

SPEKTROFOTODENSITOMETRI UNTUK MENENTUKAN ANTIDEPRESAN AMIN TRISIKLIK YANG BEREDAR DI INDONESIA DALAM TABLET DAN DALAM URIN.

Oleh : *Raslim Rasyid, Yeyet C. Sumirtapura, Tisno Suwarno,
INK Widjaja, Anwar**

SARI

Penentuan kadar antidepresan amin trisiklik yang beredar di Indonesia (amitriptilin, nortriptilin, dan imipramin) dengan cara spektrofotodensitometri dilakukan terhadap tablet dan urin. Isolasi dari tablet dilakukan dengan metanol dan dari urin dengan eter. Cara ini sudah dicoba untuk menentukan kadar senyawa amin trisiklik dalam tablet dan urin sukarelawan setelah pemberian senyawa-senyawa ini dalam dosis tunggal.

ABSTRACT

A spectrophotodensitometric method has been carried out for the determination of tricyclic amine antidepressants available in Indonesia (amitriptyline, nortriptyline, and imipramine) in tablets and urine. Isolation was done by methanol from tablets and by ether from urine. The method has been applied for examinations of tricyclic amine compounds in tablets as well as in urine of volunteers receiving a single dose of the compounds.

* Jurusan Farmasi ITB, Indonesia.

1 Pendahuluan

Pada saat ini di Indonesia cukup banyak beredar sediaan obat yang mengandung zat aktif antidepresan turunan amin trisiklik, baik yang berisi zat tunggal maupun dalam kombinasi dengan senyawa psikotropik lain seperti perfenazin, flufenazin, diazepam dan klordiazepoksida.

Berbagai cara penentuan kadar senyawa antidepresan amin trisiklik, baik untuk penentuannya dalam sediaan maupun dalam cairan biologis untuk keperluan pengendalian mutu obat dan pemeriksaan klinis, telah dikembangkan oleh para peneliti terdahulu (1,2). Cara analisis yang sudah dikembangkan tersebut mencakup cara yang sederhana, seperti spektrofotometri, sampai cara yang melibatkan peralatan analisis yang modern seperti kromatografi gas (3,4) dan kromatografi cair penampilan tinggi (5, 6, 7, 8, 9).

Cara analisis yang sudah dikembangkan di suatu laboratorium tidak selalu dapat diterapkan di laboratorium lain karena masalah peralatan dan pereaksi yang tersedia. Oleh karena itu perlu dikembangkan metode analisis yang sesuai dengan kondisi laboratorium yang ada untuk tujuan analisis yang dihadapi. Pada penelitian terdahulu telah dikembangkan metode analisis beberapa senyawa antidepresan trisiklik dengan cara kromatografi lapis tipis (KLT) dan spektrofotometri. Cara ini masih memiliki beberapa kelemahan, khususnya dalam hal penyiapan sampel (ekstraksi) dan batas kepekaan metode analisis. Dalam penelitian ini dikembangkan suatu cara penentuan kadar beberapa senyawa antidepresan turunan amin trisiklik yang pemisahannya menggunakan kromatografi lapis tipis, sedangkan penentuan kuantitatif dilakukan dengan cara spektrofotodensitometri.

Tujuan penelitian ini terutama untuk mendapatkan metode penentuan kadar senyawa tersebut, baik dalam sediaan maupun dalam sampel urin.

2 Bahan dan alat

2.1 Bahan

Senyawa amin trisiklik murni: amitriptilin hidroklorida (Roche), imipramin hidroklorida (Ciba Geigy), dan nortriptilin hidroklorida (Squibb); beberapa sediaan tablet yang mengandung zat aktif tersebut; pelat lapis tipis silika gel 60, E. Merck 20 × 10 cm; metanol dan eter berkualitas pro analisa; pereaksi kimia lain.

2.2 Alat

Bejana kromatografi untuk ukuran pelat 20 × 20 cm; spektrofotodensitometer Shimadzu type CS-910.

3 Percobaan

3.1 Ekstraksi

3.1.1 Untuk tablet

Satu tablet dimasukkan ke dalam vial 10 ml, kemudian ditambahkan air 2 ml. Vial digetarkan dengan *ultrasonic* sampai tablet hancur, tambahkan 8 ml metanol dan isi vial dikocok selama lebih kurang satu menit. Bahan pembawa tablet yang tidak larut dibiarkan mengendap dan supernatan diambil untuk kromatografi.

3.1.2 Untuk urin

Limapuluh ml urin dimasukkan ke dalam corong pisah berkapasitas 125 ml. Urin dibasakan dengan penambahan amoniak pekat (25%) sampai pH 9–10, kemudian diekstraksi dua kali masing-masing dengan 10 ml eter (pengocokan dilakukan dengan tangan kira-kira 10 menit).

Fase eter dikumpulkan dalam gelas piala 50 ml lalu diuapkan di atas penangas air sampai kering. Residu dilarutkan kembali dalam satu mililiter metanol, kemudian dilakukan kromatografi.

3.2 Kromatografi

Terhadap larutan zat murni atau ekstrak, dilakukan kromatografi sebagai berikut: satu mikroliter larutan ditotolkan pada pelat lapis tipis dengan jarak satu sentimeter dari sisi bawah, dibiarkan sampai kering, kemudian dielusai sejauh 7 cm. Pelat dikeringkan pada suhu kamar, kemudian diukur secara spektrofotodensitometri. Fase gerak yang dipakai adalah metanol.

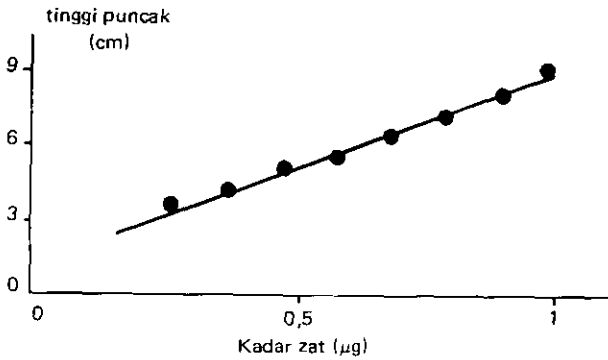
3.3 Spektrofotodensitometri

Noda pada pelat KLT diukur secara spektrofotodensitometri dengan spektrofotodensitometer Shimadzu CS-910. Pengukuran dilakukan dengan metode linier spektrofotometri UV *single wavelength* pada panjang gelombang 240 nm. Kecepatan pengukuran (*scanning*) diatur pada kecepatan 20 mm/menit dan sensitivitas alat (rekorder) diatur pada "X2".

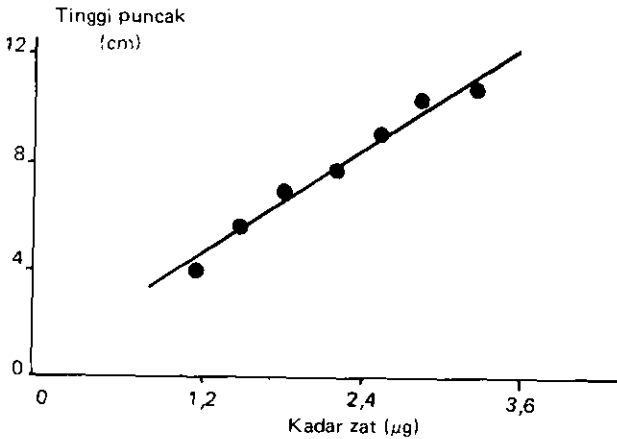
3.4 Perhitungan kadar

Perhitungan kadar senyawa antidepresan amin trisiklik (sebagai senyawa utuh) dalam sampel tablet maupun dalam sampel urin dilakukan dengan memakai kurva kalibrasi. Kurva kalibrasi dibuat dengan cara menotolkan larutan zat murni dalam metanol, dalam konsentrasi yang bervariasi, pada pelat yang kemudian dilakukan kromatografi dan spektrofotodensitometri.

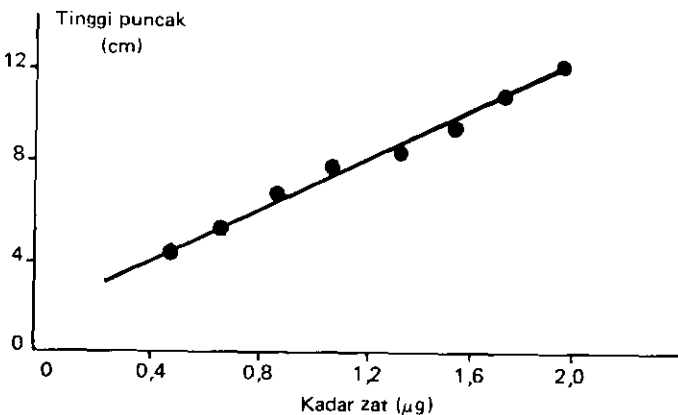
Kurva kalibrasi yang dihasilkan untuk masing-masing senyawa yang dicoba pada percobaan ini dapat dilihat pada gambar 1, 2, dan 3.



Gambar 1 Kurva kalibrasi untuk amitriptifin, dengan persamaan garis regresi: $y = 6,45 x + 1,43$ dan koefisien korelasi = 0,999, dengan x adalah kadar zat (dalam μg) dan y adalah tinggi puncak (dalam cm).



Gambar 2 Kurva kalibrasi untuk imipramin, dengan persamaan garis regresi: $y = 3,71 x + 0,52$ dan koefisien korelasi = 0,996.



Gambar 3 Kurva kalibrasi untuk nortriptilin, dengan persamaan garis regresi: $y = 4,48 x + 1,90$ dan koefisien korelasi = 0,996.

4 Hasil percobaan dan Pembahasan

4.1 Ekstraksi dari urin

Dengan menggunakan eter sebagai pengestraksi, penguapan pelarut relatif lebih cepat dan ekstraksi ketiga senyawa amin trisiklik yang dicoba cukup kuantitatif. Jumlah penemuan kembali (*recovery*) zat dari sampel urin dengan prosedur ekstraksi ini adalah 89% untuk imipramin, 109% untuk nortriptilin, dan 75% untuk amitriptilin, dilakukan secara *in vitro*. Untuk mengembalikan konsentrasi zat dalam ekstrak akhir ke konsentrasi dalam urin, maka angka-angka tersebut harus diperhitungkan karena kurva kalibrasi dibuat dari larutan zat murni yang tidak melalui ekstraksi. Dalam penelitian ini pernah dicoba pelarut kloroform sebagai pelarut untuk ekstraksi; pelarut ini biasa dipakai untuk ekstraksi senyawa-senyawa organik dalam fase air. Penggunaan pelarut kloroform dalam prosedur ekstraksi percobaan ini ternyata sering menimbulkan masalah, yaitu sering terbentuknya emulsi yang sukar memisah pada pengocokan.

4.2 Kromatografi

Pada penelitian terdahulu dipakai pelarut campur untuk fase gerak kromatografi, sedangkan dalam penelitian ini digunakan pelarut tunggal metanol yang ternyata memberikan pemisahan yang cukup baik dan sempurna dari noda senyawa lain yang mungkin mengganggu. Karena penggunaan pelarut tunggal ini, fase gerak bisa dipakai lebih lama (cukup stabil), tidak perlu mencampur pelarut untuk fase gerak dan reproduibilitas kromatografi menjadi lebih baik. Dengan kondisi kromatografi ini harga R_f untuk masing-masing senyawa adalah 0,33 untuk amitriptilin dan imipramin, dan 0,14 untuk nortriptilin.

4.3 Analisis kuantitatif

Penggunaan cara spektrofotodensitometri untuk analisis kuantitatif noda-noda yang dihasilkan dalam kromatografi memberikan beberapa keuntungan dibandingkan dengan metode sebelumnya, antara lain: (a) tidak perlu mengerok noda dari pelat dan mengekstraksi kembali senyawa yang diperiksa, dan (b) dapat mengurangi kesalahan yang mungkin terjadi pada waktu pengerokan noda dan ekstraksi kembali. Dengan demikian cara analisis menjadi lebih praktis dan lebih reproduibel.

4.4 Kepekaan metode analisis

Uji batas kepekaan alat spektrofotodensitometer yang dilakukan terhadap larutan senyawa murni yang dikromatografi menunjukkan bahwa jumlah terkecil yang masih dapat diukur secara kuantitatif pada kondisi pengukuran

seperti telah disebutkan di muka adalah sekitar 100 ng untuk amitriptilin dan nortriptilin dan 300 ng untuk imipramin. Kalau dikembalikan ke cara ekstraksi dan kromatografi, dari metode analisis ini dapat dihitung bahwa konsentrasi senyawa amin trisiklik terkecil dalam urin yang masih dapat diukur dengan metode ini adalah sekitar 2 ug/ml urin untuk amitriptilin dan nortriptilin, dan sekitar 6 ug/ml urin untuk imipramin. Untuk keperluan analisis yang lebih peka lagi, beberapa hal tersebut di bawah ini dapat disesuaikan lagi, yaitu (a) mengurangi volume pelarut (metanol) untuk melarutkan kembali residu hasil ekstraksi, (b) memperbanyak jumlah ekstrak yang ditotolkan pada waktu kromatografi (misalnya sampai 10 μ l), dan atau (c) mengatur kepekaan alat spektrofotodensitometer.

45 Reprodusibilitas

Reprodusibilitas metode analisis ini telah dicoba dengan menentukan kadar senyawa amin trisiklik dalam beberapa sampel urin dengan konsentrasi yang sama. Konsentrasi yang dicoba adalah 20 μ g/ml urin untuk amitriptilin dan nortriptilin, dan 40 μ g/ml urin untuk imipramin. Hasil yang diperoleh dapat dilihat pada tabel 1. Seperti terlihat pada tabel tersebut reprodusibilitas metode analisis ini cukup baik dengan koefisien variasi sebesar 1,2% untuk imipramin dan 2,7% untuk nortriptilin. Sementara itu koefisien variasi untuk amitriptilin relatif lebih besar, yaitu 5,2%.

Tabel 1 Penemuan kembali (*recovery*) amin trisiklik dan reprodusibilitas penentuan kadar dalam urin.

No.	Persen penemuan kembali		
	Imipramin	Nortriptilin	Amitriptilin
1	88,64	108,6	70,07
2	88,64	111,3	76,67
3	88,64	105,8	72,55
4	90,91	113,9	74,19
5	88,64	108,6	70,89
6	88,64	107,2	75,84
7	88,64	112,6	75,02
8	90,91	107,2	82,44
Rata-rata	82,2	109,4	74,7
S. D.	1,05	2,88	3,89
Koef. var.	1,2%	2,7%	5,2%

4.6 Kespesifikan metode

Dengan metode ini amitriptilin dapat ditentukan kadarnya meskipun tercampur dengan salah satu metabolit utamanya (nortriptilin) karena amitriptilin terpisah sempurna pada waktu kromatografi. Selain itu, perfenazin yang merupakan salah satu zat psikotropik yang biasa dikombinasi dengan antidepresan trisiklik, tidak mengganggu penentuan kadar amitriptilin dengan metode analisis ini. Kemungkinan adanya interferensi dari senyawa-senyawa metabolit antidepresan trisiklik yang lain belum dapat dilakukan.

4.7 Penerapan metode

Metode analisis ini telah diterapkan dalam penentuan kadar beberapa senyawa antidepresan amin trisiklik dalam sediaan tablet dan dalam sampel urin setelah pemberian senyawa-senyawa tersebut (dalam bentuk tablet) pada sukarelawan sehat.

4.7.1 Penentuan kadar dari sediaan tablet

Penentuan kadar dari sediaan tablet menunjukkan hasil yang baik (tabel 2). Kadar senyawa antidepresan amin trisiklik dari masing-masing tablet yang diperiksa ada dalam *range* yang diperbolehkan. Khusus pada penentuan tablet yang selain mengandung amitriptilin mengandung juga perfenazin, terlihat bahwa perfenazin tidak mengganggu penentuan kadar amitriptilin dengan metode analisis ini.

Tabel 2 Hasil penentuan kadar dari sediaan tablet

Amitriptilin (25 mg)*			Imipramin (25 mg)			Nortriptilin (10 mg)		
No.	Kadar	Rata-rata	No.	Kadar	Rata-rata	No.	Kadar	Rata-rata
1	24,87 24,87 25,26	25,00	1	26,28 26,46 26,46	26,37	1	8,96 9,10 9,03	9,03
2	23,90 24,48 24,48	24,48	2	26,71 26,46 26,46	26,54	2	9,25 9,13 9,10	9,16
3	26,03 26,03 26,03	26,03	3	26,97 27,23 26,97	27,05	3	9,40 9,40 9,40	9,40
4	24,41 24,08	24,25	4	25,94 25,95	25,94	4	10,95 10,82	10,89

* Mengandung 2 mg perfenazin.

4.7.2 Penentuan kadar dari urin sukarelawan

Dalam penelitian ini obat diberikan dalam dosis tunggal dan urin dikumpulkan selama periode 0–8 jam sesudah pemberian obat. Hasil yang diperoleh dapat dilihat pada tabel 3 yang menunjukkan bahwa senyawa antidepresan amin trisiklik yang dicoba termetabolisis secara ekstensif dalam tubuh. Untuk amitriptilin dan imipramin, dengan metode analisis ini senyawa utuhnya tidak terdeteksi lagi dalam urin, sedangkan untuk nortriptilin masih bisa terdeteksi tetapi dalam jumlah yang relatif kecil, yaitu sekitar 10% dari dosis yang diberikan. Oleh karena itu untuk amitriptilin dan imipramin, penentuan dalam urin pemakai obat sebaiknya diarahkan pada penentuan metabolitnya. Kedua senyawa ini mengalami metabolisme ekstensif di dalam tubuh.

Karena keterbatasan senyawa pembanding yang tersedia dalam penelitian ini, belum ditentukan metabolitnya.

Tabel 3 Hasil penentuan senyawa amin trisiklik utuh dalam urin sukarelawan yang meminum obat dalam dosis tunggal.

Antidepresan	Dosis	Ditemukan kembali
Amitriptilin	25 mg	T. T.
Imipramin	25 mg	T. T.
Nortriptilin	10 mg	1,05 mg

* T. T. = tidak terdeteksi

Pustaka

1. Amundson M. E. & J. A. Manthey, Excretion of Nortriptyline hydrochloride in Man I, *J. Pharm. Sci.*, 1966, 55 (3), 277–280.
2. Pushkar, N. K., Quantitative Determination of Amitriptyline in Blood, *J. Pharm. Sci.*, 1978, 67, (1) 60–62.
3. Howard B. H. & C. S. Susan, G. L. C Method for Quantitative Determination of Amitriptyline in Human Plasma, *J. Pharm. Sci.*, 1974, 63, (2), 296–297.
4. Garland W. A., Quantitative Determination of Amitriptyline and Its Principal Metabolite, Nortriptyline, by G. L. C-Chemical Ionization Mass Spectrometry, *J. Pharm. Sci.*, 1977, 66, (1), 77–81.
5. Burke, D. & H. Sokoloff, Simultaneous High Performance Liquid Chromatographic Determination of Chlordiazepoxide and Amitriptyline hydrochloride in Two Component Tablet Formulations, *J. Pharm. Sci.*, 1980, 69, (2), 138–140

6. Butterfield, A. G. & R. W. Sears, High Performance Liquid Chromatographic Determination of Perphenazine and Amitriptyline Hydrochloride in Two Component Tablet Formulations, *J. Pharm. Sci.*, 1977, 66, (8), 1117–1119.
7. Raymond, F. S. & B. C. Thomas., Simultaneous Determination of Imipramine, Desipramine and their 2-Hydroxy Metabolites in Plasma by Ion-pair Reversed Phase High Performance Liquid Chromatography with Amperometric Detection, *J. Pharm. Sci.*, 1981, 70, (3), 257–261.
8. Frei, R. W. *et al*, Liquid Chromatography of Dansyl Derivatives of some Alkaloids and the Application to the Analysis of Pharmaceuticals, *J. Chromatogr.*, 1976, 116, 365–377.
9. Reece, P. A. & Z. Rudi, Quantification of Imipramine and Desipramine in Plasma by High Performance Liquid Chromatography and Fluorescence Detection, *J. Chromatogr.*, 1979, 163, 310–314.