

Review Artikel
METODE ANALISIS VITAMIN D₃ DALAM SAMPEL SEDIAAN SOLID

Maura S. Islami dan Ida Musfiroh

Program Studi Profesi Apoteker, Fakultas Farmasi Universitas Padjadjaran

maurasyafa@gmail.com

diserahkan 29/4/2020, diterima 23/7/2021

ABSTRAK

Vitamin D merupakan zat larut lemak yang sangat penting bagi hewan dan manusia, yang terdiri atas vitamin D₂ (ergokalsiferol) dan D₃ (kolekalsiferol). Saat ini, banyak industri yang mulai memproduksi suplemen vitamin D untuk memenuhi kebutuhan masyarakat akan asupan vitamin hariannya, sehingga mendorong adanya penelitian-penelitian terkait analisis vitamin D yang akurat, sensitif dan efisien pada sediaan farmasi atau sediaan lainnya untuk keperluan kontrol kualitas. HPLC menjadi salah satu metode yang banyak digunakan untuk analisis vitamin D dengan ultraviolet (UV) dan *diode array detector* (DAD) sebagai detektor. Selain instrumen, metode preparasi sampel seperti ekstraksi merupakan hal yang sangat krusial. Terdapat beberapa metode analisis vitamin D₃ yang dipublikasikan beberapa tahun belakangan ini. Adapun dalam memilih metode mana yang dapat diaplikasikan, beberapa kriteria seperti LOD dan LOQ, ketersediaan alat dan bahan, kecepatan waktu analisis menjadi salah satu pertimbangan.

Kata Kunci: Vitamin D₃, kolekalsiferol, HPLC, UV, DAD, LOD, LOQ, ekstraksi

ABSTRACT

Vitamin D is a fat soluble substance that is very important for animals and humans, that consist of vitamin D₂ (ergocalciferol) and D₃ (cholecalciferol) as the most important forms. Nowadays, many industries have been producing supplements with vitamin D content to meet people's needs for their daily vitamin intake. Therefore, it becomes very important to develop studies related to the analysis of vitamin D that are accurate, sensitive and efficient especially for quality control of pharmaceutical preparations. HPLC is one of the most widely used methods for the analysis of vitamin D, coupled with ultraviolet (UV) and diode array detectors (DAD). In addition to instruments, sample preparation methods such as extraction are very crucial. There are several methods for analyzing vitamin D₃ that have been published in recent years. LOD and LOQ, availability of tools and materials, and speed of analysis time, are some criteria to be considered in choosing the analysis method.

Keywords: Vitamin D₃, cholecalciferol, HPLC, UV, DAD, LOD, LOQ, extraction

PENDAHULUAN

Vitamin D merupakan zat larut lemak yang sangat penting bagi hewan dan manusia. Vitamin D bukanlah senyawa tunggal, melainkan kelompok senyawa yang menunjukkan aktivitas vitamin D, dengan bentuk senyawa yang paling utama adalah vitamin D₂ (ergokalsiferol) dan D₃ (kolekalsiferol) (Al-Qadi, *et al.*, 2010; Deluca, 1979). Vitamin D₃ [1,25(OH)₂D₃] dapat

disintesis oleh kulit dari 7-dehidrokolesterol menjadi previtamin D₃ dengan bantuan radiasi UV (Tripkovic, *et al.*, 2012), atau dapat juga diperoleh dari diet seperti produk susu terfortifikasi dan minyak ikan. Vitamin D merupakan salah satu vitamin yang sangat penting karena memainkan peran vital dalam menjaga kadar normal kalsium dan fosfor dalam darah, berperan penting dalam pertumbuhan tulang, serta memiliki peranan lain

dalam mengontrol aktivitas otot, kardiovaskular, kolon, dan kesehatan sel (Al-Qadi, *et al.*, 2010).

Angka kecukupan gizi (AKG) atau *recommended daily allowance* (RDA) vitamin D yang dianjurkan untuk usia antara 1 hingga 70 tahun termasuk wanita yang sedang hamil atau menyusui adalah 15 µg per hari atau 600 IU per hari yang bisa diperoleh dari asupan makanan dan sintesis yang dilakukan tubuh. Akan tetapi pada beberapa kondisi yang menyebabkan seseorang tidak dapat memenuhi asupan vitamin D hariannya, dapat disarankan untuk mengonsumsi suplemen vitamin D (Handono, *et al.*, 2018; Crown, 2017).

Seiring berkembangnya jaman, banyak industri yang mulai memproduksi suplemen dengan kandungan vitamin D₃ untuk memenuhi kebutuhan masyarakat akan asupan vitamin hariannya. Hal ini mendorong penelitian-penelitian terkait analisis vitamin D yang akurat, sensitif dan efisien pada sediaan farmasi atau sediaan lainnya untuk keperluan kontrol kualitas. Kromatografi merupakan teknik yang digunakan untuk memisahkan senyawa vitamin D dari senyawa pengganggu lainnya. Meskipun *gas chromatography* (GC) dapat digunakan untuk analisis ini sebelumnya, metode *liquid chromatography* (LC) kini lebih banyak digunakan untuk melakukan analisis. Umumnya metode LC menggunakan detektor MS atau UV (Gomes, *et al.*, 2013). Tulisan ini bertujuan untuk membahas secara khusus mengenai metode analisis vitamin D₃ pada sampel solid seperti suplemen atau produk farmaseutikal.

METODE

Metode yang digunakan dalam penulisan ini adalah studi literatur, dengan sumber primer berupa jurnal penelitian yang telah dipublikasi secara *online* di situs jurnal nasional dan

internasional. Literatur yang termasuk ke dalam kriteria inklusi adalah jurnal yang berisi informasi terkait analisis vitamin D₃ pada suplemen makanan maupun produk farmaseutikal berbentuk solid seperti tablet maupun serbuk. Sedangkan kriteria eksklusi adalah jurnal yang terbit sebelum 2010.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Metode Pretreatment Sampel

Preparasi sampel merupakan tahap yang paling pertama dan kritis pada pengembangan metode analisis karena dapat memengaruhi akurasi. Ekstraksi merupakan *pretreatment* yang umum digunakan untuk memisahkan vitamin dari matriksnya dan bersifat krusial. Berikut akan dijelaskan beberapa *pretreatment* sampel pada produk farmasetikal (Gomes, *et al.*, 2013; Zhang, *et al.*, 2018).

A. Presipitasi Protein

Presipitasi protein sering digunakan untuk pemisahan protein dari cairan biologis. Prinsipnya adalah mengendapkan protein dari sampel dengan cara denaturasi menggunakan pelarut aqueous maupun organik. Selanjutnya endapan akan dipisahkan dengan sentrifugasi, dan dilakukan evaporasi pada supernatant. Selanjutnya residu akan direkonstitusi menggunakan pelarut yang sesuai. Asetonitril merupakan presipitan yang paling sering digunakan pada metode ini. Tetapi asam fosfat (NCBI, 2020), serta campuran pelarut seperti asetonitril, methanol, etanol, isopropanol dan larutan zinc sulfat dapat digunakan juga untuk ekstraksi vitamin D (Gomes, *et al.*, 2013). Al-Qadi, *et al.* (2012) menggunakan metode presipitasi protein sebagai *pretreatment* sampel berupa sediaan tablet yang sebelumnya digerus, dilarutkan dengan fasa gerak asetonitril-metanol, dan dipisahkan dari endapannya. Supernatant dievaporasi dan direkonstitusi kembali dengan

fasa geraknya.

B. Saponifikasi

Umumnya saponifikasi digunakan untuk sampel makanan dan menggunakan prinsip hidrolisis alkali. Prosedur ini dilakukan dengan mencampurkan sampel dengan kalium hidroksida dalam etanol atau methanol, kemudian dipanaskan hingga 80°C sekitar 1 jam (Gomes, *et al.*, 2013). Schadt, *et al.* (2012) melakukan saponifikasi terhadap sampel sediaan tablet dengan menggunakan kalium hidroksida dan etanol. Hasil saponifikasi kemudian diekstraksi dengan menggunakan sikloheksan.

C. Ekstraksi Cair Cair (ECC)

Pada prinsipnya, proses ini dilakukan dengan penambahan dan pencampuran solven organik tak larut air untuk mengekstraksi senyawa vitamin D yang hidrofobik. Bagian organik tersebut kemudian dipisahkan, solven dihilangkan, dan sampel direkonstitusi dengan pelarut yang sesuai, tergantung pada proses analisis (Gomes, *et al.*, 2013).

D. Solid Phase Extraction (SPE)

SPE yang umum digunakan untuk analisis vitamin D adalah dengan menggunakan *catridge* fasa terbalik, tetapi sorben polar dapat digunakan pula pada *clean-up* vitamin D dengan adanya ikatan hidrogen, dipol-dipol, atau π - π antara senyawa dengan fasa gerak (Gomes, *et al.*, 2013). Pada sampel berbentuk liquid, SPE dapat langsung digunakan terhadap sampel. Tetapi pada sampel solid, analit perlu diekstraksi terlebih dahulu menggunakan pelarut organik seperti asetonitril. Selanjutnya SPE dapat dilakukan terhadap ekstrak (Zhang, *et al.*, 2018).

Chen, *et al.* (2011) menggunakan metode *packed-fiber solid phase extraction* (PFSPE)

terhadap sampel tablet multivitamin yang dapat mengurangi waktu ekstraksi pada umumnya. Sampel terlebih dahulu dilarutkan dan diekstraksi dengan etanol dan natrium sulfat, sampel lalu dihomogenasi menggunakan *vortex* lalu kemudian disentrifugasi. Supernatant yang dihasilkan, diambil dan dilewatkan ke dalam sorben. Nanofiber PS-COOH (*poly (styrene-co-methacrylic acid)*) diketahui memberikan hasil ekstraksi terbaik. ECC dan SPE merupakan metode *clean-up* sampel, yaitu menghilangkan substansi pengganggu. *Clean-up* sampel dapat meningkatkan sensitifitas dan selektifitas pengujian (Gomes, *et al.*, 2013).

Salah satu yang menjadi tantangan dalam melakukan analisis vitamin adalah terkait stabilitasnya. Seperti yang telah diketahui, vitamin D memiliki karakter tidak stabil terhadap cahaya, sehingga pengerjaannya dilakukan pada keadaan gelap (Al-Qadi, *et al.*, 2010) serta menggunakan peralatan gelas berwarna gelap atau tertutup aluminium foil (Rakusa, *et al.*, 2017). Sementara itu, proses saponifikasi dan digesti rentan terhadap oksidasi dari vitamin larut lemak (Chen, *et al.*, 2011).

Pada Tabel 1 berikut ini akan ditampilkan beberapa metode persiapan sampel (*pretreatment*), metode analisis dan jenis sampel (jenis matriks sampel) dalam analisis Vitamin Ds.

Pemisahan & Deteksi

Pemisahan senyawa vitamin D dilakukan dengan menggunakan teknik kromatografi untuk memisahkan analit dari senyawa pengganggu lainnya (Gomes, *et al.*, 2013). HPLC dengan fasa terbalik, detektor ultraviolet (UV), *diode array detector* (DAD) dan fluoresensi masih banyak digunakan untuk kuantifikasi vitamin dalam berbagai sampel (Irakli, *et al.*, 2011). Selain itu, perkembangan dalam metode kromatografi

Tabel 1. *Pretreatment*, Metode Analisis dan Matriks Sampel Analisis Vitamin D₃

<i>Pretreatment</i>	Pelarut/Sorben	Metode analisis	Sampel	Sumber
PP	H ₃ PO ₄ - <i>n</i> -hexane	HPLC-UV	Suplemen tablet	(Rakusa, <i>et al.</i> , 2017)
PP	H ₃ PO ₄ -MeOH	HPLC-DAD	Suplemen tablet	(Temova & Roskar, 2016)
PP	MeOH-ACN (fasa gerak)	HPLC-DAD	Farmasetikal	(Al-Qadi, <i>et al.</i> , 2010)
SN	EtOH:KOH	HPLC-MS/MS	Farmasetikal	(Schadt, <i>et al.</i> , 2012)
<i>Clean-up</i>	ECC-CYHA			
SPE	PFSPE (PS-COOH nanofiber)	HPLC-DAD	Suplemen farmasetikal	(Chen, <i>et al.</i> , 2011)
PP	TFA-MeOH	HPLC-DAD	Multivitamin tablet	(Kucukkolba, <i>et al.</i> , 2013)

Keterangan : MeOH: Metanol; EtOH: etanol; ACN: asetonitril; CYHA: sikloheksan; PP: presipitasi protein; SN: saponifikasi

dan spektrofotometri massa memungkinkan analisis berbagai vitamin dengan selektifitas dan sensitifitas tinggi (Schadt, *et al.*, 2012).

Kolom fasa terbalik menjadi sistem yang paling sering digunakan dalam analisis vitamin D dikarenakan sifat analit yang hidrofobik. Berdasarkan Tabel 2, diketahui metode analisis vitamin D₃ yang dilakukan Rakusa, *et al.* (2017) serta Temova dan Raskar (2016) memberikan waktu analisis dan waktu retensi analit yang relatif lebih cepat ketimbang metode lainnya. Sementara metode analisis yang dilakukan oleh Kucukkolba, *et al.*, memberikan waktu analisis yang lebih panjang ketimbang metode lainnya. Hal ini dapat terjadi akibat metode analisis yang dilakukan bukan didesain untuk vitamin D₃ saja, melainkan vitamin-vitamin lain baik yang larut

air maupun larut lemak.

Batas deteksi (LOD) dan batas kuantifikasi (LOQ) merupakan salah satu faktor yang dapat dijadikan pertimbangan dalam memilih metode analisis. Semakin kecil LOD dan LOQ menandakan semakin sensitif suatu metode, yang berarti metode dapat menganalisis analit dalam jumlah yang kecil. Meskipun memiliki waktu analisis yang relatif singkat, metode analisis yang dilakukan Rakusa, *et al.* (2017) dan Temova dan Roskar (2016) cenderung memiliki LOD dan LOQ yang lebih besar. Sementara metode analisis yang dikemukakan Schadt, *et al* (2012) memiliki LOD dan LOQ yang relatif lebih kecil. Adapun hal selanjutnya yang dapat dijadikan pertimbangan adalah ketersediaan alat dan kemudahan mendapatkan alat dan bahan.

Tabel 2. Berbagai Kondisi Metode Analisis Vitamin D₃ dengan HPLC dan LOD, LOQ yang Dihasilkan

Waktu Analisis (menit)	Waktu Retensi (menit)	Instrumen Metode Analisis	Kolom	Fasa Gerak	Laju Alir (µL/min)	Batas Deteksi dan Kuantifikasi (LOD & LOQ)	Sumber
8	~3,3	HPLC-UV	Luna C ₁₈ (2) 150 x 4,6 mm, 5 µm (Phenomenex, USA)	ACN-THF-Air (50:45:5, v/v) (isokratik)	1	LOQ: 0,15 mg/L	(Rakusa, <i>et al.</i> , 2017)
3,3	~2,6	HPLC-DAD	Gemini C ₁₈ 100 x 3,0 mm, 3 µm (Phenomenex, USA)	ACN-Air (99:1, v/v) (isokratik)	1	LOD: 0,019 mg/L LOQ: 0,057 mg/mL	(Temova & Roskar, 2016)
12	9,8	HPLC-DAD	<i>Reversed phase</i> C ₁₈ 150 x 4,6 mm, 3,5 µm (Teknokroma, Spain). Suhu kolom 40°C	MeOH-ACN (30:70, v/v) (isokratik)	1	LOD: 0,025 µg/mL LOQ: 0,06 µg/mL	(Al-Qadi, <i>et al.</i> , 2010)
15	~9,9	HPLC/MS/MS-UV	Kolom 2 dimensi Sistem RP-HPLC: (1) Ascentis Express octylsilyl C ₈ 150 x 3,0 mm, 2,7 µm (Sigma-Aldrich) (2) Ascentis Express C ₁₈ 150 x 3,0 mm, 2,7µm (Sigma-Aldrich)	(A) Air + 0,05% asam format (B) MeOH-ACN (80:20, v/v) + 0,05% asam format (Kolom 1 gradien; kolom 2 isokratik B)	0,5	LOD: 0,013 µg/tab LOQ: 2,0 µg/tab	(Schadt, <i>et al.</i> , 2012)
20	<10	HPLC-DAD	Zorbax SB-C ₁₈ 250 x 4,6 mm, 5µm (Agilent)	MeOH 100% (isokratik)	1	LOD: 0,01 µg/mL	(Chen, <i>et al.</i> , 2011)
40	22,55	HPLC-DAD	Gemini C ₁₈ 110A 150 x 4,6 mm, 3,0 µm (Phenomenex, USA). Suhu kolom 30°C	(A) 0,01% TFA (pH = 4) (B) 100% Metanol (gradien)	0,7	LOD: 0.599 µg/mL LOQ: 0.819 ng/mL	(Kucukkolbasi, <i>et al.</i> , 2013)

SIMPULAN

Terdapat berbagai macam metode yang dapat digunakan untuk melakukan analisis vitamin D₃. Analisis yang paling umum menggunakan metode kromatografi dengan detektor UV atau DAD. Pemilihan metode suatu analisis dipengaruhi oleh berbagai faktor diantaranya kadar sampel yang digunakan dengan memperhatikan nilai LOD dan LOQ, serta ketersediaan alat dan bahan.

DAFTAR PUSTAKA

- Al-Qadi, E., Battah, A. & Hadidi, K., 2010. Development of High-Performance Liquid Chromatographic Method for Vitamin D₃ Analysis in Pharmaceutical Preparation. *Jordan Journal of Pharmaceutical Sciences*, 3(2), pp. 78-85.
- Chen, L. et al., 2011. Determination of Fat-Soluble Vitamins in Food and Pharmaceutical Supplements Using Packed-fiber Solid Phase Extraction (PFSPE) for Sample Preconcentration/Clean-up. *Procedia Environmental Sciences*, Volume 8, pp. 588-595.
- Crown, 2017. Vitamin D. [Online] Available at: <https://www.nhs.uk/conditions/vitamins-and-minerals/vitamin-d/> [Diakses 15 April 2020].
- Deluca, H. F., 1979. *Vitamin D Metabolism and Function*. Germany: Springer Verlag Berlin.
- Gomes, F. P. et al., 2013. Recent Trends in The Determination of Vitamin D. *Bioanalysis*, 5(24), pp. 3063-3078.
- Handono, K. et al., 2018. *Vitamin D dan Autoimunitas*. Malang: UB Press.
- Irakli, M. N., Samanidou, V. F. & Papadoyannis, L., 2011. Development and Validation of an HPLC Method for The Simultaneous Determination of Tocopherols, Tocotrienols and Carotenoids in Cereal After Solid Phase Extraction. *J. Sep. Sci*, Volume 34, pp. 1375-1382.
- Kucukkolbasi, S., Bilber, O., Ayyildiz, H. F. & Kara, H., 2013. Simultaneous and Accurate Determination of Water-and Fat-Soluble Vitamins in Multivitamin Tablets by Using an RP-HPLC Method. *Quim. Nova*, 36(7), pp. 1044-1051.
- NCBI, 2020. *PubChem Database: Phosphoric acid*. [Online] Available at: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Phosphoric-acid> [Diakses 23 April 2020].
- Rakusa, Z. T., Srecnik, E. & Roskar, R., 2017. a. Novel HPLC-UV Method for Simultaneous Determination of Fat-soluble Vitamins and Coenzyme Q10 in Medicines and Supplements. *Acta Chim Slov*, Volume 64, pp. 523-529.
- Schadt, H. S., Gossel, R., Seibel, N. & Aebischer, C. P., 2012. *Quantification of Vitamin D₃ in Feed, Food, and Pharmaceuticals Using High-Performance Liquid Chromatography/Tandem Mass Spectrometry*, 95(5), pp. 1487-1494.
- Temova, Z. & Roskar, R., 2016. b. Stability-Indicating HPLC-UV Method for Vitamin D₃ Determination in Solutions, Nutritional Supplements and Pharmaceuticals. *Journal of Chromatographic Science*, pp. 1-7.
- Tripkovic, L. et al., 2012. Comparison of Vitamin D₂ and Vitamin D₃ Supplementation in Raising Serum 25-Hydroxyvitamin D Status: A Systematic Review and Meta-Analysis. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 95(6), pp. 1357-1364.
- Zhang, Y. et al., 2018. A Review of The Extraction and Determination Methods of Thirteen Essential Vitamins to The Human Body: An Update from 2010. *Molecules*, 23(1484), pp. 1-25.