat diketahui berapa konsentrasi amlodipin besilat yang tersisa. Data penetapan konsentrasi amlodipin besilat yang tersisa pH 1, 6 dan 10 yang disimpan pada suhu 40°C, 60°C dan 80°C, selama 3, 8 dan 24 jam dapat dilihat gambar 3 – 5. Dari gambar 3 - 5, menunjukkan bahwa amlodipin besilat termasuk senyawa yang tidak stabil (peruraian >20%), seperti senyawa-senyawa ester lainnya (Kenneth dkk., 1992)



Gambar 3. Kurva peruraian amlodipin besilat pada pH 1



Gambar 4. Kurva peruraian amlodipin besilat pada pH 6



Gambar 5. Kurva peruraian amlodipin besilat pada pH 10

Data tersebut kemudian dibuat kurva regresi dari konsentrasi vs lama penyimpanan, dan diperoleh k (tetapan laju degradasi) pada masing-masing suhu dapat dilihat pada tabel 1. Dari

data kurva regresi tersebut ternyata didapat bahwa nilai koefisien korelasi kedua kurva tidak berbeda bermakna, sehingga tidak menunjukkan perbedaan orde reaksi antara orde nol dan orde

satu. Kemudian dibuat kurva regresi antara  $\log k$  vs  $1/T$  (Kelvin) pada berbagai pH tersebut, dihitung energi aktivasi yang dihasilkan dengan rumus *slope* (dari persamaan regresi) x 2,303 x

R (1,987). Nilai energi aktivasi amlodipin besilat pada pH 1 9433 kal/mol, pada pH 6 7359 kal/mol dan pada pH 10 5266 kal/mol

**Tabel 2.** Tetapan peruraian, laju degradasi dan Energi aktivasi amlodipin besilat pH 1, 6 dan 10 pada suhu 313°K, 333°K dan 353°K

pH	1/T (°K)	k (jam <sup>-1</sup> )	R	Energi aktivasi (kal/mol)
1	3,1948 x 10 <sup>-3</sup>	0,01234	0,9103	9433
	3,0030 x 10 <sup>-3</sup>	0,01516		
	2,8328 x 10 <sup>-3</sup>	0,07090		
6	3,1948 x 10 <sup>-3</sup>	2,951.10 <sup>-3</sup>	0,9243	7359
	3,0030 x 10 <sup>-3</sup>	8,318.10 <sup>-3</sup>		
	2,8328 x 10 <sup>-3</sup>	0,02510		
10	3,1948 x 10 <sup>-3</sup>	9,568.10 <sup>-3</sup>	0,9799	5266
	3,0030 x 10 <sup>-3</sup>	0,01416		
	2,8328 x 10 <sup>-3</sup>	0,02510		

Nilai energi aktivasi tersebut dipengaruhi oleh pH, bahwa pada suasana yang semakin asam, maka diperoleh energi aktivasi yang semakin besar. Hasil penelitian juga menunjukkan bahwa suhu

mempengaruhi stabilitas amlodipin besilat pada berbagai suhu percobaan. Peningkatan suhu menyebabkan nilai tetapan laju degradasi amlodipin besilat meningkat atau menyebabkan stabilitas amlodipin besilat menurun. Suhu yang

tinggi dapat mempercepat gerakan molekul obat, sehingga frekwensi tabrakan antar molekul meningkat dan degradasi menjadi lebih cepat terjadi (Lachman dkk., 1994).

### Kesimpulan

Metode KCKT yang digunakan memenuhi parameter validasi yang dipersyaratkan dalam hal linearitas, ketelitian, ketepatan dan sensitivitas. Selektivitas metode tidak memenuhi persyaratan pada waktu memisahkan amlodipin besilat dan produk degradasi pada pH 1, dengan waktu penyimpanan 24 jam pada suhu 80°C (dihasilkan  $R_s < 2$ ).

Pada penentuan Energi aktivasi Amlodipin besilat diperoleh data bahwa suhu mempengaruhi stabilitas amlodipin besilat. Kurva Laju Degradasi ( $\log k$ ) vs Suhu penyimpanan menunjukkan hubungan yang linear ( $r > 0,9$ ). Dengan naiknya suhu penyimpanan, maka nilai tetapan laju degradasi amlodipin besilat semakin besar. Energi aktivasi yang diperoleh dipengaruhi oleh pH, pada pH 1, energi aktivasi yang diperoleh paling besar, dibandingkan pada pH 6 dan 10. Nilai energi aktivasi amlodipin besilat pada

pH 1 sebesar 9433 kal/mol, pada pH 6 yaitu 7359 kal/mol dan pada pH 10 sejumlah 5266 kal/mol.

### Daftar Pustaka

- Abdoh, A., Omari, A.M., Badwan, A.A., and Jaber, A.M.Y., 2004, *Amlodipine besylate-exciipient interaction in solid dosage form*, Abstract, Informa Pharmaceutical Science, Jordan.
- Ahuja, S. and Dong, M.W., 2005, *Handbook of Pharmaceutical Analysis by HPLC, Vol 6, Separation Science and Technology* 1<sup>st</sup> edition, p 197-203, 338, Elsevier Academic Press, San Diego.
- Alvarez, L., Sturm, J.A., and Nunez, V., *Hydrolytic degradation of nitrendipine and nisoldipine*, diakses tanggal 20 September 2008 Bioelectrochemistry Laboratory, Chemical and Pharmaceutical Sciences Faculty, p 887-895, University of Chile, Chile.
- Anonim, 2003, *QIA Stability Testing of New Drug Substances and Products*, in : ICH Harmonized Tripartite Guideline Q1A (R2), Geneva.
- Anonim 2005, *European Pharmacopoeia*, V edition, p 981-983, Council of Europe, Cedex, France.

- Bharat, G.C., Natvarlal M.P., and Paresh B.S., 2007, *Stability Indicating RP-HPLC Method for Simultaneous Determination of Atorvastatin and Amlodipine besylate from Their Combination Drug Product*, *Chem. Pharm. Bull.*, **55** (2), 241-246.
- Chitlange, S.S., Bagri, K., and Sakarka, DM., 2008, *Stability Indicating RP-HPLC Method for Simultaneous Estimation of Atorvastatin and Amlodipine besylate in Capsule Formulation*, *Asian. J. Res. Chem.*, **1** (1), 15-18
- Ermer, J. and Miller, H.M., 2005, *Method Validation in Pharmaceutical Analysis. A Guide To Best Practice*, 1<sup>st</sup> edition, p 21-107, WILEY-VCH Verlag GmbH & Co.KGaA, Weinheim.
- Gandjar, I.G. dan Rohman, A., 2007, *Kimia Farmasi Analisis*, p 459-472, Pustaka Pelajar, Yogyakarta.
- Harmita, 2004, *Petunjuk Pelaksanaan Validasi Metode dan Cara perhitungannya*, *Majalah Ilmu Kefarmasian*, **1** (3), 117-134, Departemen Farmasi FMIPA, Universitas Indonesia, Jakarta.
- Kenneth, A.C., Gordon, L.A., and Valentino, J.S., 1992, *Stabilitas Kimiawi Sediaan Farmasi*, edisi pertama, hal 9-41 diterjemahkan oleh Didik Gunawan, IKIP Semarang Press, Semarang.
- Lachman, L., Lieberman, A.H., dan Kanig, J.L., 1994, *Teori dan praktek Farmasi Industri*, edisi ketiga, hal 1524-1525 diterjemahkan oleh Siti Suyatmi, UI Press, Jakarta.
- Marcia, L.B., 2003, *Amlodipine besylate use in Pediatric Hypertension*, *Pediatric Pharmacotherapy*, **9** (7), Virginia.
- Nahata, M.C., Morosco, R.S., and Hipple, T.F., 1999, *stability of amlodipin besilat in two liquid dosage forms*, abstract plus, *J. Am. Pharm. Assoc.*, **39** (3), Washington.
- Pollen, K.F.Y., Susan, J.M., and Timothy, P., 1991, *Liquid chromatography assay for amlodipin besilat: chemical stability and pharmacokinetics in rabbits*, abstract, *J. Pharm. Biomed. Anal.*, **9** (7), p 565-571 Elsevier inc.
- Shah, D.A., Bhatt, K.K., Mehta, R.S., Baldania, S.L., and Gandhi, T.R., 2008, *Stability Indicating RP-HPLC Estimation of Atorvastatin Calcium and Amlodipine Besylate in Pharmaceutical Formulations*, *Ind. J. Pharm. Sci.*, p 754-759.
- Sajian, A. and Skalko, N., 2008, *Stability of amlodipine besylate and*

atenolol in multi-component tablets of mono-layer and bi-layer types, *Acta Pharm.*, 58 (2008), p 299-308.

Snyder, L.R., Kirkland, J.J., and Glajch, J.L., 1997, *Practical HPLC Method Development*, 2<sup>nd</sup>

Edition ,p 687-695, John Wiley and Son Inc., New York.

Voigt. R., 1995 , *Buku Pelajaran Teknologi Farmasi*, edisi kelima, 611-621, diterjemahkan oleh Soendani Noerono, Gajah Mada University Press, Yogyakarta.