

PENENTUAN SULFADIAZIN DENGAN KROMATOGRAFI CAIR KINERJA TINGGI (HPLC)

Ariestiana Permata Adji dan
Unang Patriana

*Balai Pengujian Mutu dan Sertifikasi Obat Hewan
Gunungsindur, Bogor 16340*

PENDAHULUAN

Obat golongan Sulfonamida pada umumnya dapat ditentukan dengan beberapa metoda. Penggunaan metoda titrasi nitrimetri dan spektrofotometri UV-Vis telah banyak dilaporkan. Akhir-akhir ini beberapa pustaka memuat penentuan obat golongan sulfonamida dengan metoda fisika kimia seperti Kromatografi Cair Kinerja Tinggi (HPLC).

Keuntungan metoda HPLC adalah dalam hal keakuratan, sensitifitas, selektifitas dan cepat serta mampu memisahkan senyawa-senyawa yang memiliki sifat fisik dan kimiawi yang berdekatan.

Berdasarkan aplikasinya pada obat hewan, dikembangkan penentuan sulfadiazin dari matrik biologik menggunakan HPLC. Dalam proses penentuannya, dilakukan proses ekstraksi serta pemisahan dengan bahan lainnya yang mengganggu proses pemeriksaan. Pada percobaan ini dilakukan analisa sulfadiazin dalam daging yang ditambahkan dalam jumlah tertentu, dengan metoda HPLC, yang mampu mendeteksi sampai 2,5 ng.

MATERI DAN METODA

Pereaksi

Semua pereaksi yang digunakan adalah derajat pro analisa.

- Pelarut: asetonitril, asam asetat, metanol dan n-hexan (Wako Pure Chemical Industries, Ltd., Japan).
- Alumina.
Alumina Woelm B Akt. 1 (Woelm Pharma GmbH & Co., D-3440 Eschwege, FRG).
- Quartz wool.
- Sulfadiazin.

Larutan standard: 10,0 mg sulfadiazin dilarutkan dalam 100 ml metanol. Pengenceran selanjutnya adalah dalam larutan aseto-

nitril: asam asetat: air (22 : 1 : 78) setelah metanol diuapkan.

- Filter Ekicrodisc 13 CR 0,45 um (Gelman Sciences, Japan).

Alat

- Homogenizer (Bio-Mixer BM-2, Japan).
- Rotary Evaporator (Yamato Scientific Co., Tokyo, Japan).
- Sentrifus.
- Kromatografi kolom:
Quartz wool diletakkan pada dasar kolom gelas berukuran panjang 24 cm dan diameter 10 mm. Masukkan 6 g alumina ke dalam kolom dengan metanol 99,8% dan cuci dengan 50 ml metanol 85% sebelum digunakan.
- Ultrasonic generator — ultrasonic cleaner IUC-281 (San-Ei Seikusho Ltd, Tokyo, Japan).
- Jangka sorong.
- Kromatografi cair.

HPLC Japan Spectroscopic Co (Tokyo, Japan) model trirotar-III, pengukuran pada panjang gelombang 267 nm dan recorder untuk mencatat respon puncak (perhitungan berdasarkan pengukuran tinggi puncak). Kolom analitikal adalah stainless steel, berukuran 25 cm x 4,6 mm dengan fase diam adalah Nucleosil 5C18. Kondisi operasi untuk fase gerak adalah campuran asetonitril-asam asetat-air (22 : 1 : 78); dengan kecepatan aliran fase gerak 0,9 ml/menit; temperatur kolom 40°C dan volume injeksi 10 ul.

Metoda

Dua ml larutan standard sulfadiazin dalam metanol masing-masing 5 dan 50 ppm, dimasukkan dalam labu Erlenmeyer. Setelah diuapkan masukkan 10 g daging. Juga dilakukan blangko, yaitu tanpa penambahan sulfadiazin. Homogenkan dengan pelarut asetonitril sebanyak 50 ml selama 5 menit. Cuci dengan n-hexan yang

telah dijenuhkan dengan asetonitril. Lapisan asetonitril diuapkan pada suhu 40°C, lalu larutan dengan metanol 85%. Sonikasi selama 1–2 menit. Larutan ini kemudian dipindahkan pada kolom kromatografi gelas yang mengandung alumina. Elusi dengan 10 ml larutan metanol 85%, hasil eluat dibuang. Kemudian elusi dengan 25 ml larutan fase gerak asetonitril-asam asetat-air (22 : 1 : 78). Hasil elusi ini diuapkan pada suhu 40–50°C dengan rotary evaporator. Kemudian residu dilarutkan dengan 1 ml larutan fase gerak. Saring dengan Ekicrodisc 13 CR 0,46 μ m. Injeksikan 10 μ l larutan standard 1, 5, 10 dan 20 ppm; dan larutan sampel ke dalam sistem kromatografi. Ukur tinggi peak dari kromatogram yang dihasilkan. Perhitungan konsentrasi zat aktif dalam daging berdasarkan plot pada kurva kalibrasi larutan standard yang diketahui konsentrasinya.

HASIL DAN DISKUSI

Metoda yang digunakan adalah merupakan modifikasi beberapa pustaka (Nagata, 1988; Hori, 1983). Kolom yang dipakai yaitu Nucleosil 5C18 memberikan pemisahan yang baik sulfadiazin dari komponen-komponen lain dari daging. Sulfadiazin memberikan absorpsi maksimum pada panjang gelombang 267 nm, sehingga pengukuran secara kuantitatif dilakukan pada panjang gelombang 267 nm. Sebagai pelarut ekstraksi digunakan asetonitril yang dijenuhkan dengan n-hexan karena sulfadiazin larut dalam pelarut tersebut dan selanjutnya digunakan pula metanol sebagai bahan ekstraksi. Karena ekstrak yang diperoleh masih mengandung berbagai zat-zat pengganggu yang berasal dari jaringan/daging, sehingga perlu dipisahkan antara sulfadiazin dengan material tersebut menggunakan kromatografi kolom. Alumina dipilih sebagai fase padat kolom kromatografi yang paling efektif (Nagata, 1988; Endoh Y, 1987).

Pada Gambar 1 ditunjukkan tipe kromatogram larutan standard sulfadiazin dalam larutan; blangko daging babi dan daging babi yang ditambahkan 10 μ g/g sulfadiazin. Dengan kondisi yang digunakan tampak bahwa sulfadiazin terpisah baik dari larutan dan komponen-komponen pengganggu dari daging.

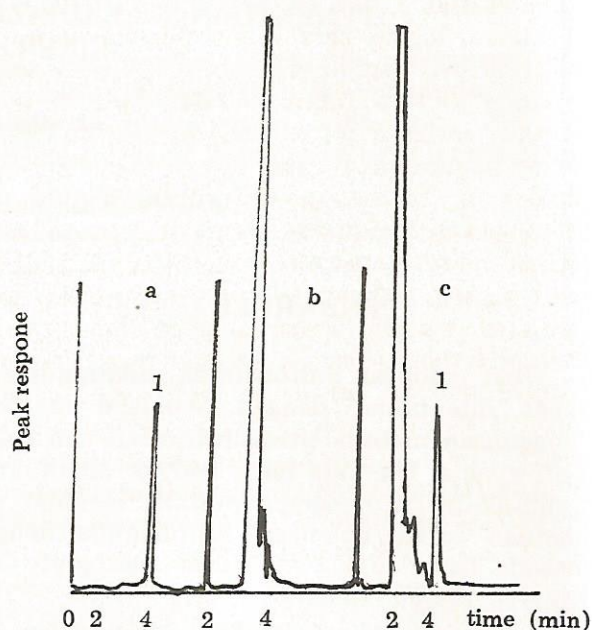


Figure 1. Typical Chromatograms

- a Standard sulfadiazine
- b Blank
- c Swine meat fortified with 10 mcg/g sulfadiazine
- 1 Peak of sulfadiazine

Data pembuatan kurva kalibrasi ditunjukkan pada Tabel 1. Kurva kalibrasi yang dibuat antara 0,01 μ g sampai dengan 0,2 μ g sulfadiazin, plot tinggi puncak kurva sulfadiazin terhadap konsentrasinya memberikan suatu garis lurus, dengan persamaan garis: $Y = 0,7763 X + 0,0819$ dengan koefisien regresi (r) = 0,9999.

Table 1. Peak height of standard sulfadiazine

Concentration (ppm)	Peak height (cm)
1	0.85
	0.83
5	3.99
	4.0
10	7.78
	7.9
20	15.48
	15.73

Telah dilakukan *studi recovery* yaitu dengan penambahan 1 dan 10 ug/g sulfadiazin ke dalam 10 gram daging babi (yang tidak mengandung sulfadiazin). Sampel-sampel ini dianalisa dengan metoda di atas. Limit deteksi yang diperoleh dengan metoda ini adalah 2,5 ng sulfadiazin yang memberikan ratio *signal* terhadap *noise* adalah 2. Metoda analisis untuk residu obat golongan sulfonamida secara umum dalam jaringan hewan telah dilaporkan lebih kurang sensitif sampai dengan 0,1 ppm sedangkan dalam darah dan serum adalah 2 ppm (Meyer, 1977). Sehingga dari informasi tersebut dapat dikatakan bahwa metoda ini dapat digunakan di dalam analisa residu, karena kesensitifannya. Serta pada Tabel 2 ditunjukkan data *recovery* sulfadiazin. Hasil *recovery* ini menunjukkan pula hasil yang memuaskan untuk analisa residu.

Metoda di atas memberikan hasil yang baik dalam analisa sulfadiazin dalam daging, sehingga dapat digunakan pada pengerjaan rutin dan dalam study farmokokinetik obat, seperti penentuan waktu henti obat yang sangat penting artinya bagi konsumen.

Perlu dilakukan penelitian lebih lanjut dengan metoda ini seberapa jauh gangguan dari obat lainnya, terutama obat satu golongan, serta bahan pembantu lainnya. Sehingga mampu menunjukkan keandalan metoda ini.

Table 2. Recovery of Sulfadiazine from fortified swine meat

Added (mcg/g)	Recovery (%)
1	80.0
	81.0
	80.0
10	93.5
	93.0
	93.1

DAFTAR PUSTAKA

- Endoh, Y. et al. 1987. Liquid Chromatographic Determination of Sulfamoyldapsone in Swine Tissues. *J. Assoc. off Anal. Chem.* 70 (60): 1031-1032.
- Hori, Y. 1983. Systematic Analysis of Synthetic Antibacterials in chicken Muscles and Egg by high performance Liquid Chromatography. *J. Food Hyg. Soc. Jpn*, 24: 447-453.
- Meyer, L. J. et al 1977. *Veterinary Pharmacology and Therapeutics*. 4 th ed. Iowa State University Press.
- Nagata and Saeki, M. 1988. Simultaneous Determination of 17 Antibacterials in Chicken Tissues by High Performance Liquid Chromatography. *J. Food Hyg. Soc. Jpn*, 29: 13-20.

DETERMINATION OF SULFADIAZINE BY HIGH PERFORMANCE LIQUID CHROMATOGRAPHY

SUMMARY

A high performance liquid chromatographic method (HPLC) for determination of sulfadiazine in swine meat was developed. Sulfadiazine was extracted from meat by homogenizing with acetonitrile. The homogenate was centrifuged and supernatant was evaporated. The extract was dissolved in 85% methanol and applied to an alumina column. Sulfadiazine was eluted with acetonitrile-acetic acid-water (22 : 1 : 78) and the eluate was applied to an HPLC column packed with Nucleosil 5C18. The average recoveries of sulfadiazine added 1 ppm and 10 ppm to swine meat were 80.5% and 93.2%. The detection limit sulfadiazine by this method was 2.5 ng.