



**UNIVERSITAS INDONESIA**

**OPTIMASI METODE ANALISIS RISPERIDON DALAM  
PLASMA *IN VITRO* DENGAN KLOZAPIN SEBAGAI BAKU  
DALAM SECARA KROMATOGRAFI CAIR KINERJA  
TINGGI**

**SKRIPSI**

**ANISA SUCI APRILA**

**0606070522**

**FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM  
PROGRAM STUDI FARMASI  
DEPOK  
JULI 2010**



**UNIVERSITAS INDONESIA**

**OPTIMASI METODE ANALISIS RISPERIDON DALAM  
PLASMA *IN VITRO* DENGAN KLOZAPIN SEBAGAI BAKU  
DALAM SECARA KROMATOGRAFI CAIR KINERJA  
TINGGI**

**SKRIPSI**

**Diajukan sebagai salah satu syarat untuk memperoleh gelar  
Sarjana Farmasi**

**ANISA SUCI APRILA  
0606070522**

**FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM  
PROGRAM STUDI FARMASI  
DEPOK  
JULI 2010**

ii

## HALAMAN PERNYATAAN ORISINALITAS

Skripsi ini adalah hasil karya saya sendiri dan semua sumber baik yang dikutip maupun dirujuk telah saya nyatakan dengan benar.

Nama : Anisa Suci Aprila

NPM : 0606070522

Tanda Tangan : 

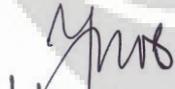
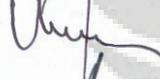
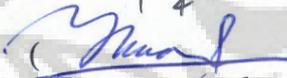
Tanggal : 6 Juli 2010

## HALAMAN PENGESAHAN

Skripsi ini diajukan oleh :  
Nama : Anisa Suci Aprila  
NPM : 0606070522  
Program Studi : Farmasi  
Judul Skripsi : Optimasi Metode Analisis Risperidon dalam Plasma  
*In Vitro* dengan Klozapin sebagai Baku Dalam  
secara Kromatografi Cair Kinerja Tinggi

Telah berhasil dipertahankan di hadapan Dewan Penguji dan diterima sebagai bagian persyaratan yang diperlukan untuk memperoleh gelar Sarjana Farmasi pada Departemen Farmasi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Indonesia

### DEWAN PENGUJI

Pembimbing I : Dr. Yahdiana Harahap, M.S. (  )  
Pembimbing II : Drs. Umar Mansur, M.Sc. (  )  
Penguji I : Dr. Arry Yanuar, M.S. (  )  
Penguji II : Dr. Herman Suryadi, M.S. (  )  
Penguji II : Dra. Juheini, M.S. (  )

Ditetapkan di : Depok  
Tanggal : 6 Juli 2010

## KATA PENGANTAR

Puji syukur penulis panjatkan kehadirat Allah SWT, karena atas berkat dan rahmat-Nya, penulis dapat menyelesaikan skripsi ini. Skripsi dengan judul Optimasi Metode Analisis Risperidon dalam Plasma *In Vitro* dengan Klozapin sebagai Baku Dalam secara Kromatografi Cair Kinerja Tinggi ini diajukan sebagai salah satu syarat untuk memperoleh gelar Sarjana Farmasi Program Studi Farmasi pada Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Indonesia.

Dalam kesempatan ini, penulis ingin menyampaikan rasa terima kasih kepada semua pihak yang telah membantu dalam penelitian dan penyusunan skripsi ini, antara lain:

1. Dr. Yahdiana Harahap, MS., selaku Ketua Departemen Farmasi FMIPA UI dan pembimbing I atas segala bimbingan, saran, bantuan, serta dukungan moril selama penelitian dan penyusunan skripsi ini.
2. Drs. Umar Mansur, M.Sc., selaku pembimbing II atas segala bimbingan, saran, dan bantuan selama penelitian dan penyusunan skripsi ini.
3. Dr. Nelly D. Leswara, selaku pembimbing akademik yang telah memberikan bimbingan selama penulis menempuh pendidikan di program S1 Reguler Farmasi UI.
4. Seluruh dosen, laboran, dan staf karyawan di Departemen Farmasi FMIPA UI, atas segala ilmu, dukungan, dan saran kepada penulis selama masa pendidikan di Departemen Farmasi FMIPA UI.
5. Rina Rahmawati, S.Farm, Apt. selaku Manajer Teknis, Krisnasari Dianpratami, S.Farm, Apt. selaku Manajer Administrasi, dan Utami Pravitasari, S.Si selaku Supervisor Laboratorium Bioavailabilitas dan Bioekivalensi Departemen Farmasi FMIPA UI; Pak Rustam atas saran, bantuan, arahan, bimbingan, dan perhatian yang diberikan kepada penulis selama penelitian.

6. PT. Meprofarm yang telah memberikan bantuan bahan baku zat baku dalam kepada penulis.
7. Keluarga tercinta yaitu Mamah, Papah, Sandy atas segala kasih sayang, do'a, semangat, dukungan moril dan materil, dan pengorbanan yang tiada terkira kepada penulis.
8. Ani, Dira, Chiro, Tuti, Nida, Eka, Kak Hasma, Sherly. Terima kasih untuk segala dukungan, bantuan, kerjasama, semangat, dan kenangan yang telah diberikan kepada penulis.
9. Teman-teman Farmasi S1 reguler angkatan 2006, rekan-rekan penelitian di Laboratorium Analisis Instrumen Departemen Farmasi FMIPA UI, dan Laboratorium Bioavailabilitas dan Bioekivalensi Departemen Farmasi FMIPA UI. Terima kasih untuk segala dukungan, bantuan, kerjasama, dan semangat yang telah diberikan kepada penulis.
10. Semua pihak yang tidak dapat disebutkan satu per satu, yang telah memberikan dukungannya selama penelitian dan penulisan skripsi ini.

Penulis menyadari dalam penelitian dan penulisan skripsi ini masih jauh dari sempurna. Akhir kata, penulis berharap Allah SWT berkenan membalas segala kebaikan semua pihak yang telah membantu. Semoga skripsi ini dapat bermanfaat bagi semua pihak yang membutuhkan.

Penulis  
2010

**HALAMAN PERNYATAAN PERSETUJUAN PUBLIKASI  
TUGAS AKHIR UNTUK KEPENTINGAN AKADEMIS**

---

Sebagai sivitas akademik Universitas Indonesia, saya yang bertanda tangan di bawah ini:

Nama : Anisa Suci Aprila  
NPM : 0606070522  
Program Studi : Farmasi  
Departemen : Farmasi  
Fakultas : Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam  
Jenis karya : Skripsi

demi pengembangan ilmu pengetahuan, menyetujui untuk memberikan kepada Universitas Indonesia Hak Bebas Royalti Noneksklusif (*Non-exclusive Royalty Free Right*) atas karya ilmiah saya yang berjudul :

Optimasi Metode Analisis Risperidon dalam Plasma *In Vitro* dengan Klozapin sebagai Baku Dalam secara Kromatografi Cair Kinerja Tinggi

beserta perangkat yang ada (jika diperlukan). Dengan Hak Bebas Royalti Noneksklusif ini Universitas Indonesia berhak menyimpan, mengalihmedia/format-kan, mengelola dalam bentuk pangkalan data (database), merawat, dan memublikasikan tugas akhir saya selama tetap mencantumkan nama saya sebagai penulis/pencipta dan sebagai pemilik Hak Cipta.

Demikian pernyataan ini saya buat dengan sebenarnya.

Dibuat di : Depok  
Pada tanggal : 6 Juli 2010  
Yang menyatakan



(Anisa Suci Aprila)

## ABSTRAK

Nama : Anisa Suci Aprila  
Program studi : Farmasi  
Judul : Optimasi Metode Analisis Risperidon dalam Plasma *In Vitro* dengan Klozapin sebagai Baku Dalam secara Kromatografi Cair Kinerja Tinggi

Risperidon merupakan obat antipsikosis yang digunakan dalam pengobatan skizofrenia. Risperidon termasuk salah satu obat yang masuk dalam kategori obat wajib uji Bioekivalensi (BE), sehingga kadarnya di dalam darah perlu dipantau. Metode analisis menggunakan Kromatografi Cair Kinerja Tinggi (KCKT) dengan detektor *photodiode array* telah dikembangkan dan dioptimasi untuk analisis risperidon dalam plasma manusia *in vitro*. Risperidon diekstraksi dari plasma dengan metode ekstraksi cair-cair menggunakan campuran dietileter-isoamilalkohol (99:1). Kromatografi dilaksanakan menggunakan teknik isokratik pada kolom fase-terbalik LiChrospher<sup>®</sup> 100 RP-18 e (5 $\mu$ m, Merck), fase gerak asetonitril-dapar kalium dihidrogen fosfat yang mengandung 0,1% trietilamin (40:60) pada kecepatan alir 0,8 mL/menit dan dideteksi pada panjang gelombang 278 nm. Klozapin digunakan sebagai baku dalam. Kondisi optimum ini membutuhkan waktu analisis 6,5 menit. Pada rentang konsentrasi 5,11-204,36 ng/mL dihasilkan kurva kalibrasi yang linier dengan koefisien korelasi ( $r$ ) 0,9999. Akurasi (% *diff*) dari metode ini antara -14,88% sampai 14,59% dengan presisi (KV) antara 2,17% sampai 7,64%, dan uji perolehan kembali relatif antara 85,12% sampai 114,59%.

Kata kunci: Klozapin, Kromatografi Cair Kinerja Tinggi, Optimasi, Plasma *in vitro*, Risperidon  
xiv+72 halaman: 8 gambar; 15 tabel; 8 lampiran  
Daftar acuan: 21 (1985-2009)

## ABSTRACT

Name : Anisa Suci Aprila  
Program study : Pharmacy  
Title : Analytical Method Optimization of Risperidone with Clozapine as Internal Standard in Plasma *In Vitro* using High Performance Liquid Chromatography

Risperidone is antipsychotic agent which is used in schizophrenia treatment. Risperidone is one of the drug that have to be evaluated with bioequivalency test, thereby monitoring the blood drug level is necessary. A method using high-performance liquid chromatography (HPLC) with photodiode array detector has been developed for analysis of risperidone in human plasma *in vitro*. Risperidone was extracted from plasma by liquid-liquid extraction using diethylether-isoamylalcohol (99:1). The chromatography was carried out by isocratic technique on a reversed-phase LiChrospher<sup>®</sup> 100 RP-18 e (5 $\mu$ m, Merck) with mobile phase consisted of acetonitril-potassium dihydrogen phosphate buffer containing triethylamine 0,1% (40:60) at flow rate 0,8 mL/minute and detection was performed at wavelength of 278 nm. Clozapine was used as internal standard. This optimum condition was take 6,5 minutes for analysis. Linearity was established for range concentration of 5,11-204,36 ng/mL with coefficient correlation (r) was 0,9999. Accuracy (% diff) ranged from -14,88% to 14,59%, precision (CV) ranged 2,17% to 7,64%, and relative recovery ranged from 85,12 to 114,59%.

Keywords: Clozapine, High Performance Liquid Chromatography, Optimization, Plasma *in vitro*, Risperidone  
xiii+72 pages: 8 figure; 15 table; 8 appendices  
Bibliography: 21 (1985-2010)

## DAFTAR ISI

HALAMAN JUDUL .....	ii
<b>HALAMAN PERNYATAAN ORISINALITAS</b> .....	iii
<b>HALAMAN PENGESAHAN</b> .....	iv
<b>KATA PENGANTAR</b> .....	v
<b>HALAMAN PERSETUJUAN PUBLIKASI TUGAS AKHIR</b> .....	vii
<b>ABSTRAK</b> .....	viii
<b>ABSTRACT</b> .....	ix
<b>DAFTAR ISI</b> .....	x
<b>DAFTAR GAMBAR</b> .....	xi
<b>DAFTAR TABEL</b> .....	xii
<b>DAFTAR LAMPIRAN</b> .....	xiii
<b>BAB 1 PENDAHULUAN</b> .....	1
1.1 Latar Belakang.....	1
1.2 Tujuan Penelitian.....	3
<b>BAB 2 TINJAUAN PUSTAKA</b> .....	4
2.1 Risperidon.....	4
2.2 Klozapin.....	6
2.3 Kromatografi Cair Kinerja Tinggi.....	8
2.4 Analisis Obat dalam Plasma.....	11
2.5 Validasi Metode Analisis.....	13
2.6 Metode Analisis Risperidon .....	18
<b>BAB 3 METODE PENELITIAN</b> .....	22
3.1 Lokasi .....	22
3.2 Alat .....	22
3.3 Bahan.....	22
3.4 Cara Kerja.....	23
<b>BAB 4 HASIL DAN PEMBAHASAN</b> .....	30
4.1 Pencarian Kondisi Analisis Optimum Risperidon .....	30
4.2 Validasi Metode Analisis Risperidon dalam Plasma <i>In Vitro</i> .....	33
<b>BAB 5 KESIMPULAN DAN SARAN</b> .....	39
5.1 Kesimpulan.....	39
5.2 Saran .....	39
<b>DAFTAR ACUAN</b> .....	40

## DAFTAR GAMBAR

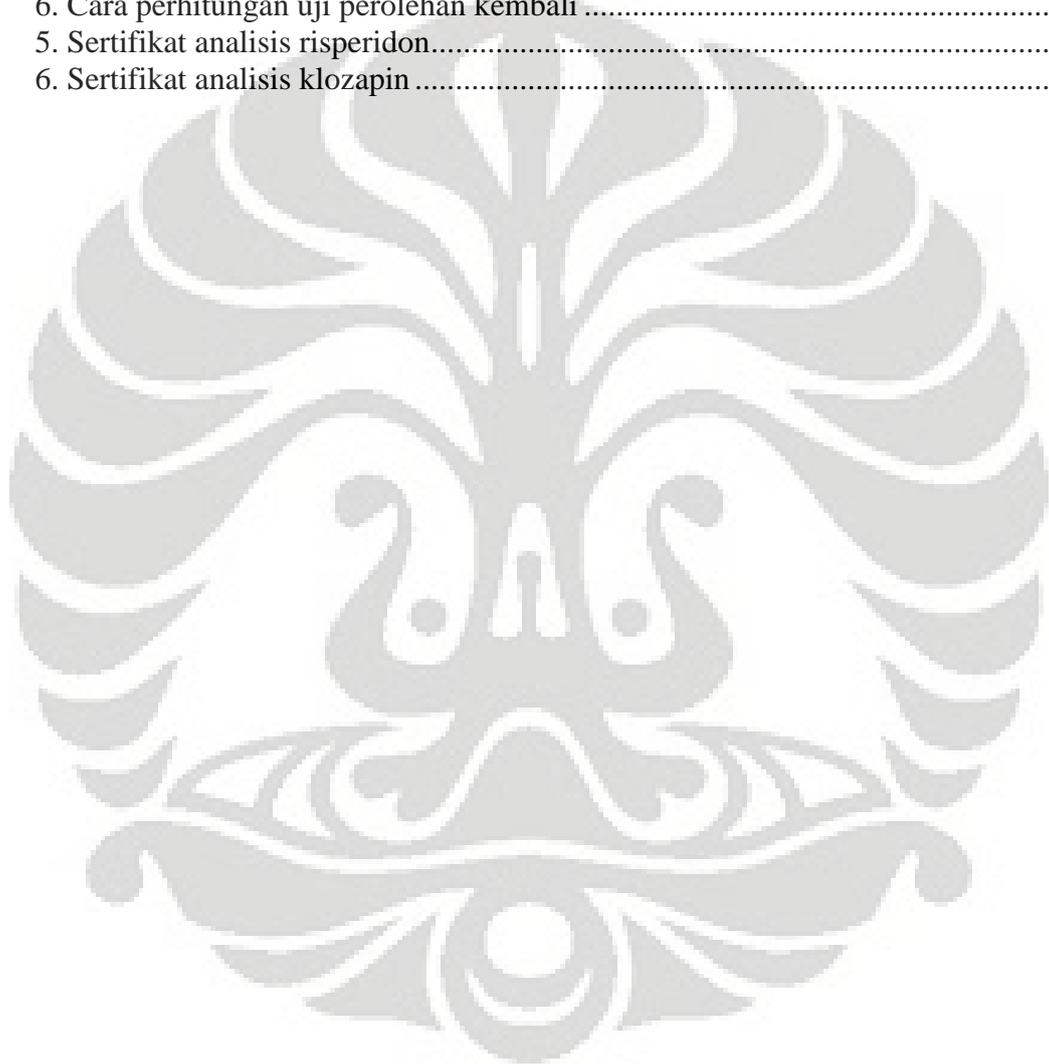
Gambar	Halaman
2.1 Rumus struktur risperidon .....	4
2.2 Rumus struktur klozapin .....	6
3.1 Peralatan Kromatografi Cair Kinerja Tinggi (KCKT).....	43
4.1 Kromatogram ekstrak plasma yang mengandung risperidon konsentrasi 100,0 ng/mL dan baku dalam klozapin konsentrasi 10 µg/mL dengan fase gerak asetonitril-dapar kalium dihidrogen fosfat 50 mM yang mengandung 0,1% trietilamin (32:68) dengan kecepatan alir 1,0 mL/menit .....	44
4.2 Kromatogram campuran larutan standar risperidon dan klozapin (baku dalam) dengan konsentrasi masing-masing 10 µg/mL dengan fase gerak asetonitril-dapar kalium dihidrogen fosfat 50 mM yang mengandung 0,1% trietilamin (40:60) dengan kecepatan alir 0,8 mL/menit .....	45
4.3 Kromatogram ekstrak plasma tanpa penambahan risperidon dan baku dalam klozapin (plasma blanko) dengan fase gerak asetonitril-dapar kalium dihidrogen fosfat 50 mM yang mengandung 0,1% trietilamin (40:60) dengan kecepatan alir 0,8 mL/menit .....	46
4.4 Kromatogram ekstrak plasma yang mengandung risperidon konsentrasi 100,0 ng/mL dan baku dalam klozapin konsentrasi 10 µg/mL dengan fase gerak asetonitril-dapar kalium dihidrogen fosfat 50 mM yang mengandung 0,1% trietilamin (40:60) dengan kecepatan alir 0,8 mL/menit .....	47
4.5 Kurva kalibrasi risperidon dalam plasma dengan penambahan baku dalam ..	48

## DAFTAR TABEL

Tabel	Halaman
4.1 Hubungan antara waktu retensi, jumlah lempeng teoritis, efisiensi kolom, dan faktor ikutan kromatogram risperidon terhadap perubahan komposisi fase gerak.....	49
4.2 Hubungan antara waktu retensi, jumlah lempeng teoritis, efisiensi kolom, dan faktor ikutan kromatogram risperidon terhadap perubahan kecepatan alir fase gerak.....	50
4.3 Data uji kesesuaian sistem.....	51
4.4 Data kurva kalibrasi risperidon dalam plasma <i>in vitro</i> dengan penambahan baku dalam.....	52
4.5 Data pengukuran <i>lower limit of quantitation</i> (LLOQ) risperidon dalam plasma <i>in vitro</i> dengan penambahan baku dalam.....	53
4.6 Data uji akurasi dan presisi risperidon dalam plasma <i>in vitro</i> dengan penambahan baku dalam, Hari ke-1 ( <i>intra-day</i> ).....	54
4.7 Data uji akurasi dan presisi risperidon dalam plasma <i>in vitro</i> dengan penambahan baku dalam, Hari ke-2 ( <i>intra-day</i> ).....	55
4.8 Data uji akurasi dan presisi risperidon dalam plasma <i>in vitro</i> dengan penambahan baku dalam, Hari ke-3 ( <i>intra-day</i> ).....	56
4.9 Data uji akurasi dan presisi risperidon dalam plasma <i>in vitro</i> dengan penambahan baku dalam selama 3 hari ( <i>inter-day</i> ).....	57
4.10 Data uji selektivitas risperidon dalam plasma <i>in vitro</i> dengan penambahan baku dalam.....	58
4.11 Data uji perolehan kembali (% <i>recovery</i> ) risperidon dalam plasma <i>in vitro</i> dengan penambahan baku dalam.....	59
4.12 Data uji stabilitas larutan stok risperidon (dengan baku dalam).....	61
4.13 Data uji stabilitas jangka pendek risperidon dalam plasma <i>in vitro</i> dengan penambahan baku dalam.....	62
4.14 Data uji stabilitas <i>post-preparatif</i> (autosampler) risperidon dalam plasma <i>in vitro</i> dengan penambahan baku dalam.....	63
4.15 Data hasil optimasi metode analisis.....	64

## DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran	Halaman
1. Cara perhitungan Nilai N, HETP, dan $T_f$ .....	65
2. Cara memperoleh regresi linear .....	66
3. Cara perhitungan koefisien variasi dari fungsi.....	67
4. Cara perhitungan presisi.....	68
5. Cara perhitungan akurasi.....	69
6. Cara perhitungan uji perolehan kembali .....	70
5. Sertifikat analisis risperidon.....	71
6. Sertifikat analisis klozapin .....	72



# BAB 1

## PENDAHULUAN

### 1.1 Latar Belakang

Analisis obat terhadap cairan biologis atau biasa disebut bioanalisis merupakan tahap yang penting dalam usaha pengembangan obat baru. Hal ini perlu dilakukan untuk memperoleh data yang akan dijadikan pedoman dalam studi klinis dan studi keamanan obat. Bioanalisis digunakan untuk menggambarkan pengukuran obat secara kuantitatif dalam cairan biologis, terutama darah, plasma, serum, urin atau cairan membran. Kemampuan untuk memonitor dan mengukur kadar obat di dalam tubuh sangat penting untuk mengetahui keamanan, dosis, dan efektifitas suatu obat. Dengan dilakukannya bioanalisis, dapat diketahui nasib suatu obat setelah obat diberikan sehingga dapat mengembangkan obat tersebut dan juga dapat menentukan regimen dosis yang aman (Evans, 2004).

Untuk dapat melakukan analisis, suatu metode analisis yang akan digunakan harus divalidasi terlebih dahulu. Sebelum melakukan validasi metode analisis suatu obat, perlu dilakukan optimasi kondisi ekstraksi dan analisisnya. Kondisi analisis yang sudah optimum tersebut kemudian harus melalui proses validasi karena validasi metode yang sempurna hanya dapat terjadi jika metode tersebut sudah dioptimasi. Validasi metode dilakukan dengan melakukan serangkaian percobaan yang bertujuan untuk memastikan bahwa parameter-parameter metode analisis yang divalidasi harus memenuhi persyaratan yang ditetapkan. Setelah metode tersebut valid, kemudian dapat digunakan untuk menganalisis suatu obat untuk memonitoring obat, mempelajari parameter-parameter farmakokinetik suatu obat, serta bermanfaat dalam penetapan rejimen dosis (Gandjar & Rohman, 2007).

Salah satu obat yang harus dilakukan uji bioekivalensi (BE) adalah risperidon (Food and Drug Administration, 2007). Risperidon merupakan antipsikotik kimia golongan benzisoksazol. Risperidon merupakan antagonis monoaminergik selektif dengan afinitas yang tinggi terhadap reseptor 5-HT<sub>2</sub> serotoninergik dan D<sub>2</sub> dopaminergik. Beberapa penelitian membuktikan bahwa risperidon dapat digunakan dalam pengobatan skizofrenia dan *bipolar disorder*.

Risperidon memiliki beberapa keuntungan, antara lain onsetnya cepat dan dapat digunakan untuk melawan gejala negatif pada penderita skizofrenia (Acri & Henretig, 1998; Avenoso, Facciola, Salemi, & Spina, 2000; Llerena, et al., 2003). Setelah pemberian oral, risperidon diabsorpsi dengan cepat dan lengkap dari saluran pencernaan dan dimetabolisme melalui hidroksilasi dan *N*-dealkilasi. Hidroksilasi risperidon dikatalisasi oleh sitokrom P450 isoenzim CYP2D6, yang berbeda pada setiap orang karena pengaruh genetik (Remmerie, et al., 2003).

Sejak awal tahun 1990-an, metode kromatografi cair kinerja tinggi banyak dikembangkan untuk menganalisis risperidon. Teknik analisis dengan detektor UV dilakukan setelah sampel diekstraksi dengan cara yang kompleks untuk memisahkan risperidon dari gangguannya. Selain detektor UV, digunakan detektor elektrokimia yang dapat meningkatkan sensitivitas (Remmerie, et al., 2003).

Saat ini, sudah banyak dikembangkan teknik analisis risperidon yang lebih sensitif, yaitu *liquid chromatography - mass spectrometry* (LC-MS) dan *liquid chromatography - tandem mass spectrometry* (LC-MS-MS). Dengan meningkatnya selektivitas detektor, memungkinkan waktu preparasi dan waktu analisis kromatografi yang lebih cepat. Teknik tersebut memiliki selektivitas dan sensitivitas yang sangat baik, tetapi tidak dapat digunakan untuk analisis klinis yang rutin karena membutuhkan alat yang khusus dan biaya yang relatif mahal (Foroutan, Zarghi, Shafaati, & Khoddam, 2006; Remmerie, et al., 2003).

Dalam penelitian ini, akan dilakukan optimasi metode analisis risperidon dalam plasma *in vitro* menggunakan kromatografi cair kinerja tinggi dengan mengadaptasi salah satu metode yang telah dilakukan (Mahatthanatrakul, Tharinee, Sriwiryajan, Ridditid, & Wongnawa, 2008). Optimasi metode dilakukan agar metode yang didapatkan dapat digunakan dalam validasi metode analisis risperidon di dalam plasma *in vitro*.

## 1.2 Tujuan Penelitian

1. Memperoleh kondisi optimum untuk analisis risperidon dalam plasma *in vitro* secara kromatografi cair kinerja tinggi dengan menggunakan klorzopin sebagai baku dalam.
2. Memperoleh nilai LLOQ, rentang kurva kalibrasi yang linear, serta menentukan akurasi, presisi, selektivitas, dan nilai uji perolehan kembali, menggunakan kondisi optimum metode analisis yang sudah didapat.



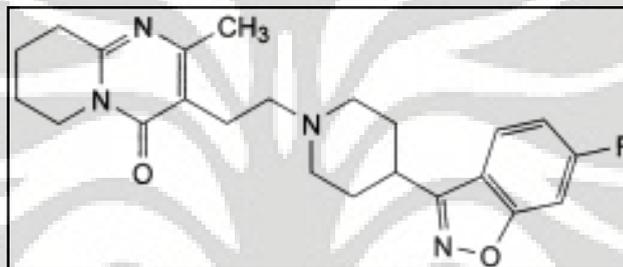
## BAB 2

### TINJAUAN PUSTAKA

#### 2.1 Risperidon

2.1.1 Monografi (*British Pharmacopoeia*, 2009; Lacy, Armstrong, Goldman, & Lance, 2005; *Martindale 34<sup>th</sup> edition*, 2005; *Risperidone*, n.d.)

Struktur kimia



[Sumber: *British Pharmacopoeia*, 2009]

Gambar 2.1 Rumus struktur risperidon

Rumus molekul :  $C_{23}H_{27}FN_4O_2$

Nama kimia : 3-{2-[4-(6-Fluoro-1,2-benzisoksazol-3-il)piperidino]etil}-  
6,7,8,9-tetrahidro-2-metilpirido[1,2- $\alpha$ ]pirimidin-4-one

Bobot molekul : 410,5

Nomor CAS : 106266-06-2

Sinonim : risperidona, risperidonum

Pemerian : serbuk putih atau hampir putih

Kelarutan : praktis tidak larut dalam air, sulit larut dalam alkohol, sangat mudah larut dalam diklormetan, larut dalam larutan asam encer

Penyimpanan : lindungi dari cahaya

Titik leleh : 170 °C

Nama paten : Risperdal®, Risperdal® Consta™

### 2.1.2 Aktivitas Farmakologi (Lacy, Armstrong, Goldman, & Lance, 2005)

Risperidon termasuk dalam golongan antipsikotik, digunakan dalam pengobatan skizofrenia dan pengobatan *bipolar I disorder* (sebagai terapi tunggal maupun dikombinasikan dengan litium atau valproat). Risperidon merupakan antipsikotik benzisoksazol, antagonis gabungan serotonin-dopamin yang terikat dengan reseptor 5-HT<sub>2</sub> di sistem saraf pusat dan perifer dengan afinitas yang sangat tinggi; terikat dengan reseptor dopamin-D<sub>2</sub> dengan afinitas rendah. Afinitas ikatan dengan reseptor dopamin-D<sub>2</sub> dua puluh kali lebih rendah dari afinitas 5-HT<sub>2</sub>. Penambahan antagonis serotonin ke antagonis dopamin (mekanisme neuroleptik klasik) bertujuan untuk meningkatkan gejala negatif dari psikosis dan mengurangi insiden efek samping ekstrapirimal. Reseptor alpha<sub>1</sub>, alpha<sub>2</sub> adrenergik, dan histaminergik juga diantagonis oleh afinitas yang tinggi. Risperidon memiliki afinitas rendah hingga sedang dengan reseptor 5-HT<sub>1C</sub>, 5-HT<sub>1D</sub>, dan 5-HT<sub>1A</sub>, afinitas rendah dengan reseptor D<sub>1</sub> dan tidak ada afinitas dengan reseptor muskarinik atau beta<sub>1</sub> dan beta<sub>2</sub>.

### 2.1.3 Sifat Farmakokinetika (Lacy, Armstrong, Goldman, & Lance, 2005; *Risperidone*, n.d.)

#### Absorpsi

Pada pemberian oral, risperidon diabsorpsi dengan baik dan cepat. Makanan tidak mempengaruhi kecepatan dan lamanya absorpsi. Bioavailabilitas risperidon pada pemberian oral dalam bentuk larutan adalah 70%, sedangkan dalam bentuk tablet adalah 66%. Bioavailabilitas oral absolut risperidon adalah 70%. Pada pemberian injeksi, <1% diabsorpsi pada awalnya, pelepasan utama terjadi pada minggu ke tiga dan diatur dari minggu ke empat hingga minggu ke enam.

#### Distribusi

Volume distribusi risperidon sekitar 1-2 L/kg. Ikatan protein plasma dengan risperidon sekitar 90%. Konsentrasi risperidon dalam darah antara 9 ng/mL (C<sub>min</sub>) hingga 16 ng/mL (C<sub>max</sub>).

## Metabolisme

Dimetabolisme secara hepatic melalui CYP2D6 menjadi 9-hidroksirisperidon (memiliki aktivitas farmakologi seperti risperidon), *N-dealkilasi* merupakan jalur minor.

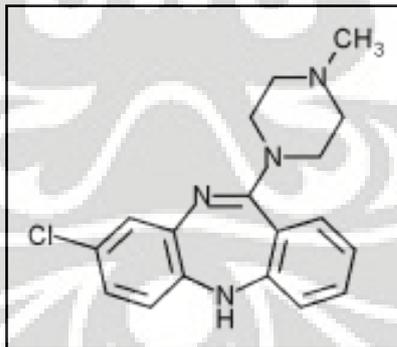
## Eliminasi

Waktu paruh rata-rata sekitar 20 jam. Untuk pasien dengan metabolisme cepat, waktu paruh risperidon sekitar 3 jam dan 9-hidroksirisperidon sekitar 21 jam, sedangkan untuk pasien dengan metabolisme lambat, waktu paruh risperidon sekitar 20 jam dan 9-hidroksirisperidon sekitar 30 jam. Ekskresinya melalui urin (70%) dan feses (15%)

## 2.2 Klozapin

2.2.1 Monografi (*British Pharmacopoeia*, 2009; *Clozapine*, n.d.; Lacy, Armstrong, Goldman, & Lance, 2005; *Martindale 34<sup>th</sup> edition*, 2005)

### Struktur kimia



[Sumber: *British Pharmacopoeia*, 2009]

Gambar 2.2 Rumus struktur klozapin

Rumus molekul : C<sub>18</sub>H<sub>19</sub>ClN<sub>4</sub>

Nama kimia : 8-Kloro-11-(4-metilpiperazin-1-il)-5H-dibenzo[*b,e*][1,4]diazepin

Bobot molekul : 326,8

Nomor CAS : 5786-21-0

Universitas Indonesia

Sinonim	: klozapin
Pemerian	: serbuk kristal berwarna kuning
Kelarutan	: praktis tidak larut dalam air, larut dalam alkohol, sangat mudah larut dalam diklormetan, larut dalam larutan asam asetat encer
Titik leleh	: 182 °C – 186 °C
Nama paten	: Clozaril <sup>®</sup> , Fazaclo <sup>™</sup>

### 2.2.2 Aktivitas Farmakologi (*Clozapine*, n.d.)

Klozapin merupakan agen psikotropik golongan derivat benzisoksazol dan digunakan untuk pengobatan skizofrenia. Klozapin merupakan antagonis monoaminergik selektif dengan afinitas tinggi terhadap serotonin Tipe 2 (5HT<sub>2</sub>), dopamin Tipe (D<sub>2</sub>) dan adrenergik 1 dan 2, dan reseptor H<sub>1</sub> histaminergik. Klozapin bekerja sebagai antagonis pada reseptor lainnya, tetapi dengan potensi yang rendah. Antagonisme pada reseptor selain reseptor dopamin dan 5HT<sub>2</sub> dengan afinitas yang mirip dapat menjelaskan efek terapi dan efek samping lainnya.

### 2.2.3 Sifat Farmakokinetika (Lacy, Armstrong, Goldman, & Lance, 2005)

#### Absorpsi

Absorpsi klozapin pada pemberian oral sebesar 90-95%. Makanan tidak mempengaruhi kecepatan dan lamanya waktu absorpsi. Klozapin mengalami metabolisme lintas pertama sehingga bioavailabilitas absolutnya sebesar 50-60%.

#### Distribusi

Konsentrasi plasma mencapai puncak setelah 2,5 jam. Ikatan protein plasma dengan klozapin sebesar 97%.

#### Metabolisme

Dimetabolisme secara hepatic.

#### Eliminasi

Waktu paruh sekitar 12 jam. Ekskresinya melalui urin (50%) dan feses (30%) dengan sedikit obat dalam bentuk utuh.

## 2.3 Kromatografi Cair Kinerja Tinggi

### 2.3.1 Teori Dasar

HPLC (*High Performance Liquid Chromatography*) atau KCKT (Kromatografi Cair Kinerja Tinggi) merupakan teknik analisis yang paling cepat berkembang dalam kimia analitik. Adapun kelebihan metode ini dibandingkan metode lain yaitu (Harmita, 2006):

1. Waktu analisis cepat
2. Daya pisahnya baik
3. Peka
4. Pemilihan kolom dan eluen sangat bervariasi
5. Kolom dapat dipakai kembali
6. Dapat digunakan untuk molekul besar dan kecil
7. Mudah untuk memperoleh kembali cuplikan
8. Dapat menghitung sampel dengan kadar yang sangat rendah

### 2.3.2 Alat-alat Kromatografi Cair Kinerja Tinggi (KCKT)

Alat KCKT terdiri dari beberapa bagian, yaitu pompa, injektor, kolom, dan detektor (Harmita, 2006).

#### 1. Pompa

Pompa merupakan bagian penting pada kromatografi cair dan dapat mempengaruhi hasil analisis. Pompa berfungsi untuk mengalirkan eluen ke dalam kolom. Pompa, segel-segel pompa dan semua penghubung dalam sistem kromatografi harus terbuat dari bahan yang secara kimiawi tahan terhadap fase gerak. Hal terpenting dalam sistem pompa adalah aliran yang konstan dan stabil (Engelhardt, 1986).

#### 2. Injektor

Injektor berfungsi untuk memasukkan cuplikan ke dalam kolom.

### 3. Kolom

Kolom berfungsi untuk memisahkan masing-masing komponen. Kolom merupakan bagian penting dalam KCKT, karena ikut menentukan keberhasilan analisis. Kolom dapat dibagi menjadi dua kelompok, yaitu kolom analitik (diameter dalam 2-6 mm) dan kolom preparatif (diameter dalam 6 mm atau lebih).

### 4. Detektor

Detektor berfungsi untuk mendeteksi atau mengidentifikasi komponen yang ada dalam eluat dan mengukur jumlahnya.

#### 2.3.3 Fase Gerak

Fase gerak pada KCKT merupakan salah satu pengubah yang mempengaruhi pemisahan. Variasi fase gerak pada KCKT sangat beragam dalam hal kepolaran dan selektivitasnya terhadap komponen dalam sampel (Harmita, 2006).

Secara umum eluen yang baik harus mempunyai sifat sebagai berikut :

1. Murni
2. Tidak bereaksi dengan kolom
3. Sesuai dengan detektor
4. Dapat melarutkan cuplikan
5. Selektif terhadap komponen
6. Viskositasnya rendah
7. Memungkinkan dengan mudah untuk memperoleh cuplikan kembali jika diperlukan
8. Harganya wajar
9. Dapat memisahkan zat dengan baik

#### 2.3.4 Analisis Kuantitatif dengan KCKT

Dasar perhitungan kuantitatif untuk suatu komponen zat yang dianalisis adalah dengan mengukur luas puncaknya. Ada beberapa metode yang dapat digunakan, yaitu (Harmita, 2006):

1. Penggunaan baku luar

Larutan baku dengan berbagai konsentrasi disuntikkan dan diukur luas puncaknya. Buat kurva kalibrasi antara luas puncak terhadap konsentrasi. Kadar sampel diperoleh dengan cara memplot luas puncak sampel pada kurva kalibrasi baku atau dengan perbandingan langsung. Kekurangan metode ini adalah diperlukan baku yang murni serta ketelitian dalam pengenceran dan penimbangan.

2. Penggunaan baku dalam

Sejumlah baku dalam ditambahkan pada sampel dan standar. Kemudian larutan campuran komponen standar dan baku dalam dengan konsentrasi tertentu disuntikkan dan hitung perbandingan luas puncak kedua zat tersebut. Buat kurva baku antara perbandingan luas puncak terhadap konsentrasi komponen standar. Kadar sampel diperoleh dengan memplot perbandingan luas puncak komponen sampel dengan baku dalam pada kurva standar. Keuntungan menggunakan cara ini adalah kesalahan volume injeksi dieliminir. Kesulitan cara ini adalah diperlukan baku dalam yang tepat.

Ada beberapa persyaratan yang harus dipenuhi oleh senyawa baku dalam, yaitu (Johnson & Stevenson, 1991):

- a. harus terpisah sama sekali dari puncak cuplikan
- b. harus terelusi dekat dengan puncak yang diukur
- c. konsentrasi dan tanggapan detektornya harus sama dengan konsentrasi dan tanggapan detektor puncak yang diukur.
- d. tidak boleh bereaksi dengan komponen cuplikan
- e. tidak terdapat dalam cuplikan asal
- f. harus sangat murni dan mudah diperoleh

## 2.4 Analisis Obat Dalam Plasma

Plasma harus ditambahkan antikoagulan terlebih dahulu agar dapat dipisahkan dari darah dengan cara sentrifugasi, tetapi harus dilakukan dengan hati-hati karena sel darah merah mudah pecah yang dapat mengakibatkan pemisahan plasma menjadi lebih sulit. Sel darah merah dapat pecah karena beberapa perlakuan seperti pemanasan, pembekuan, penggunaan alat-alat mekanik seperti pengocokan dengan *stirrer*, tetapi penyebab yang paling umum adalah karena penambahan air atau alkohol yang menyebabkan fenomena osmosis karena sel mengembang dan akhirnya hancur. Oleh karena itu, umumnya ekstraksi tidak dilakukan terhadap sampel darah, melainkan terhadap plasma yang telah disiapkan terlebih dahulu (Chamberlain, 1985)

Konsentrasi obat dalam plasma umumnya rendah pada dosis terapi. Oleh karena itu diperlukan persiapan sampel khusus untuk analisis obat dalam plasma. Dalam plasma, obat terikat pada permukaan protein sehingga obat harus dibebaskan terlebih dahulu. Beberapa cara yang bisa dilakukan untuk mencapai tujuan di atas diantaranya ialah dengan:

### 1. Pengendapan protein

Pada pengendapan protein, biasanya digunakan asam atau pelarut organik yang dapat bercampur dengan air untuk memisahkan protein dari plasma. Pelarut organik seperti metanol, asetonitril, aseton dan etanol, meskipun memiliki efisiensi yang relatif rendah dalam memisahkan protein, tetapi pelarut ini telah digunakan secara luas dalam bioanalisis karena kompatibilitasnya dengan fase gerak KCKT.

Setelah dicampur (biasanya menggunakan bantuan vorteks), sampel disentrifugasi untuk menghasilkan supernatan yang jernih, berisi komponen yang diinginkan. Larutan yang telah bebas protein mungkin perlu diekstraksi lebih lanjut dengan teknik ekstraksi cair-cair dengan pelarut organik yang tidak bercampur, atau dapat langsung disuntikkan pada sistem analisis yang akan digunakan, bila diyakini obat sepenuhnya larut dalam supernatan (Evans, 2004).

## 2. Ekstraksi Cair-cair

Ekstraksi cair-cair adalah proses pemindahan suatu komponen dari satu fase cair ke fase cair lainnya yang tidak saling bercampur sesamanya. Prosesnya disebut partisi atau distribusi. Jika suatu zat yang terlarut terdistribusi antara dua cairan atau pelarut yang tidak saling bercampur, maka dalam sistem akan terjadi keseimbangan.

Umumnya, salah satu fasenya berupa air atau larutan air. Cara paling umum yang sering digunakan untuk pemisahan parsial adalah metode ekstraksi dengan pelarut organik. Agar obat dapat terekstraksi dalam pelarut organik, maka obat itu harus dalam bentuk tidak terionisasi. Oleh karena itu, pH fase air harus dioptimasi agar diperoleh bentuk tidak terionisasi dengan sempurna. Optimasi dapat dilakukan dengan menghitung atau menentukan pKa obat.

Setelah dipisahkan dari fase air, fase organik harus benar-benar bebas air. Untuk mempercepat penguapan, dapat ditambahkan beberapa tetes etanol, dan air dapat dihilangkan dari fase organik dengan penambahan sedikit natrium sulfat anhidrat pada saat penyaringan. Penguapan dapat dilakukan dengan alat evaporator vakum atau diuapkan pada temperatur kamar (Chamberlain, 1985).

## 3. Ekstraksi Fase Padat

Ekstraksi fase padat adalah suatu teknik yang dapat mengatasi beberapa masalah yang ditemui pada ekstraksi cair-cair. Pada ekstraksi fase padat, analit ditahan oleh fase padat saat sampel dilewatkan, kemudian dilanjutkan dengan elusi analit oleh pelarut yang sesuai. Pada teknik ini digunakan kolom berukuran kecil dengan adsorben yang mirip dengan yang digunakan pada saat analisis. Metode ekstraksi fase padat ini berdasarkan prinsip dari kromatografi, yaitu adsorpsi obat dari larutan ke dalam adsorben atau fase diam (Evans, 2004).

Pemilihan cara isolasi obat dalam plasma harus dilakukan karena akan memberikan nilai perolehan kembali (*recovery*) yang maksimum dari obat yang dianalisis. Selain itu, untuk memperbaiki ketelitian, maka penggunaan baku dalam dapat ditambahkan pada sampel.

## 2.5 Validasi Metode Analisis

Validasi metode analisis merupakan suatu tindakan penilaian terhadap parameter tertentu, berdasarkan percobaan laboratorium untuk membuktikan bahwa parameter tersebut memenuhi persyaratan untuk penggunaannya (Harmita, 2006).

Validasi metode analisis yang dilakukan dalam matriks biologi biasanya disebut sebagai validasi metode bioanalisis. Validasi metode bioanalisis ini digunakan pada studi farmakologi klinis, pengujian bioavailabilitas (BA) dan bioekuivalensi (BE), serta uji farmakokinetika (PK). Metode analisis yang selektif dan sensitif untuk evaluasi obat dan metabolitnya (analit) secara kuantitatif sangat berpengaruh terhadap kesuksesan studi farmakologi pre-klinik dan klinik. Parameter-parameter penting dalam validasi metode bioanalisis adalah akurasi, presisi, selektivitas, sensitivitas, reproduisibilitas, dan stabilitas (Food and Drug Administration, Guidance for Industry: Bioanalytical Method Validation, 2001).

Pada validasi metode bioanalisis terdapat tiga tipe dan tingkatan validasi, yaitu (Food and Drug Administration, Guidance for Industry: Bioanalytical Method Validation, 2001; Harmita, 2006):

1. Validasi lengkap (*full validation*)

Validasi lengkap ini sangat penting apabila ingin mengembangkan metode dan mengimplementasikan metode bioanalisis untuk pertama kalinya. Validasi ini penting untuk obat baru dan untuk penentuan metabolitnya.

2. Validasi parsial (*partial validation*)

Validasi parsial merupakan modifikasi dari metode bioanalisis yang sudah divalidasi. Ada beberapa tipe metode analisis yang termasuk dalam validasi parsial antara lain :

- a. Metode bioanalisis yang ditransfer antar laboratorium atau analisis
- b. Adanya perubahan pada metode analisis (misalnya ada perubahan pada sistem deteksi)
- c. Perubahan antikoagulan

- d. Perubahan matriks pada spesies yang sama (misalnya plasma manusia diganti urin)
- e. Perubahan prosedur saat memproses sampel
- f. Perubahan spesies pada matriks yang sama (misalnya plasma mencit diganti plasma tikus)
- g. Perubahan rentang konsentrasi
- h. Perubahan instrument atau *platform software*
- i. Volume sampel terbatas
- j. Matriksnya jarang

### 3. Validasi silang (*cross validation*)

Validasi silang dilakukan dengan membandingkan parameter-parameter validasi apabila digunakan dua atau lebih metode bioanalisis untuk mendapatkan data pada studi yang sama atau pada studi yang berbeda. Pada validasi ini digunakan metode validasi yang original sebagai pembanding dan metode bioanalisis lainnya sebagai komparator.

Analisis obat dan metabolitnya dalam matriks biologi memerlukan standar acuan (*reference standard*) dan sampel yang digunakan sebagai *quality control* (QC). Kemurnian standar acuan yang dipakai dapat mempengaruhi data yang diperoleh. Standar acuan yang digunakan sebaiknya identik dengan analit, apabila tidak, bisa digunakan basa bebas atau asamnya, maka dapat digunakan garam atau ester dengan kemurnian yang diketahui. Standar acuan dapat berupa baku dalam dan baku luar. Ada tiga macam standar acuan, antara lain:

1. Standar acuan yang mempunyai sertifikat (misalnya USP standar)
2. Standar acuan yang dijual secara komersil dari sumber yang dapat dipercaya.
3. Standar acuan yang disintesis oleh laboratorium analit atau institusi non komersial lainnya.

Parameter penting untuk validasi metode bioanalisis meliputi akurasi, presisi, selektivitas, sensitivitas, reproduibilitas, dan stabilitas. Stabilitas analit

pada sampel plasma juga perlu ditentukan. Pengembangan metode bioanalisis meliputi evaluasi selektivitas, akurasi, presisi, uji perolehan kembali (*% recovery*), kurva kalibrasi, dan stabilitas.

### 1. Selektivitas

Selektivitas merupakan kemampuan metode analisis untuk membedakan dan mengukur kadar analit dengan adanya komponen-komponen lain dalam sampel (cairan biologis). Pada uji selektivitas pengukuran dilakukan pada 6 blanko plasma manusia yang berbeda. Setiap sampel blanko sebaiknya diuji terhadap adanya gangguan dan selektivitas pada *lower limit of quantification* (LLOQ).

### 2. Akurasi

Akurasi menggambarkan kedekatan hasil pengujian dengan kadar sebenarnya. Akurasi dilakukan pada sampel yang mengandung jumlah analit yang diketahui. Akurasi dilakukan minimal 5 replikat untuk tiap kadar yaitu pada konsentrasi rendah, sedang, dan tinggi. Pengukurannya dapat dilakukan *intra assay* (dalam satu kali analisis) dan *inter assay* (dilakukan analisis selama 5 hari). Pengukuran akurasi memenuhi syarat jika nilai % diff tidak menyimpang  $\pm 15\%$ , kecuali jika pengukuran dilakukan pada kadar LLOQ maka tidak boleh menyimpang  $\pm 20\%$ .

### 3. Presisi

Presisi menggambarkan kedekatan antara hasil pengujian yang satu dengan hasil pengujian lainnya. Pada pengukuran presisi dilakukan minimal 5 replikat untuk tiap kadar yaitu pada konsentrasi rendah, sedang, dan tinggi. Pengukurannya dapat dilakukan *intra assay* (dalam satu kali analisis) dan *inter assay* (dilakukan analisis selama 5 hari). Penentuan presisi pada tiap konsentrasi memenuhi syarat jika koefisien variasi (KV) tidak menyimpang  $\pm 15\%$ , kecuali jika pengukuran dilakukan pada kadar LLOQ maka tidak boleh menyimpang  $\pm 20\%$ .

#### 4. Uji perolehan kembali (*% recovery*)

Uji perolehan kembali (*% recovery*) merupakan perbandingan respon detektor analit yang diekstraksi dari sampel biologis dengan respon detektor kadar yang sebenarnya dari standar murni. Perolehan kembali dari analit tidak perlu 100% tetapi perolehan kembali dari analit dan baku dalam harus konsisten, presisi, dan reproduibel. Uji perolehan kembali dilakukan dengan membandingkan hasil analisis dari sampel yang diekstraksi pada tiga konsentrasi (konsentrasi rendah, sedang, dan tinggi) dan standar yang tidak diekstraksi di mana uji perolehan kembalinya 100%. Penentuan uji perolehan kembali (*% recovery*) pada tiap konsentrasi memenuhi syarat jika *% recovery* berkisar antara 80-120%.

#### 5. Kurva kalibrasi

Kurva kalibrasi merupakan hubungan antara respon instrumen dengan konsentrasi analit yang diketahui. Kurva kalibrasi harus terdiri dari 1 sampel blanko (matiks tanpa baku dalam), 1 sampel zero (matriks dengan baku dalam) dan 6-8 sampel yang mencakup kisaran konsentrasi pengukuran (termasuk konsentrasi pada LLOQ). Standar terendah dari kurva kalibrasi yang dapat diterima sebagai LLOQ jika memenuhi kondisi sebagai berikut :

- a. Respon analit pada LLOQ sedikitnya lima kali respon blanko.
- b. Respon analit (puncak analit) dapat diidentifikasi, terpisah, dan reproduibel dengan koefisien variasi 20% dan akurasi 80-120%.

#### 6. Linearitas dan rentang

Linearitas suatu metode bioanalisis harus diuji untuk mengetahui adanya hubungan yang linear antara kadar zat dengan respon detektor. Linearitas diperoleh dari koefisien korelasi ( $r$ ) pada analisis regresi linear yang didapat dari kurva kalibrasi. Dengan dilakukan uji ini, maka dapat diketahui batas-batas konsentrasi dari analit yang memberikan respon detektor yang linear. Analisis harus dilakukan pada konsentrasi yang termasuk batas-batas linear dari konsentrasi yang telah dilakukan. Rentang metode adalah pernyataan konsentrasi

terendah dan tertinggi analit yang dianalisis memberikan kecermatan, keseksamaan, dan linearitas yang dapat diterima.

#### 7. Batas kuantitasi (LOQ)

Batas kuantitasi adalah analit terkecil yang dapat ditentukan dengan ketelitian dan akurasi tertentu. Batas kuantitasi dihitung secara statistik melalui garis regresi linear dan kurva kalibrasi. Nilai pengukuran akan sama dengan nilai b pada persamaan garis linear  $y = a + bx$ , sedangkan simpangan baku blanko sama dengan simpangan baku residual ( $Sy/x$ ) dan rumus yang dapat digunakan yaitu :

$$LOQ = \frac{10 \frac{Sy}{x}}{S1}$$

$Sy/x$  = Simpangan baku respons analisis dari blanko

$S1$  = Arah garis linear (kepekaan arah) dari kurva antara respon terhadap konsentrasi = slope (b pada persamaan garis  $y = a + bx$ ) (Harmita, 2004)

#### 8. Stabilitas

Berbagai kondisi seperti panas, cahaya, kelembaban, dan pH yang berbeda, kandungan kimia dari obat, matriks serta wadah penyimpanan dapat mempengaruhi kestabilan obat. Sehingga obat yang ada dalam matriks biologis dapat terurai sewaktu penyimpanan dan tidak dapat terdeteksi sewaktu sampel dianalisis. Untuk menentukan stabilitas obat dalam matriks biologis maka digunakan beberapa sampel yang dipersiapkan dari larutan induk analit yang dibuat segar dan analit dalam matriks biologi. Penentuan stabilitas obat dalam matriks biologi dapat dilakukan dengan lima cara antara lain:

##### a. Stabilitas *freeze* dan *thaw*

Stabilitas sebaiknya ditentukan setelah tiga siklus pembekuan/pencairan. Pengujian dilakukan paling sedikit pada tiga konsentrasi sampel uji (konsentrasi rendah, sedang, dan tinggi) dalam plasma, kemudian disimpan pada temperatur yang diharapkan selama 24 jam dan pada temperatur kamar. Jika analit tidak stabil selama penyimpanan pada temperatur yang diharapkan, maka sampel sebaiknya disimpan pada temperatur  $-20^{\circ}\text{C}$  selama tiga siklus *freeze* dan *thaw*.

b. Stabilitas temperatur jangka pendek

Pengujian dilakukan dengan menggunakan tiga konsentrasi sampel uji (konsentrasi rendah, sedang, dan tinggi) dalam plasma, kemudian disimpan pada temperatur kamar selama 4 sampai 24 jam.

c. Stabilitas jangka panjang

Pada stabilitas jangka panjang, pengujian dilakukan dengan menggunakan tiga konsentrasi sampel uji (konsentrasi rendah, sedang, dan tinggi) dalam plasma. Pengujian dilakukan pada waktu mulai sampel dikumpulkan sampai tanggal terakhir sampel dianalisis yaitu dilakukan misalnya selama 0, 20, 60, dan 90 hari. Selama periode uji stabilitas, larutan uji disimpan pada lemari pendingin ( $-20^{\circ}\text{C}$ ). Konsentrasi analit diukur setelah rentang waktu penyimpanan tersebut.

d. Stabilitas larutan stok

Uji stabilitas larutan stok dilakukan dengan pengujian menggunakan larutan stok obat dan baku selama 6 jam pertama pada temperatur kamar dan untuk hari ke 20 pada penyimpanan di lemari pendingin.

e. Stabilitas *post-preparative*

Stabilitas *post-preparative* yaitu stabilitas selama analit berada dalam autosampler.

## 2.6 Metode Analisis Risperidon

Terdapat beberapa studi yang berkaitan dengan metode analisis risperidon dalam plasma yang sudah dipublikasikan diantaranya yaitu:

1. Studi bioekivalensi risperidon generik (Iperdal<sup>®</sup>) pada relawan pria Thailand sehat (Mahatthanatrakul, Tharinee, Sriwiryajan, Ridditid, & Wongnawa, 2008).

Kondisi:

Metode analisis menggunakan KCKT detektor UV dengan panjang gelombang 278 nm. Menggunakan kolom RP Symmetry C18 (4,6 mm x 250

mm, ukuran partikel 5  $\mu\text{m}$ ). Fase gerak yang digunakan adalah campuran kalium dihidrogen fosfat 0,05 M – asetonitril (68 : 32, v/v) yang diatur hingga pH 3,8 menggunakan asam fosfat 25% dengan laju alir 1,0 mL/menit. Baku dalam yang digunakan adalah klozapin. Kurva kalibrasi linear pada rentang 5-100 ng/mL ( $r = 0,999$ ).

2. Penetapan kadar risperidon dan 9-hidroksirisperidon dalam plasma manusia menggunakan kromatografi cair: aplikasi untuk evaluasi interaksi obat CYP2D6 (LLerena, et al., 2003).

Kondisi:

Metode analisis menggunakan KCKT detektor UV dengan panjang gelombang 278 nm. Menggunakan kolom Hypersil ODS (150 mm x 4,6 mm i.d., 3  $\mu\text{m}$ ). Fase gerak yang digunakan adalah campuran asetonitril (28%), air (72%), 5,44 g/L  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (40 mM) dan 400  $\mu\text{L}$  dimetiloktilamin (DMOA) dengan laju alir 0,8 mL/menit. Baku dalam yang digunakan adalah metilrisperidon. Kurva kalibrasi linear pada rentang 10-160 nmol/L ( $r = 0,99$ ).

3. Validasi metode analisis risperidon dan 9-hidroksirisperidon dalam plasma manusia menggunakan kromatografi cair-spektrometri massa tandem (Remmerie, et al., 2003).

Kondisi:

Metode analisis menggunakan kromatografi cair-spektrometri massa tandem. Menggunakan kolom 3- $\mu\text{m}$  C18 BDS-Hypersil (100 mm x 4,6 mm I.D.). Fase gerak yang digunakan adalah campuran amonium format 0,01 M (diatur pH 4,0 menggunakan asam format) - asetonitril (67% : 33%) dengan laju alir 0,8 mL/menit. Baku dalam yang digunakan adalah desfluororisperidon. Kurva kalibrasi linear pada rentang 0,1-250 ng/mL.

4. Penetapan kadar risperidon dalam plasma manusia secara cepat menggunakan kromatografi cair kinerja tinggi (Foroutan, Zarghi, Shafaati, & Khoddam, 2006).

Kondisi:

Metode analisis menggunakan KCKT detektor UV dengan panjang gelombang 280 nm. Menggunakan kolom Nucleosil C<sub>8</sub> (150 x 4 mm). Fase gerak yang digunakan adalah campuran natrium dihidrogen fosfat – asetonitril (55 : 45, v/v) yang diatur hingga pH 6,0 dengan laju alir 1,5 mL/menit. Baku dalam yang digunakan adalah diltiazem. Kurva kalibrasi linear pada rentang 2-50 ng/mL ( $r = 0,995$ ).

5. Penetapan kadar risperidon dan metabolit utama 9-hidroksirisperidon pada plasma manusia menggunakan kromatografi cair fase terbalik dengan detektor UV (Avenoso, Facciola, Salemi, & Spina, 2000).

Kondisi:

Metode analisis menggunakan KCKT detektor UV dengan panjang gelombang 278 nm. Menggunakan kolom C18 BDS-Hypersil (3  $\mu$ m, 100 x 4,6 mm I.D.). Fase gerak yang digunakan adalah campuran dapar fosfat (0,05 M, pH 3,7 diatur menggunakan asam fosfat 25%) – asetonitril (70 : 30, v/v) dengan laju alir 1,0 mL/menit. Baku dalam yang digunakan adalah klozapin. Kurva kalibrasi linear pada rentang 5-100 ng/mL ( $r = 0,998$ ).

6. Kromatografi cair kinerja tinggi sederhana untuk analisis risperidon dan 9-hidroksirisperidon dalam serum pasien yang digunakan bersama obat psikotropik lain (Olesen & Linnet, 1997).

Kondisi:

Metode analisis menggunakan KCKT detektor UV pada panjang gelombang 280 nm. Menggunakan kolom LichChroCart (250 x 4,6 mm, Merck). Fase gerak yang digunakan adalah dapar ammonium asetat 40 mM pH 7,0-metanol (100:900, v/v) dengan laju alir 1,0 mL/menit. Baku dalam yang digunakan adalah haloperidol. Kurva kalibrasi linear pada rentang 0-400 ng/mL ( $r = 0,999$ .)

7. Analisis risperidon dan 9-hidroksirisperidon dalam plasma manusia menggunakan kromatografi cair kinerja tinggi dengan detektor elektrokimia (Moing, Edouard, & Levron, 1993).

Kondisi:

Metode analisis menggunakan KCKT dengan detektor elektrokimia. Menggunakan kolom *Ultrasphere* (5  $\mu\text{m}$ , 250 x 4,6 mm). Fase gerak asetonitril-kalium dihidrogenfosfat 0,05 M pH 6,5 (diatur dengan ammonia 28%) (60:40, v/v) dengan laju alir 1 mL/menit. Baku dalam yang digunakan adalah metilrisperidon. Kurva linear pada rentang 2-100 ng/mL ( $r = 0,9997$ ).

8. Metode kromatografi cair kinerja tinggi sederhana untuk analisis risperidon dan 9-hidroksirisperidon dalam plasma setelah overdosis (Titier, D ridet, Cardone, Abouelfath, & Moore, 2002).

Kondisi:

Metode analisis menggunakan KCKT detektor UV dengan panjang gelombang 280 nm. Menggunakan kolom Novapack C<sub>18</sub> (Waters) (15 cm x 3,9 mm; ukuran partikel 5  $\mu\text{m}$ ). Fase gerak yang digunakan asetonitril-dapar fosfat 0,1 M pH 3,8 (68:32, v/v) dengan laju alir 1 mL/menit. Baku dalam yang digunakan adalah metilrisperidon. Kurva linear pada rentang 10-200 ng/mL ( $r^2 = 0,97$ ).

## BAB 3

### METODE PENELITIAN

#### 3.1 Lokasi

Laboratorium Bioavailabilitas dan Bioekivalensi, Departemen Farmasi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Indonesia.

#### 3.2 Alat

Alat yang digunakan adalah kromatografi cair kinerja tinggi model Alliance Waters 2695 Separations Module (Waters), sistem integrasi menggunakan perangkat lunak Empower Pro, dilengkapi dengan detektor *Photodiode Array* Waters 2996 (Waters), kolom LiChrospher® 100 RP-18 e (5 µm, Merck) dengan panjang kolom 250 x 4 µm, sentrifugator (DSC-300SD), *vortex* (Maxi Mix II-Barnstead), *shaker* (JANKE & KUNKEL IKA Labortechnik KS 501 D), pipet mikro (Socorex Acura 825), *ultrasonic* (Elma S40H Elmasonic), tabung sentrifus, *blue tip*, *yellow tip*, timbangan analitik (Analytical Balance AND GR-202), pH meter (Eutech Instruments pH 510), alat-alat gelas.

#### 3.3 Bahan

Risperidon (Aurobindo Pharma Ltd), klozapin (Taizhou Xingming Pharmaceutical Co., Ltd), asetonitril pro HPLC (Merck), methanol pro HPLC (Merck), aquabidest (PT. Ikapharmindo Putramas Pharmaceutical Laboratories), kalium dihidrogen fosfat (Merck), asam fosfat 85% (Merck), trietilamin (Merck), natrium hidroksida (Merck), dietileter (Merck), isoamilalkohol (Merck), dan plasma darah (PMI).

### 3.4 Cara Kerja

#### 3.4.1 Pembuatan Larutan

##### 3.4.1.1 Pembuatan Larutan Induk Risperidon dan Larutan Uji

Ditimbang secara seksama lebih kurang 10,0 mg risperidon, kemudian dimasukkan ke dalam labu takar 25,0 mL dan dilarutkan dengan HCl 0,1 N sampai tanda batas labu ukur. Diperoleh konsentrasi larutan risperidon lebih kurang 0,4 mg/mL ( $400 \mu\text{g/mL} = 400 \text{ ppm}$ ). Lakukan pengenceran untuk mendapatkan larutan dengan konsentrasi tertentu.

##### 3.4.1.2 Pembuatan Larutan Induk Klozapin dan Larutan Uji

Ditimbang secara seksama lebih kurang 10,0 mg klozapin, kemudian dimasukkan ke dalam labu takar 25,0 mL dan dilarutkan dengan metanol sampai tanda batas labu ukur. Diperoleh konsentrasi larutan risperidon lebih kurang 0,4 mg/mL ( $400 \mu\text{g/mL} = 400 \text{ ppm}$ ). Lakukan pengenceran untuk mendapatkan larutan dengan konsentrasi tertentu.

##### 3.4.1.3 Pembuatan Larutan Dapar Kalium Dihidrogen Fosfat 50 mM yang Mengandung 0,1% Trietilamin pH 3,8

Ditimbang secara seksama lebih kurang 6,8045 gram kalium dihidrogen fosfat kemudian dilarutkan dengan air bebas karbondioksida hingga 1000,0 mL, kemudian ditambahkan trietilamin dan diatur pH larutan dengan menggunakan asam fosfat hingga pH larutan 3,8.

##### 3.4.1.4 Pembuatan Larutan Natrium Hidroksida 2 M

Ditimbang secara seksama lebih kurang 8 gram natrium hidroksida kemudian dilarutkan dengan air bebas karbondioksida hingga 100,0 mL.

#### 3.4.1.5 Pembuatan Larutan Dietileter-isoamilalkohol (99:1)

Dicampur 99 mL dietileter dengan 1 mL isoamilalkohol.

#### 3.4.1.6 Pembuatan Larutan Kalium Dihidrogen Fosfat 0,1M pH 2,2

Ditimbang secara seksama lebih kurang 1,3609 gram kalium dihidrogen fosfat kemudian dilarutkan dengan air bebas karbondioksida hingga 100,0 mL, kemudian ditambahkan asam fosfat hingga pH larutan 2,2.

### 3.4.2 Pencarian Kondisi Analisis Optimum Risperidon dalam Plasma *In Vitro*

#### 3.4.2.1 Pemilihan Baku Dalam untuk Analisis Risperidon dalam Plasma

Sebanyak 1,0 mL plasma yang mengandung risperidon dengan konsentrasi tertentu dimasukkan ke dalam tabung sentrifus, kemudian ditambahkan 20,0  $\mu$ L baku dalam (diazepam 500  $\mu$ g/mL, cilostazol 400  $\mu$ g/mL, atau klozapin 10,0  $\mu$ g/mL). Setelah itu, ditambahkan 1,0 mL natrium hidroksida 2 M dan 3,0 mL dietileter-isoamilalkohol (99:1), lalu tabung dikocok dengan menggunakan *shaker* selama 10 menit dan disentrifugasi selama 10 menit dengan kecepatan 3000 rpm. Ambil 2,0 mL fase organik, kemudian dimasukkan ke dalam tabung sentrifus yang berisi 150,0  $\mu$ L larutan kalium dihidrogen fosfat 0,1 M pH 2,2. Setelah itu, tabung dikocok dengan menggunakan *vortex* selama 2 menit, lalu disentrifugasi selama 5 menit dengan kecepatan 3000 rpm. Buang fase organik dan ambil fase air. Sebanyak 100,0  $\mu$ L fase air disuntikkan ke alat KCKT dengan fase gerak asetronitril – dapar kalium dihidrogen fosfat 50 mM yang mengandung 0,1% trietilamin pH 3,8 (32 : 68) dan kecepatan alir 1,0 mL/menit

### 3.4.2.2 Pemilihan Komposisi Fase Gerak untuk Analisis Risperidon secara KCKT

Larutan induk risperidon dilarutkan dan diencerkan dengan HCl 0,1 N sedangkan klozapin dilarutkan dan diencerkan dengan metanol hingga diperoleh konsentrasi lebih kurang 10,0 ppm, kemudian masing-masing larutan standar dan campuran larutan standar disuntikkan sebanyak 20,0  $\mu$ L ke alat KCKT dengan komposisi fase gerak sebagai berikut :

- 1) Asetonitril – dapar kalium dihidrogen fosfat 50 mM yang mengandung 0,1% trietilamin pH 3,8 (32 : 68)
- 2) Asetonitril – dapar kalium dihidrogen fosfat 50 mM yang mengandung 0,1% trietilamin pH 3,8 (30 : 70)
- 3) Asetonitril – dapar kalium dihidrogen fosfat 50 mM yang mengandung 0,1% trietilamin pH 3,8 (28 : 72)
- 4) Asetonitril – dapar kalium dihidrogen fosfat 50 mM yang mengandung 0,1% trietilamin pH 3,8 (40 : 60)

Kecepatan alir yang digunakan adalah 1,0 mL/menit dan dideteksi pada panjang gelombang 278 nm. Kemudian dicatat waktu retensi ( $t_R$ ), dihitung faktor ikutan ( $T_f$ ), jumlah lempeng teoritis (N), dan HETP.

### 3.4.2.3 Pemilihan Kecepatan Aliran Fase Gerak untuk Analisis Risperidon

Larutan induk risperidon dilarutkan dan diencerkan dengan HCl 0,1 N sedangkan klozapin dilarutkan dan diencerkan dengan metanol hingga diperoleh konsentrasi lebih kurang 10,0 ppm, kemudian masing-masing larutan standar dan campuran larutan standar disuntikkan sebanyak 20,0  $\mu$ L ke alat KCKT dengan fase gerak terpilih dengan variasi kecepatan alir 0,8 dan 1,0 mL/menit. Kemudian dicatat waktu retensi ( $t_R$ ), dihitung faktor ikutan ( $T_f$ ), jumlah lempeng teoritis (N), dan HETP.

#### 3.4.2.4 Uji Kesesuaian Sistem

Larutan campuran risperidon dengan konsentrasi 10,0 ppm dan klozapin dengan konsentrasi 10,0 ppm disuntikkan sebanyak 20,0  $\mu\text{L}$  ke alat KCKT dengan fase gerak dan kecepatan alir terpilih. Kemudian dicatat waktu retensi ( $t_R$ ), dihitung faktor ikutan ( $T_f$ ), jumlah lempeng teoritis ( $N$ ), HETP, dan presisi pada lima kali penyuntikan.

#### 3.4.3 Validasi Metode Bioanalisis Risperidon dalam Plasma *In Vitro*

##### 3.4.3.1 Penyiapan Sampel Risperidon dalam Plasma

Sebanyak 1,0 mL plasma yang mengandung risperidon dengan konsentrasi tertentu dimasukkan ke dalam tabung sentrifus, kemudian ditambahkan 20,0  $\mu\text{L}$  baku dalam (klozapin 10,0  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ). Setelah itu, ditambahkan 1,0 mL natrium hidroksida 2 M dan 3,0 mL dietileter-isoamilalkohol (99:1), lalu tabung dikocok dengan menggunakan *shaker* selama 10 menit dan disentrifugasi selama 10 menit dengan kecepatan 3000 rpm. Ambil 2,0 mL fase organik, kemudian dimasukkan ke dalam tabung sentrifus yang berisi 150,0  $\mu\text{L}$  larutan kalium dihidrogen fosfat 0,1 M pH 2,2. Setelah itu, tabung dikocok dengan menggunakan *vortex* selama 2 menit, lalu disentrifugasi selama 5 menit dengan kecepatan 3000 rpm. Buang fase organik dan ambil fase air. Sebanyak 100,0  $\mu\text{L}$  fase air disuntikkan ke alat KCKT dengan fase gerak dan kecepatan alir terpilih.

##### 3.4.3.2 Pembuatan Kurva Kalibrasi

Dibuat 1 sampel blanko (plasma tanpa baku dalam), 1 sampel zero (plasma dengan baku dalam), dan larutan risperidon dalam plasma dengan konsentrasi lebih kurang 5,11; 10,22; 20,44; 51,09; 102,18 dan 204,36 ng/mL dengan penambahan 20,0  $\mu\text{L}$  baku dalam (klozapin 10,0  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ). Kemudian diekstraksi seperti cara penyiapan sampel. Sebanyak 100,0  $\mu\text{L}$  masing-masing larutan disuntikkan ke alat KCKT dengan fase gerak dan kecepatan alir terpilih. Dari data

pengukuran dibuat kurva kalibrasi dengan menggunakan persamaan garis regresi linear ( $y = a + bx$ ), dimana  $x$  adalah konsentrasi risperidon dan  $y$  adalah perbandingan luas puncak risperidon dan baku dalam.

#### 3.4.3.3 Uji Linearitas

Dari data pengukuran pada pembuatan kurva kalibrasi, kemudian dianalisis dengan regresi luas puncak terhadap konsentrasi risperidon dalam plasma dan diperoleh koefisien korelasi ( $r$ ) yang menunjukkan linearitasnya.

#### 3.4.3.4 Batas Kuantitasi Terendah (LLOQ)

Dibuat larutan risperidon dalam plasma dengan konsentrasi lebih kurang 5,14 dan 2,57 ng/mL dengan penambahan 20,0  $\mu$ L baku dalam (klozapin 10,0  $\mu$ g/mL). Kemudian diekstraksi seperti cara penyiapan sampel. Sebanyak 100,0  $\mu$ L masing-masing larutan disuntikkan ke alat KCKT dengan fase gerak dan kecepatan alir terpilih sebanyak lima kali pada masing-masing konsentrasi. Dari data pengukuran kemudian dihitung nilai % *diff* dan koefisien variasinya (KV). LLOQ adalah kondisi terendah yang menunjukkan akurasi (nilai % *diff*) tidak menyimpang dari -20% dan +20%, serta presisi (koefisien variasi) tidak kurang dari 20%.

#### 3.4.3.5 Uji Presisi

Dibuat larutan risperidon dalam plasma dengan konsentrasi 20,56; 92,50; dan 164,44 ng/mL dengan penambahan 20,0  $\mu$ L baku dalam (klozapin 10,0  $\mu$ g/mL). Kemudian diekstraksi seperti cara penyiapan sampel. Sebanyak 100,0  $\mu$ L masing-masing larutan disuntikkan ke alat KCKT dengan fase gerak dan kecepatan alir terpilih, diulang sebanyak lima kali untuk masing-masing konsentrasi dan dilakukan selama 3 hari berturut-turut (presisi *intra-day* dan *inter-day*). Presisi dihitung sebagai nilai simpangan baku relatif atau koefisien variasi dari masing-masing konsentrasi.

#### 3.4.3.6 Uji Akurasi

Dibuat larutan risperidon dalam plasma dengan konsentrasi 20,56; 92,50; dan 164,44 ng/mL dengan penambahan 20,0  $\mu$ L baku dalam (klozapin 10,0  $\mu$ g/mL). Kemudian diekstraksi seperti cara penyiapan sampel. Sebanyak 100,0  $\mu$ L masing-masing larutan disuntikkan ke alat KCKT dengan fase gerak dan kecepatan alir terpilih, diulang sebanyak lima kali untuk masing-masing konsentrasi dan dilakukan selama 3 hari berturut-turut (presisi *intra-day* dan *inter-day*). Akurasi dihitung sebagai perbedaan nilai terukur dengan nilai yang sebenarnya (% *diff*).

#### 3.4.3.7 Uji Selektivitas

Dibuat konsentrasi LLOQ dengan menggunakan 6 blanko plasma manusia yang berbeda dengan penambahan 20,0  $\mu$ L baku dalam (klozapin 10,0  $\mu$ g/mL). Kemudian diekstraksi seperti cara penyiapan sampel. Sebanyak 100,0  $\mu$ L masing-masing larutan disuntikkan ke alat KCKT dengan fase gerak dan kecepatan alir terpilih. Diamati waktu retensinya dan ada tidaknya gangguan (interferensi) dari ekstrak plasma di sekitar waktu retensi tersebut, kemudian dihitung nilai koefisien variasi dan akurasinya (% *diff*).

#### 3.4.3.8 Uji Perolehan Kembali (% recovery)

Dibuat larutan risperidon dalam plasma dengan konsentrasi 20,56; 92,50; dan 164,44 ng/mL dengan penambahan 20,0  $\mu$ L baku dalam (klozapin 10,0  $\mu$ g/mL). Kemudian diekstraksi seperti cara penyiapan sampel. Sebanyak 100,0  $\mu$ L masing-masing larutan disuntikkan ke alat KCKT dengan fase gerak dan kecepatan alir terpilih, diulang sebanyak lima kali untuk masing-masing konsentrasi. Dihitung % *recovery*.

### 3.4.3.9 Uji Stabilitas

#### 1. Stabilitas Jangka pendek risperidon dalam plasma

Dibuat larutan risperidon dalam plasma dengan konsentrasi 20,56 dan 164,44 ng/mL dengan penambahan 20,0  $\mu$ L baku dalam (klozapin 10,0  $\mu$ g/mL). Masing-masing larutan disimpan pada temperatur kamar dengan rentang waktu 0 dan 6 jam. Kemudian diekstraksi seperti cara penyiapan sampel. Sebanyak 100,0  $\mu$ L masing-masing larutan disuntikkan ke alat KCKT dengan fase gerak dan kecepatan alir terpilih. Diamati adanya gejala ketidakstabilan zat dengan mengamati luas puncaknya dan menghitung % *diff*.

#### 2. Stabilitas Larutan Stok Risperidon

Dibuat larutan risperidon dengan konsentrasi 10,0  $\mu$ g/mL dan baku dalam (klozapin) dengan konsentrasi 10,0  $\mu$ g/mL. Kemudian larutan disimpan pada temperatur kamar dengan rentang waktu 0, 6, dan 24 jam. Sebagian larutan disimpan pada lemari pendingin (temperatur 4°C) dengan rentang waktu 0 dan 3 hari. Sebanyak 100,0  $\mu$ L masing-masing larutan disuntikkan ke alat KCKT dengan fase gerak dan kecepatan alir terpilih. Diamati adanya gejala ketidakstabilan zat dengan mengamati luas puncaknya dan menghitung % *diff*. % *diff* dihitung dengan cara membandingkan respon instrumen dari larutan stok yang telah disimpan terhadap larutan stok yang disiapkan sesaat sebelum disuntikkan.

#### 3) Stabilitas Post Preparatif

Dibuat larutan risperidon dalam plasma dengan konsentrasi 20,56 dan 164,44 ng/mL dengan penambahan 20,0  $\mu$ L baku dalam (klozapin 10,0  $\mu$ g/mL). Kemudian diekstraksi seperti cara penyiapan sampel. Sebanyak 100,0  $\mu$ L masing-masing larutan disuntikkan ke alat KCKT dengan fase gerak dan kecepatan alir terpilih. Sebagian disimpan dalam rak autosampler pada suhu kamar. Analisis dilakukan pada jam ke-0 dan 22. Ketidakstabilan zat diamati dengan menghitung nilai % *diff* dan mengamati bentuk masing-masing kromatogram.

## **BAB 4**

### **HASIL DAN PEMBAHASAN**

#### 4.1 Pencarian Kondisi Analisis Optimum Risperidon

##### 4.1.1 Pemilihan Baku Dalam untuk Analisis Risperidon dalam Plasma

Pada analisis risperidon dalam plasma digunakan tiga jenis baku dalam yaitu diazepam, cilostazol, dan klozapin dengan menggunakan fase gerak asetonitril-dapar kalium dihidrogen fosfat 50 mM yang mengandung 0,1% trietilamin pH 3,80 (32:68) dan kecepatan alir 1,0 mL/menit. Pada analisis menggunakan diazepam dan cilostazol sebagai baku dalam, diazepam dan cilostazol tidak terekstraksi, sedangkan pada analisis menggunakan klozapin sebagai baku dalam diperoleh waktu retensi 7,060 menit dengan nilai resolusi 6,7386 dan puncak klozapin terpisah dari puncak plasma. Dari percobaan dipilih klozapin sebagai baku dalam karena terekstraksi dengan baik dan nilai resolusinya besar dengan waktu retensi 7,060 menit dan puncaknya terpisah dari puncak plasma. Kromatogram ekstrak plasma yang mengandung risperidon konsentrasi 100,0 ng/mL dan baku dalam klozapin konsentrasi 10 µg/mL dapat dilihat pada Gambar 4.1.

Baku dalam digunakan untuk mengurangi kesalahan selama proses analisis, khususnya kesalahan saat melakukan ekstraksi obat dari plasma dan kesalahan dalam volume suntikan, yang akan mempengaruhi luas puncak yang dihasilkan. Caranya adalah dengan menambahkan senyawa baku yang diketahui jumlahnya pada senyawa uji, kemudian campuran itu dibuat untuk disuntikkan ke KCKT dan dianalisis pada kondisi terpilih. Untuk pekerjaan kuantitatif yang baik diperlukan resolusi 1,5 atau lebih besar (Harmita, 2006). Pertimbangan lain adalah puncak plasma tidak boleh mengganggu puncak dari baku dalam.

#### 4.1.2 Pemilihan Komposisi Fase Gerak untuk Analisis Risperidon

Berdasarkan literatur acuan (Mahatthanatrakul, Tharinee, Sriwiryajan, Ridditid, & Wongnawa, 2008) dilakukan analisis risperidon dengan komposisi fase gerak asetonitril-dapar kalium dihidrogen fosfat 50 mM yang mengandung 0,1% trietilamin pH 3,80 (32:68), lalu divariasikan dengan perbandingan (30:70), (28:72), dan (40:60) masing-masing dengan kecepatan alir 1,0 mL/menit. Pada fase gerak asetonitril-dapar kalium dihidrogen fosfat 50 mM yang mengandung 0,1% trietilamin pH 3,80 (32:68) diperoleh waktu retensi 4,582 menit, dengan jumlah lempeng teoritis (N) 5656,484; nilai HETP  $4,4197 \times 10^{-3}$  dan faktor ikutan 1,4839. Pada fase gerak asetonitril-dapar kalium dihidrogen fosfat 50 mM yang mengandung 0,1% trietilamin pH 3,80 (30:70) diperoleh waktu retensi 5,660 menit, dengan jumlah lempeng teoritis (N) 5178,399; nilai HETP  $4,8277 \times 10^{-3}$  dan faktor ikutan 1,4149. Pada fase gerak asetonitril-dapar kalium dihidrogen fosfat 50 mM yang mengandung 0,1% trietilamin pH 3,80 (28:72) diperoleh waktu retensi 6,397 menit, dengan jumlah lempeng teoritis (N) 5211,269; nilai HETP  $4,7973 \times 10^{-3}$  dan faktor ikutan 1,3977. Pada fase gerak asetonitril-dapar kalium dihidrogen fosfat 50 mM yang mengandung 0,1% trietilamin pH 3,80 (40:60) diperoleh waktu retensi 3,681 menit, dengan jumlah lempeng teoritis (N) 5691,127; nilai HETP  $4,3928 \times 10^{-3}$  dan faktor ikutan 1,5258. Data lebih lengkap dapat dilihat pada Tabel 4.1.

Pada penelitian ini dipilih fase gerak asetonitril-dapar kalium dihidrogen fosfat yang mengandung 0,1% trietilamin karena dengan menggunakan dapar dapat mempertahankan pH sehingga analit tetap berada dalam bentuk molekul. Berdasarkan literatur, konsentrasi dapar yang digunakan adalah 50 mM. Konsentrasi tersebut adalah wajar karena jika konsentrasinya lebih besar akan berisiko adanya pengendapan garam sehingga dapat menyumbat kolom, mempengaruhi tekanan, efisiensi, dan bentuk puncak kromatogram. Trietilamin digunakan untuk memperbaiki bentuk puncak kromatogram. Dari hasil percobaan dipilih komposisi fase gerak asetonitril-dapar kalium dihidrogen fosfat 50 mM yang mengandung 0,1% trietilamin pH 3,8 (40:60) karena memberikan waktu retensi yang singkat (3,681 menit), jumlah lempeng teoritis yang besar, nilai

HETP yang kecil, faktor ikutan mendekati satu (simetris), dan dengan kondisi fase gerak ini pada kromatogram plasma blanko tidak ada puncak yang mengganggu pada waktu retensi risperidon.

#### 4.1.3 Pemilihan Kecepatan Alir untuk Analisis Risperidon

Pada kondisi fase gerak asetonitril-dapar kalium dihidrogen fosfat 50 mM yang mengandung 0,1% trietilamin pH 3,8 (40:60) dengan kecepatan alir 1,0 mL/menit diperoleh waktu retensi 3,681 menit, dengan jumlah lempeng teoritis (N) 5691,127, nilai HETP  $4,3928 \times 10^{-3}$  dan faktor ikutan 1,5258. Kemudian, kecepatan alirnya diubah menjadi 0,8 mL/menit dan diperoleh waktu retensi 3,871 menit, dengan jumlah lempeng teoritis (N) 5666,049, nilai HETP  $4,4122 \times 10^{-3}$  dan faktor ikutan 1,5791. Berdasarkan percobaan, dipilih kecepatan alir 0,8 mL/menit karena jumlah lempeng teoritisnya besar dan waktu retensinya cukup jauh untuk menghindari puncak-puncak pengganggu yang berasal dari plasma. Kromatogram campuran larutan standar risperidon dengan klozapin (baku dalam) pada kondisi terpilih dapat dilihat pada Gambar 4.2. Data lebih lengkap dapat dilihat pada Tabel 4.2.

#### 4.1.4 Uji Kesesuaian Sistem

Dari hasil analisis sebanyak 5 kali penyuntikan, diperoleh nilai koefisien variasi dari waktu retensi risperidon adalah sebesar 0,0347% dengan nilai HETP  $4,7973 \times 10^{-3}$ , jumlah lempeng teoritis (N) 5957,4364, dan faktor ikutan (Tf) 1,5883; serta nilai koefisien variasi dari PAR adalah sebesar 0,3445%. Data uji kesesuaian sistem dapat dilihat pada Tabel 4.3.

Uji kesesuaian sistem ini perlu dilakukan sebelum metode analisis terpilih dilaksanakan. Secara normal terdapat variasi dalam peralatan dan teknik analisis sehingga uji kesesuaian sistem perlu dilakukan untuk memastikan sistem operasional akhir adalah efektif dan memberikan hasil yang sesuai dengan tujuan analisis.

## 4.2 Validasi Metode Bioanalisis Risperidon dalam Plasma *In Vitro*

### 4.2.1 Penyiapan Sampel Risperidon dalam Plasma

Sebelum disuntikkan ke KCKT, risperidon perlu diekstraksi terlebih dahulu dari komponen plasma yang mengganggu, khususnya protein. Ekstraksi risperidon dari plasma dilakukan dengan cara ekstraksi cair-cair menggunakan campuran dietileter-isoamilalkohol (99:1). Pertama-tama, plasma yang mengandung risperidon dengan konsentrasi tertentu dan baku dalam (20,0  $\mu$ L klozapin 10,0  $\mu$ g/mL), ditambahkan natrium hidroksida 2 M sebanyak 1,0 mL. Hal ini bertujuan untuk mengubah risperidon menjadi bentuk molekulnya. Kemudian ditambahkan campuran dietileter-isoamilalkohol (99:1) sebanyak 3,0 mL dan dikocok menggunakan *shaker* selama 10 menit. Risperidon yang telah dalam bentuk molekul akan ditarik oleh campuran dietileter-isoamilalkohol (99:1). Setelah itu disentrifugasi selama 10 menit dengan kecepatan 3000 rpm, kemudian fase organik diambil dan ditambahkan ke tabung yang sudah berisi larutan  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  0,1 M pH 2,2. Kemudian dicampur menggunakan vorteks selama 2 menit, lalu disentrifugasi selama 5 menit dan buang fase organiknya. Selanjutnya fase air dianalisis menggunakan alat KCKT dengan kondisi analisis terpilih. Kromatogram plasma blanko dapat dilihat pada Gambar 4.3 dan kromatogram risperidon dengan penambahan klozapin (baku dalam) dalam plasma dapat dilihat pada Gambar 4.4.

### 4.2.2 Pembuatan Kurva Kalibrasi

Berdasarkan hasil perhitungan statistik regresi linear diperoleh persamaan garis kurva kalibrasi  $y = -0,0008 + 0,0038 x$  ; dimana x adalah konsentrasi risperidon dan y adalah perbandingan luas puncak risperidon dengan baku dalam. Kurva kalibrasi risperidon dalam plasma dapat dilihat pada Gambar 4.5. Data kurva kalibrasi dapat dilihat pada Tabel 4.4.

Kurva kalibrasi risperidon dalam plasma dibuat dengan rentang konsentrasi lebih kurang 5,11-204,36 ng/mL. Untuk analisis risperidon dalam plasma, kurva kalibrasi terdiri dari plasma blanko (plasma tanpa penambahan risperidon dan

baku dalam), plasma *zero* (plasma dengan penambahan baku dalam) dan 6 larutan risperidon dalam plasma dengan penambahan baku dalam. Dari hasil analisis, diperoleh persamaan regresi linier  $y = -0.0008 + 0,0038 x$ .

#### 4.2.3 Uji Linearitas

Linearitas didapat dari kurva kalibrasi risperidon dalam plasma. Linearitas risperidon dalam plasma dapat dilihat pada Gambar 4.5. Data hasil pengujian linearitas dapat dilihat pada Tabel 4.4.

Dari pembuatan kurva kalibrasi, diperoleh persamaan regresi linier  $y = -0.0008 + 0,0038 x$  dengan koefisien korelasi  $r = 0,9999$ . Maka dapat disimpulkan bahwa metode analisis risperidon dalam plasma dengan rentang konsentrasi lebih kurang 5,11-204,36 ng/mL memenuhi kriteria uji linearitas dan dapat diterima untuk suatu metode analisis yang *valid*.

#### 4.2.4 Batas Kuantitasi Terendah (LLOQ)

Pada pengukuran LLOQ, dibuat larutan risperidon dalam plasma dengan konsentrasi 5,14 dan 2,57 ng/mL. LLOQ yang diperoleh adalah 5,14 ng/mL. Data lebih lengkap dapat dilihat pada Tabel 4.5.

Dari data dapat dilihat bahwa % *diff* yang didapat dari konsentrasi 5,14 ng/mL ini memenuhi persyaratan yaitu tidak menyimpang lebih dari -20% dan +20%. Nilai % *diff* antara -3,62% sampai 11,05%.

#### 4.2.5 Uji Presisi

Pada uji presisi risperidon dalam plasma, konsentrasi rendah (20,56 ng/mL) pada hari pertama memberikan nilai koefisien variasi (KV) 2,97%, pada hari kedua sebesar 7,26%, dan pada hari ketiga sebesar 5,01%. Konsentrasi sedang (92,50 ng/mL) pada hari pertama memberikan nilai koefisien variasi (KV) 4,03%, pada hari kedua sebesar 7,49%, dan pada hari ketiga sebesar 3,08%. Konsentrasi tinggi (164,44 ng/mL) pada hari pertama memberikan nilai koefisien variasi (KV)

2,17%, pada hari kedua sebesar 6,00%, dan pada hari ketiga sebesar 4,54%. Pada uji *inter-day*, konsentrasi rendah memberikan nilai KV sebesar 13,39%, konsentrasi sedang memberikan nilai KV sebesar 6,40%, dan konsentrasi tinggi memberikan nilai KV sebesar 7,64%.

Dari hasil percobaan, uji keterulangan (presisi) yang telah dilakukan untuk analisis risperidon dalam plasma sudah memenuhi kriteria yang dipersyaratkan. Data yang diperoleh menunjukkan bahwa metode analisis memiliki keterulangan yang baik dari hari ke hari karena nilai koefisien variasi yang dihasilkan tidak lebih dari 15%. Data hasil uji presisi dapat dilihat pada Tabel 4.6-4.9.

#### 4.2.6 Uji Akurasi

Pada uji akurasi risperidon dalam plasma, konsentrasi rendah (20,56 ng/mL) pada hari pertama memberikan nilai % *diff* sebesar -13,46 sampai -7,32%, pada hari kedua sebesar -14,28 sampai 1,57%, dan pada hari ketiga sebesar -0,25 sampai 14,59%. Konsentrasi sedang (92,50 ng/mL) pada hari pertama memberikan nilai % *diff* sebesar -11,14 sampai -1,69%, pada hari kedua sebesar -14,64 sampai 1,19%, dan pada hari ketiga sebesar 2,50 sampai 8,79%. Konsentrasi tinggi (164,44 ng/mL) pada hari pertama memberikan nilai % *diff* sebesar -13,94 sampai -9,39%, pada hari kedua sebesar -14,64 sampai -2,18%, dan pada hari ketiga sebesar 3,54 sampai 13,54%. Data hasil uji akurasi dapat dilihat pada Tabel 4.6-4.9.

Dari hasil percobaan, uji akurasi yang telah dilakukan untuk analisis risperidon dalam plasma sudah memenuhi kriteria yang dipersyaratkan. Berdasarkan hasil perhitungan, untuk uji akurasi diperoleh % *diff* tidak menyimpang lebih dari -15% dan +15% untuk masing-masing konsentrasi selama satu hari (*intra-day*) dan nilai % *diff* dari tiap konsentrasi tidak berubah secara signifikan dari hari ke hari (*inter-day*).

#### 4.2.7 Uji Selektivitas

Dari hasil uji selektivitas yang dilakukan terhadap enam blanko plasma manusia yang berbeda pada konsentrasi LLOQ yaitu 5,14 ng/mL, diperoleh nilai koefisien variasinya (KV) 9,16% dan % *diff* antara -12,71% sampai 11,98% serta tidak ada gangguan dari senyawa lain atau komponen endogen plasma pada kromatogram. Data hasil uji selektivitas dapat dilihat pada Tabel 4.10.

Pada uji selektivitas, dilakukan analisis terhadap 6 plasma dari sumber yang berbeda pada konsentrasi LLOQ, yaitu 5,14 ng/mL. Berdasarkan perhitungan, nilai koefisien variasi yang diperoleh kurang dari 20% dan nilai % *diff* tidak menyimpang lebih dari -20% dan +20%, serta tidak ada gangguan senyawa lain atau komponen endogen plasma pada kromatogram sehingga dapat disimpulkan bahwa metode analisis yang digunakan memenuhi syarat uji selektivitas.

#### 4.2.8 Uji Perolehan Kembali (% *recovery*)

Dari uji perolehan kembali risperidon dalam plasma selama 3 hari berturut-turut, diperoleh % *recovery* untuk konsentrasi rendah (20,56 ng/mL) sebesar 85,72 sampai 114,59%, untuk konsentrasi sedang (92,50 ng/mL) sebesar 85,42 sampai 108,86%, dan untuk konsentrasi tinggi (164,44 ng/mL) sebesar 85,92 sampai 111,56%. Data hasil uji perolehan kembali dapat dilihat pada Tabel 4.11.

Untuk, secara keseluruhan nilai persen perolehan kembali berada dalam rentang 80-120%. Dari hasil tersebut dapat disimpulkan bahwa metode analisis yang digunakan memenuhi kriteria untuk uji akurasi, presisi, dan perolehan kembali

Dari hasil percobaan, nilai persen perolehan kembali yang telah dilakukan untuk analisis risperidon dalam plasma sudah memenuhi kriteria yang dipersyaratkan yaitu berada dalam rentang 80-120%.

#### 4.2.9 Uji Stabilitas

##### 1. Stabilitas Larutan Stok Risperidon

Pengujian dilakukan larutan stok risperidon dan klozapin dengan konsentrasi masing-masing 10,0 µg/mL. Hasil pengujian menunjukkan kestabilan larutan risperidon pada suhu kamar dalam rentang waktu 0, 6, dan 24 jam dan penyimpanan pada lemari pendingin (4°C) dalam rentang waktu 0 dan 3 hari. Hal ini ditunjukkan dari nilai % *diff* yang tidak menyimpang lebih dari -15% dan +15% yaitu antara -0,10% sampai 1,90%. Data hasil uji stabilitas larutan stok dapat dilihat pada Tabel 4.12.

##### 2. Stabilitas Jangka Pendek Risperidon dalam Plasma

Pengujian dilakukan terhadap dua konsentrasi, yaitu konsentrasi rendah (20,56 ng/mL) dan konsentrasi tinggi (164,44 ng/mL). Hasil pengujian menunjukkan kestabilan larutan risperidon dalam plasma pada suhu kamar, yang ditunjukkan dari nilai % *diff* yang tidak menyimpang lebih dari -15% dan +15% yaitu antara -10,35% sampai 7,40%. Data hasil uji stabilitas jangka pendek dapat dilihat pada Tabel 4.13.

##### 3. Stabilitas Post-preparatif

Pengujian dilakukan terhadap dua konsentrasi, yaitu konsentrasi rendah (20,56 ng/mL) dan konsentrasi tinggi (164,44 ng/mL). Hasil pengujian menunjukkan kestabilan larutan cilostazol dalam plasma yang telah diekstraksi dan disimpan dalam rak autosampler untuk disuntikkan. Terlihat dari nilai % *diff* yang tidak menyimpang lebih dari +15% dan -15%. Data hasil uji stabilitas post-preparatif dapat dilihat pada Tabel 4.14.

Stabilitas risperidon dalam plasma maupun larutan standarnya perlu diperhatikan. Pengujian ini bertujuan untuk mengetahui berapa lama stabilitas

risperidon dalam plasma, mulai dari pengambilan sampel sampai analisis dilakukan. Uji stabilitas yang dilakukan adalah stabilitas larutan stok risperidon, stabilitas jangka pendek dan stabilitas *post-preparatif*. Untuk masing-masing uji stabilitas dalam plasma, dilakukan analisis terhadap dua konsentrasi, yaitu konsentrasi rendah (20,56 ng/mL) dan konsentrasi tinggi (164,44 ng/mL). Dari ketiga uji stabilitas tersebut terlihat bahwa nilai % *diff* tidak menyimpang lebih dari +15% dan -15%.



## BAB 5

### KESIMPULAN DAN SARAN

#### 5.1 Kesimpulan

1. Kondisi optimum untuk analisis risperidon dalam plasma *in vitro* dengan klorazepin sebagai baku dalam menggunakan KCKT dengan detektor *photodiode array*, kolom LiChrospher® 100 RP-18 e (5 µm, Merck) dengan panjang kolom 250 x 4 µm adalah menggunakan fase gerak asetonitril-dapar kalium dihidrogen fosfat 50 mM yang mengandung 0,1% trietilamin (40:60) dengan kecepatan alir 0,8 mL/menit pada panjang gelombang 278 nm dengan klorazepin sebagai baku dalam, waktu retensi risperidon adalah 3,990 menit dan waktu retensi klorazepin adalah 4,953 menit.
2. Dari kondisi optimum didapatkan nilai LLOQ sebesar 5,14 ng/mL, pada rentang konsentrasi 5,11- 204,36 ng/mL dihasilkan kurva kalibrasi risperidon yang linear dengan koefisien korelasi (r) 0,9999, akurasi (% *diff*) dari metode ini antara -14,88 hingga 14,59 % dengan presisi antara (KV) antara -2,17 hingga 5,01 %, dan nilai uji perolehan kembali antara 85,12 hingga 114,59%.

#### 5.2 Saran

Untuk penelitian selanjutnya dapat dilakukan validasi metode analisis risperidon dalam plasma *in vitro* dengan menggunakan metode KCKT sesuai dengan ketentuan dari FDA dalam *Guidance for Industry: Bioanalytical Method Validation*.

## DAFTAR ACUAN

- Acri, A. A., & Henretig, F. M. (1998). Effects of risperidone in overdose. *American Journal of Emergency Medicine*, 16 (5), 498-501.
- Avenoso, A., Facciola, G., Salemi, M., & Spina, E. (2000). Determination of risperidone and its major metabolite 9-hydroxyrisperidone in human plasma by reversed-phase liquid chromatography with ultraviolet detection. *Journal of Chromatography B*, 746, 173-181.
- British Pharmacopoeia*. (2009). London: The Department of Health, Social Services and Public Safety.
- Chamberlain, J. (1985). *Analysis of Drugs in Biological Fluids*. Florida, USA: CRC Press.
- Clozapine*. (n.d). Januari 10, 2010. <http://www.drugbank.ca/drugs/DB00363>
- Clozapine*. (n.d). Januari 12, 2010. <http://www.druglib.com/druginfo/clozapine>
- Engelhardt, H. (Ed.). (1986). *Practice of High Performance Liquid Chromatography*. Hiedelberg, Jerman: Springer-Verlag Berlin.
- Evans, G. (2004). *A Handbook of Bioanalysis and Drug Metabolism*. USA: CRC Press. (Gandjar & Rohman, 2007)
- Food and Drug Administration. (2001). *Guidance for Industry: Bioanalytical Method Validation*. Desember 8, 2009. <http://www.fda.gov/downloads/Drugs/GuidanceComplianceRegulatoryInformation/Guidances/UCM070107.pdf>
- Food and Drug Administration. (2007). *Guidance for Industry: Individual Product Bioequivalence Recommendations*. Desember 8, 2009. <http://www.fda.gov/cder/guidance/bioequivalence/default.htm>
- Foroutan, S. M., Zarghi, A., Shafaati, A., & Khoddam, A. (2006). Rapid high performance liquid chromatographic determination of risperidone in human plasma. *Iranian Journal of Pharmaceutical Research*, 1, 37-40.
- Gandjar, I. G., & Rohman, A. (2007). *Kimia Farmasi Analisis*. Yogyakarta: Pustaka Pelajar.

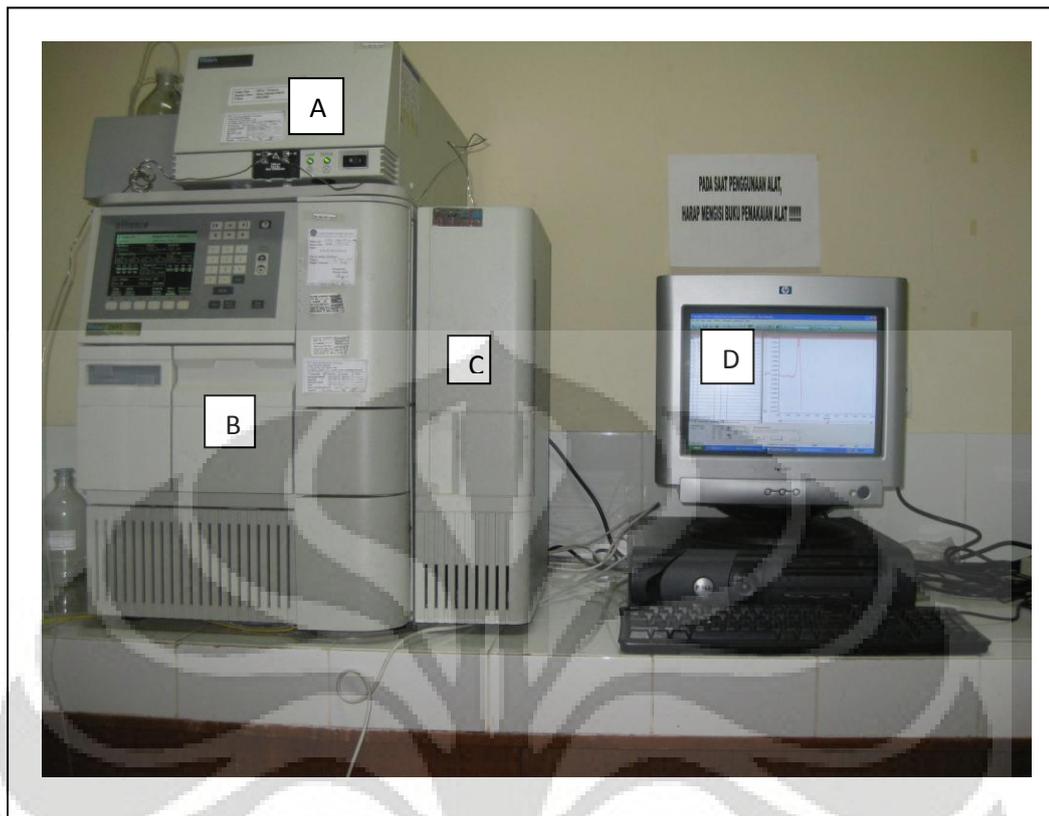
- Harmita. (2006). *Buku Ajar Analisis Fisikokimia*. Depok: Departemen Farmasi FMIPA UI.
- Harmita. (2004). Petunjuk pelaksanaan validasi metode dan cara perhitungannya. *Majalah Ilmu Kefarmasian*, 1 (3), 117-135.
- Johnson, E. L., & Stevenson, R. (1991). *Dasar kromatografi cair* (Kosasih Padmawinata, Penerjemah). Bandung: Penerbit ITB.
- Lacy, C. F., Armstrong, L. L., Goldman, M. P., & Lance, L. L. (2005). *Drugs Information Handbook*. Canada: Lexi-Comp Inc.
- Le Moing, J. P., Edouard, S., & Levron, J. C. (1993). Determination of risperidone and 9-hydroxyrisperidone in human plasma by high-performance liquid chromatography with electrochemical detection. *Journal of Chromatography*, 614, 333-339.
- LLerena, A., et al. (2003). Determination of risperidone and 9-hydroxyrisperidone in human plasma by liquid chromatography: application to the evaluation of CYP2D6 drug interactions. *Journal of Chromatography B*, 783, 213-219.
- Mahatthanatrakul, W., Tharinee, N., Sriwiriyajan, S., Ridditid, W., & Wongnawa, M. (2008). Bioequivalence study of a generic Risperidone (Iperdal®) in healthy Thai male volunteers. *Songklanakarin Journal of Science and Technology*, 30 (3), 307-312.
- Martindale* (34th ed). (2005). London: Pharmaceutical Press London.
- Olesen, O. V., & Linnet, K. (1997). Simplified high-performance liquid chromatographic method for determination of risperidone and 9-hydroxyrisperidone in serum from patients comedicated with other psychotropic drugs. *Journal of Chromatography B*, 698, 209-216.
- Remmerie, B., et al. (2003). Validated method for the determination of risperidone and 9-hydroxyrisperidone in human plasma by liquid chromatography–tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography B*, 783, 461-472.
- Risperidone*. (n.d). Januari 10, 2010. <http://www.drugbank.ca/drugs/DB00734>
- Risperidone*. (n.d). Januari 12, 2010. <http://www.druglib.com/druginfo/risperdal>

Titier, K., Déridet, E., Cardone, E., Abouelfath, A., & Moore, N. (2002). Simplified high-performance liquid chromatographic method for determination of risperidone and 9-hydroxyrisperidone in plasma after overdose. *Journal of Chromatography B*, 772, 373-378.





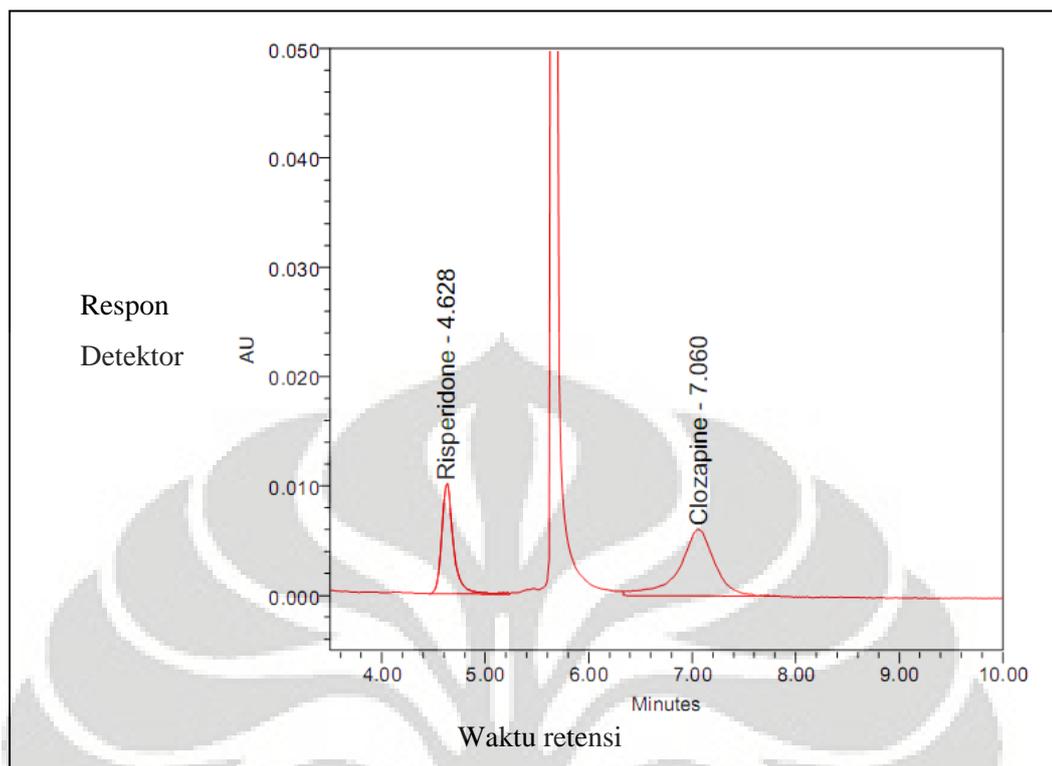
# **GAMBAR**



Keterangan gambar :

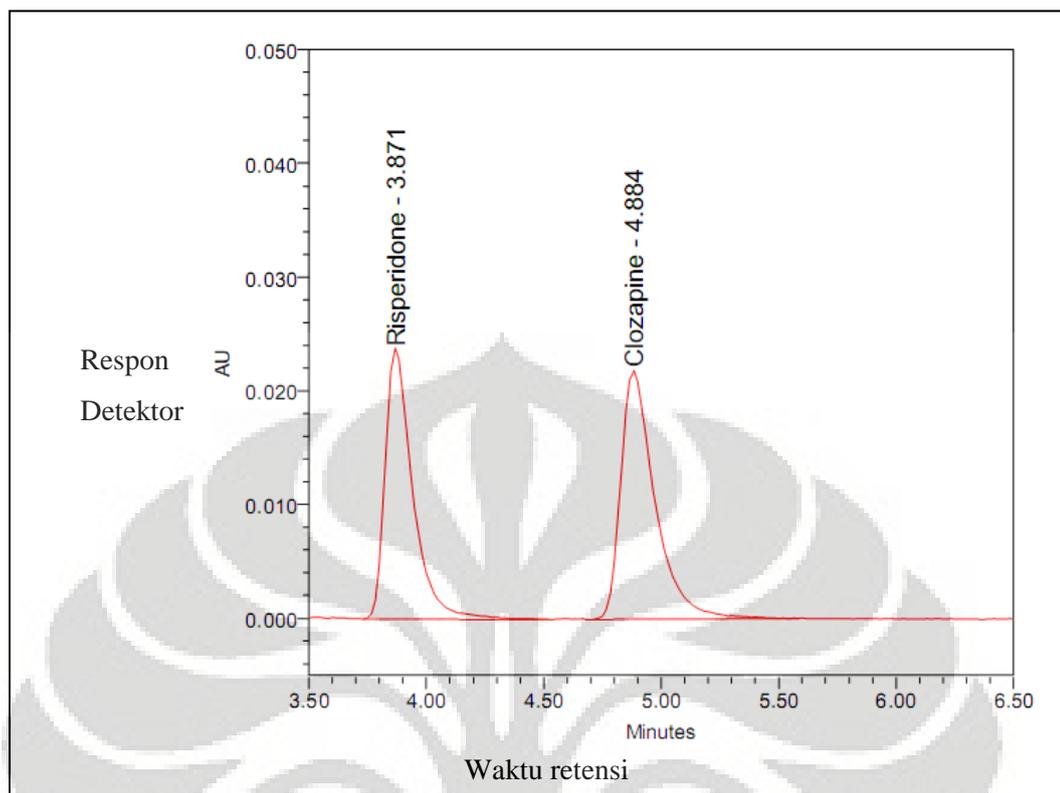
- A. Detektor *Photodiode Array* Waters 2996 (Waters)
- B. Alliance Waters 2695 Separations Module (Waters)
- C. Oven kolom (Waters)
- D. Sistem integrasi Empower Pro

Gambar 3.1 Peralatan Kromatografi Cair Kinerja Tinggi (KCKT)



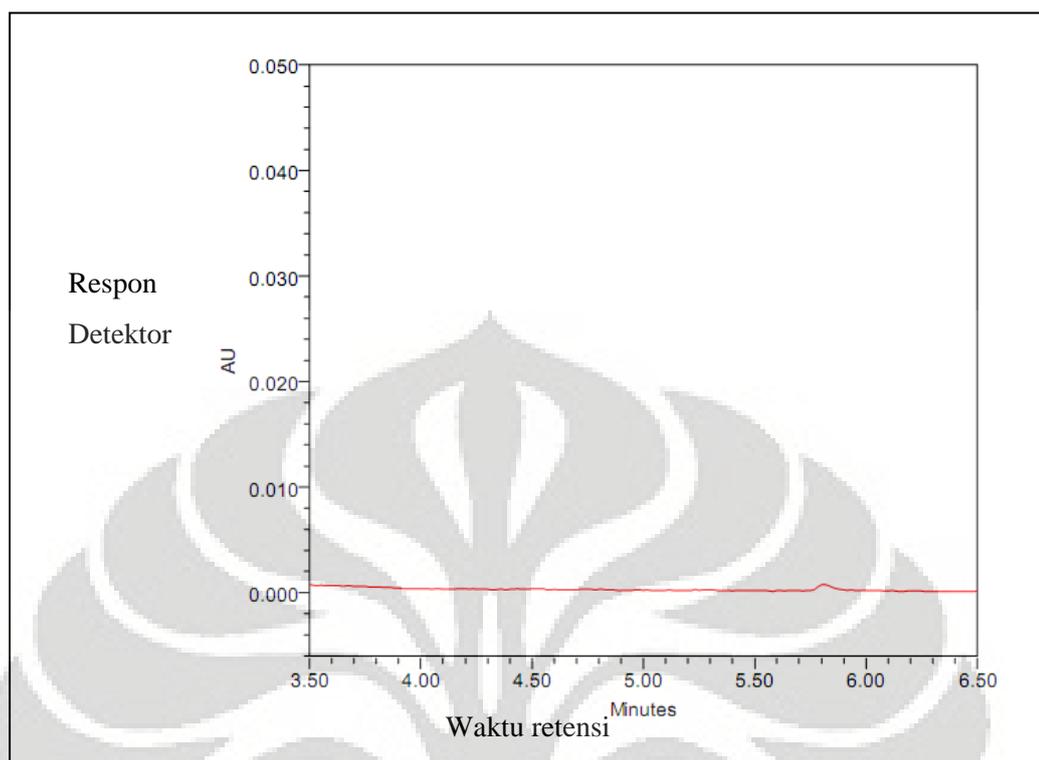
Kondisi: kolom LiChrospher® 100 RP-18 e (5  $\mu\text{m}$ , Merck) dengan panjang kolom 250 x 4  $\mu\text{m}$ , menggunakan fase gerak asetonitril-dapar kalium dihidrogen fosfat 50 mM yang mengandung 0,1% trietilamin (32:68) dengan kecepatan alir 1,0 mL/menit pada panjang gelombang 278 nm; volume penyuntikan 100,0  $\mu\text{l}$

Gambar 4.1 Kromatogram ekstrak plasma yang mengandung risperidon konsentrasi 100,0 ng/mL dan baku dalam klozapin konsentrasi 10  $\mu\text{g/mL}$



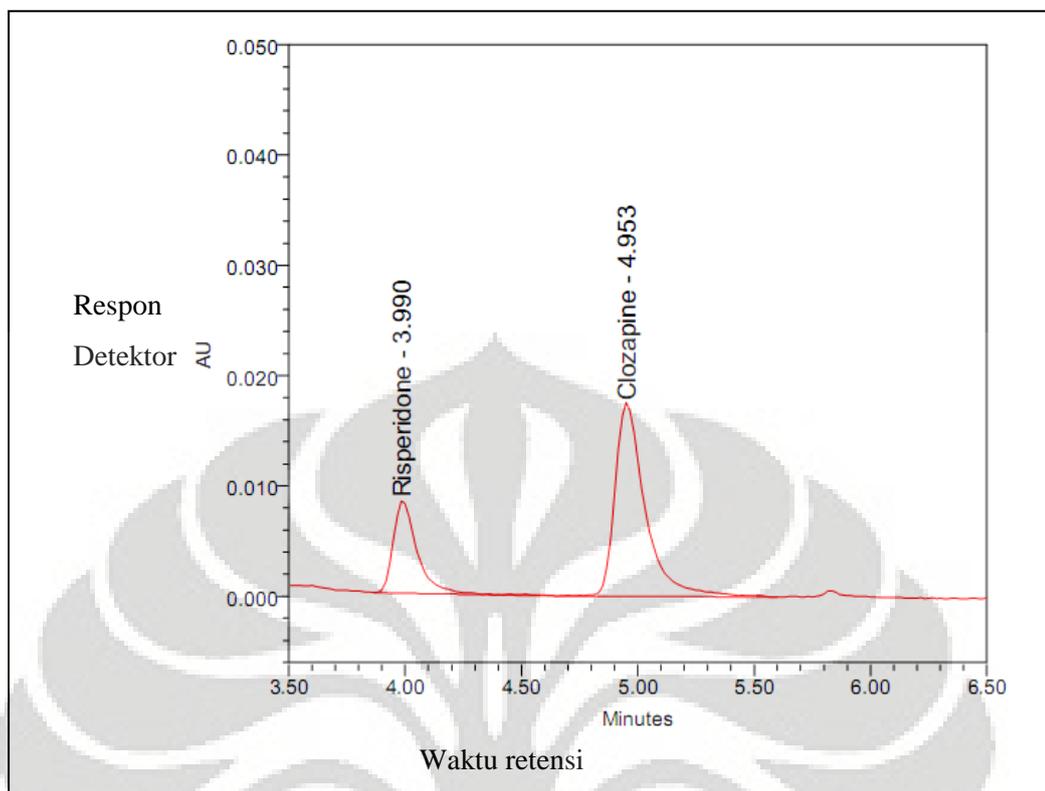
Kondisi: kolom LiChrospher® 100 RP-18 e (5  $\mu\text{m}$ , Merck) dengan panjang kolom 250 x 4  $\mu\text{m}$ , menggunakan fase gerak asetonitril-dapar kalium dihidrogen fosfat 50 mM yang mengandung 0,1% trietilamin (40:60) dengan kecepatan alir 0,8 mL/menit pada panjang gelombang 278 nm; volume penyuntikan 20,0  $\mu\text{l}$

Gambar 4.2 Kromatogram campuran larutan standar risperidon dan klozapin (baku dalam) dengan konsentrasi masing-masing 10  $\mu\text{g/mL}$



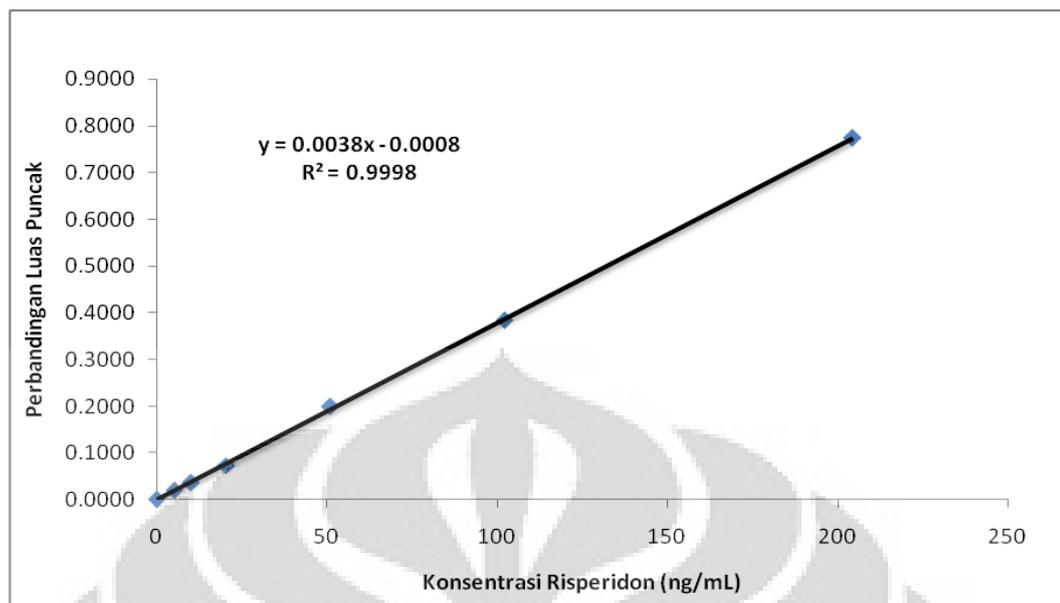
Kondisi: kolom LiChrospher® 100 RP-18e (5  $\mu\text{m}$ , Merck) dengan panjang kolom 250 x 4  $\mu\text{m}$ , menggunakan fase gerak asetonitril-dapar kalium dihidrogen fosfat 50 mM yang mengandung 0,1% trietilamin (40:60) dengan kecepatan alir 0,8 mL/menit pada panjang gelombang 278 nm; volume penyuntikan 100,0  $\mu\text{l}$

Gambar 4.3 Kromatogram ekstrak plasma tanpa penambahan risperidon dan baku dalam klozapin (plasma blanko)



Kondisi: kolom LiChrospher® 100 RP-18e (5  $\mu\text{m}$ , Merck) dengan panjang kolom 250 x 4  $\mu\text{m}$ , menggunakan fase gerak asetonitril-dapar kalium dihidrogen fosfat 50 mM yang mengandung 0,1% trietilamin (40:60) dengan kecepatan alir 0,8 mL/menit pada panjang gelombang 278 nm; volume penyuntikan 100,0  $\mu\text{l}$

Gambar 4.4 Kromatogram ekstrak plasma yang mengandung risperidon konsentrasi 100,0 ng/mL dan baku dalam klozapin konsentrasi 10  $\mu\text{g/mL}$



Kondisi: kolom LiChrospher® 100 RP-18e (5  $\mu\text{m}$ , Merck) dengan panjang kolom 250 x 4  $\mu\text{m}$ , menggunakan fase gerak asetonitril-dapar kalium dihidrogen fosfat 50 mM yang mengandung 0,1% trietilamin (40:60) dengan kecepatan alir 0,8 mL/menit pada panjang gelombang 278 nm; volume penyuntikan 100,0  $\mu\text{l}$

Gambar 4.5 Kurva kalibrasi risperidon dalam plasma *in vitro* dengan penambahan baku dalam



Tabel 4.1 Hubungan antara waktu retensi, jumlah lempeng teoritis, efisiensi kolom, dan faktor ikutan kromatogram risperidon terhadap perubahan komposisi fase gerak

Komposisi fase gerak	Waktu retensi (menit)	Jumlah lempeng (N)	HETP	Faktor ikutan (Tf)
Asetonitril – dapar kalium dihidrogen fosfat 50 mM yang mengandung 0,1% trietilamin pH 3,8 (32 : 68, v/v)	4,582	5656,484	$4,4197 \times 10^{-3}$	1,4839
Asetonitril – dapar kalium dihidrogen fosfat 50 mM yang mengandung 0,1% trietilamin pH 3,8 (30 : 70, v/v)	5,660	5178,399	$4,8277 \times 10^{-3}$	1,4149
Asetonitril – dapar kalium dihidrogen fosfat 50 mM yang mengandung 0,1% trietilamin pH 3,8 (28 : 72, v/v)	6,397	5211,269	$4,7973 \times 10^{-3}$	1,3977
Asetonitril – dapar kalium dihidrogen fosfat 50 mM yang mengandung 0,1% trietilamin pH 3,8 (40 : 60, v/v)	3,681	5691,127	$4,3928 \times 10^{-3}$	1,5258

Tabel 4.2 Hubungan antara waktu retensi, jumlah lempeng teoritis, efisiensi kolom, dan faktor ikutan kromatogram risperidon terhadap perubahan kecepatan alir fase gerak

Kecepatan alir (mL/menit)	Waktu retensi (menit)	Jumlah lempeng (N)	HETP	Faktor ikutan (Tf)
1,0	3,681	5691,127	$4,3928 \times 10^{-3}$	1,5258
0,8	3,871	5666,049	$4,4122 \times 10^{-3}$	1,5791

Tabel 4.3 Data uji kesesuaian sistem

Luas puncak risperidon	Luas puncak klozapin	Waktu retensi ( $t_R$ ) risperidon	KV ( $t_R$ ) (%)	PAR	KV PAR (%)	N	HETP	Tf
194674	222363	3.871	0,0347	0,8755	0,3445	5957,4364	$4,7973 \times 10^{-3}$	1,5883
193886	222586	3.868		0,8711				
194894	223985	3.871		0,8701				
196268	224045	3.871		0,876				
196292	224567	3.871		0,8741				

Kondisi: kolom LiChrospher<sup>®</sup> 100 RP-18 e (5 $\mu$ m, Merck) dengan panjang kolom 250 x 4  $\mu$ m, fase gerak asetonitril-dapar dihidrogen fosfat yang mengandung 0,1% TEA (40:60,v/v); kecepatan alir 0,8 mL/menit; detektor *photodiode array* pada panjang gelombang 278 nm; volume penyuntikan 100,0  $\mu$ L,

Tabel 4.4 Data kurva kalibrasi risperidon dalam plasma *in vitro* dengan penambahan baku dalam

Konsentrasi risperidon (ng/mL)	Luas puncak risperidon	Luas puncak klozapin	PAR
0,00	0	124102	0,0000
5,11	2737	142404	0,0192
10,22	3616	100665	0,0359
20,44	9486	129789	0,0731
51,09	29126	145666	0,2000
102,18	60976	158793	0,3840
204,36	110750	143001	0,7745

Persamaan regresi linier :  $y = 0,0038x - 0,0008$   $r = 0,9999$

Kondisi: kolom LiChrospher® 100 RP-18 e (5µm, Merck) dengan panjang kolom 250 x 4 µm, fase gerak asetonitril-dapar dihidrogen fosfat yang mengandung 0,1% TEA (40:60,v/v); kecepatan alir 0,8 mL/menit; detektor *photodiode array* pada panjang gelombang 278 nm; volume penyuntikan 100,0 µL,

Tabel 4.5 Data pengukuran *lower limit of quantitation* (LLOQ) risperidon dalam plasma *in vitro* dengan penambahan baku dalam

Konsentrasi risperidon (ng/mL)	Luas puncak risperidon	Luas puncak klozapin	PAR	Konsentrasi terukur (ng/mL)	Rata-rata	SD	KV (%)	% <i>diff</i>
5,14	2215	114602	0,0193	5,30	5,33	0,27	5,03	3,21
	2801	144809	0,0193	5,31				3,29
	1633	83271	0,0196	5,38				4,66
	2138	118809	0,0180	4,95				-3,62
	2783	133448	0,0209	5,71				11,05

Kondisi: kolom LiChrospher® 100 RP-18 e (5µm, Merck) dengan panjang kolom 250 x 4 µm, fase gerak asetonitril-dapar dihidrogen fosfat yang mengandung 0,1% TEA (40:60,v/v); kecepatan alir 0,8 mL/menit; detektor *photodiode array* pada panjang gelombang 278 nm; volume penyuntikan 100,0 µL,

Tabel 4.6 Data uji akurasi dan presisi risperidon dalam plasma *in vitro* dengan penambahan baku dalam, Hari ke-1 (*intra-day*)

Konsentrasi risperidon/klozapin (ng/mL)	Luas puncak risperidon/klozapin	PAR	Konsentrasi risperidon terukur (ng/mL)	Rata-rata	SD	KV (%)	% <i>diff</i>
20,56/10070,0	9823/145473	0,0675	18,01	18,19	0,54	2,97	-12,38
	11375/170583	0,0667	17,79				-13,46
	10767/150646	0,0715	19,05				-7,32
	10265/154371	0,0665	17,74				-13,70
	10376/150777	0,0688	18,35				-10,72
92,50/10070,0	54590/164871	0,3311	87,50	86,58	3,49	4,03	-5,40
	51848/155230	0,3340	88,27				-4,58
	41131/132257	0,3110	82,20				-11,14
	50507/146768	0,3441	90,93				-1,69
	54945/172916	0,3178	83,98				-9,21
164,44/10070,0	89879/159257	0,5644	149,00	143,72	3,12	2,17	-9,39
	85569/159903	0,5351	141,29				-14,08
	104371/192192	0,5431	143,38				-12,81
	79204/147775	0,5360	141,51				-13,94
	78958/145335	0,5433	143,44				-12,77

Kondisi: kolom LiChrospher® 100 RP-18 e (5µm, Merck) dengan panjang kolom 250 x 4 µm, fase gerak asetonitril-dapar dihidrogen fosfat yang mengandung 0,1% TEA (40:60,v/v); kecepatan alir 0,8 mL/menit; detektor *photodiode array* pada panjang gelombang 278 nm; volume penyuntikan 100,0 µL,

Tabel 4.7 Data uji akurasi dan presisi risperidon dalam plasma *in vitro* dengan penambahan baku dalam, Hari ke-2 (*intra-day*)

Konsentrasi risperidon/klozapin (ng/mL)	Luas puncak risperidon/klozapin	PAR	Konsentrasi risperidon terukur (ng/mL)	Rata-rata	SD	KV (%)	% <i>diff</i>
20,56/10070,0	9458/127641	0,0741	20,88	18,50	1,34	7,26	1,57
	10783/173157	0,0623	17,62				-14,28
	10442/164353	0,0635	17,97				-12,59
	9801/153988	0,0636	18,00				-12,44
	10756/168866	0,0637	18,01				-12,37
92,50/10070,0	44040/140981	0,3124	86,55	83,79	6,28	7,49	-6,43
	41690/146375	0,2848	78,95				-14,64
	48503/167251	0,2900	80,38				-13,10
	41125/143469	0,2866	79,46				-14,10
	55514/164263	0,3380	93,60				1,19
164,44/10070,0	71488/122836	0,5820	160,85	145,45	8,72	6,00	-2,18
	85953/168507	0,5101	141,04				-14,23
	77787/153669	0,5062	139,97				-14,88
	83972/161518	0,5199	143,74				-12,59
	96426/188225	0,5123	141,64				-13,86

Kondisi: kolom LiChrospher® 100 RP-18 e (5µm, Merck) dengan panjang kolom 250 x 4 µm, fase gerak asetonitril-dapar dihidrogen fosfat yang mengandung 0,1% TEA (40:60,v/v); kecepatan alir 0,8 mL/menit; detektor *photodiode array* pada panjang gelombang 278 nm; volume penyuntikan 100,0 µL,

Tabel 4.8 Data uji akurasi dan presisi risperidon dalam plasma *in vitro* dengan penambahan baku dalam, Hari ke-3 (*intra-day*)

Konsentrasi risperidon/klozapin (ng/mL)	Luas puncak risperidon/klozapin	PAR	Konsentrasi risperidon terukur (ng/mL)	Rata-rata	SD	KV (%)	% <i>diff</i>
20,56/10070,0	8063/112713	0,0715	23,55	22,31	1,12	5,01	14,59
	7682/114258	0,0672	22,26				8,28
	8564/125113	0,0685	22,62				10,06
	8641/140689	0,0614	20,50				-0,25
	8156/119232	0,0684	22,61				9,99
92,50/10070,0	23558/76522	0,3079	94,81	97,41	3,00	3,08	2,50
	23153/74338	0,3115	95,89				3,67
	42791/130706	0,3274	100,70				8,86
	38539/124917	0,3085	95,01				2,71
	42375/129518	0,3272	100,63				8,79
164,44/10070,0	88728/157884	0,5620	171,43	176,42	8,00	4,54	4,25
	71404/118640	0,6019	183,45				11,56
	89248/159920	0,5581	170,25				3,54
	89008/145283	0,6127	186,71				13,54
	84029/150558	0,5581	170,27				3,54

Kondisi: kolom LiChrospher® 100 RP-18 e (5µm, Merck) dengan panjang kolom 250 x 4 µm, fase gerak asetonitril-dapar dihidrogen fosfat yang mengandung 0,1% TEA (40:60,v/v); kecepatan alir 0,8 mL/menit; detektor *photodiode array* pada panjang gelombang 278 nm; volume penyuntikan 100,0 µL,

Tabel 4.9 Data uji akurasi dan presisi risperidon dalam plasma *in vitro* dengan penambahan baku dalam selama 3 hari (*inter-day*)

Konsentrasi risperidon/klozapin (ng/mL)	Hari ke-	Luas puncak risperidon/klozapin	PAR	Konsentrasi risperidon terukur (ng/mL)	Rata-rata	SD	KV (%)	% <i>diff</i>
20,56/10070,0	1	9823/145473	0,0675	18,01	20,81	2,79	13,39	-12,40
	2	9458/127641	0,0741	20,88				1,56
	3	8063/112713	0,0715	23,55				14,54
92,50/10070,0	1	54590/164871	0,3311	87,50	89,62	5,73	6,40	-5,41
	2	44040/140981	0,3124	86,55				-6,43
	3	23558/76522	0,3079	94,81				2,50
164,44/10070,0	1	89879/159257	0,5644	149,00	160,43	12,25	7,64	-9,39
	2	71488/122836	0,5820	160,85				-2,18
	3	88728/157884	0,5620	171,43				4,25

Kondisi: kolom LiChrospher<sup>®</sup> 100 RP-18 e (5 $\mu$ m, Merck) dengan panjang kolom 250 x 4  $\mu$ m, fase gerak asetonitril-dapar dihidrogen fosfat yang mengandung 0,1% TEA (40:60,v/v); kecepatan alir 0,8 mL/menit; detektor *photodiode array* pada panjang gelombang 278 nm; volume penyuntikan 100,0  $\mu$ L,

Tabel 4.10 Data uji selektivitas risperidon dalam plasma *in vitro* dengan penambahan baku dalam

Nomor plasma	Konsentrasi risperidon/klozapin (ng/mL)	Luas puncak risperidon/klozapin	PAR	Konsentrasi risperidon terukur (ng/mL)	Rata-rata	SD	KV (%)	% <i>diff</i>
1		2412/164980	0,0146	4,49				-12,71
		2182/143147	0,0152	4,66				-9,37
2		3290/187653	0,0175	5,29				2,90
		2971/201858	0,0147	4,51				-12,19
3		2649/176264	0,0150	4,60				-10,52
		1651/111882	0,0148	4,52				-11,98
4	5,14/10070,0	3274/181452	0,0180	5,43	4,97	0,46	9,16	5,64
		3337/173709	0,0192	5,75				11,90
5		2679/147896	0,0181	5,45				6,02
		3830/228154	0,0168	5,08				-1,09
6		2804/186747	0,0150	4,60				-10,60
		2984/170387	0,0175	5,28				2,80

Kondisi: kolom LiChrospher<sup>®</sup> 100 RP-18 e (5µm, Merck) dengan panjang kolom 250 x 4 µm, fase gerak asetonitril-dapar dihidrogen fosfat yang mengandung 0,1% TEA (40:60,v/v); kecepatan alir 0,8 mL/menit; detektor *photodiode array* pada panjang gelombang 278 nm; volume penyuntikan 100,0 µL,

Tabel 4.11 Data uji perolehan kembali (% *recovery*) risperidon dalam plasma *in vitro* dengan penambahan baku dalam

Konsentrasi risperidon/klozapin (ng/mL)	Luas puncak risperidon/klozapin	PAR	Konsentrasi risperidon terukur (ng/mL)	% <i>recovery</i>
20,56/10070,0	9823/145473	0,0675	18,01	87,62
	11375/170583	0,0667	17,79	86,54
	10767/150646	0,0715	19,05	92,68
	9458/127641	0,0741	20,88	101,57
	10783/173157	0,0623	17,62	85,72
	10442/164353	0,0635	17,97	87,41
	8063/112713	0,0715	23,55	114,59
	7682/114258	0,0672	22,26	108,28
	8564/125113	0,0685	22,62	110,06
92,50/10070,0	54590/164871	0,3311	87,50	94,60
	51848/155230	0,3340	88,27	95,42
	41131/132257	0,3110	82,20	88,86
	44040/140981	0,3124	86,55	93,57
	41690/146375	0,2848	78,95	85,36
	48503/167251	0,2900	80,38	86,90
	23558/76522	0,3079	94,81	102,50
	23153/74338	0,3115	95,89	103,67
	42791/130706	0,3274	100,70	108,86

Tabel 4.11 Data uji perolehan kembali (% *recovery*) risperidon dalam plasma *in vitro* dengan penambahan baku dalam (lanjutan)

Konsentrasi risperidon/klozapin (ng/mL)	Luas puncak risperidon/klozapin	PAR	Konsentrasi risperidon terukur (ng/mL)	% <i>recovery</i>
164,44/10070,0	89879/159257	0,5644	149,00	90,61
	85569/159903	0,5351	141,29	85,92
	104371/192192	0,5431	143,38	87,19
	71488/122836	0,5820	160,85	97,82
	85953/168507	0,5101	141,04	85,77
	77787/153669	0,5062	139,97	85,12
	88728/157884	0,5620	171,43	104,25
	71404/118640	0,6019	183,45	111,56
	89248/159920	0,5581	170,25	103,54

Kondisi: kolom LiChrospher® 100 RP-18 e (5µm, Merck) dengan panjang kolom 250 x 4 µm, fase gerak asetonitril-dapar dihidrogen fosfat yang mengandung 0,1% TEA (40:60,v/v); kecepatan alir 0,8 mL/menit; detektor *photodiode array* pada panjang gelombang 278 nm; volume penyuntikan 100,0 µL,

Tabel 4.12 Data uji stabilitas larutan stok risperidon (dengan baku dalam)

Konsentrasi risperidon/klozapin (ng/mL)	Jam ke-	Hari ke-	Luas puncak risperidon/klozapin	PAR	% <i>diff</i>	
10217,97/10070,0	0		193306/225529	0,8571	0	
			193814/226100	0,8572	0	
	6		193178/222583	0,8679	1,25	
			194695/222898	0,8735	1,90	
	24		189951/218936	0,8676	1,22	
			188945/217434	0,8690	1,38	
		0		193306/225529	0,8571	0
				193814/226100	0,8572	0
		3		190406/222363	0,8563	-0,10
				191810/222586	0,8617	0,53

Tabel 4.13 Data uji stabilitas jangka pendek risperidon dalam plasma *in vitro* dengan penambahan baku dalam

Konsentrasi risperidon/klozapin (ng/mL)	Jam ke-	Luas puncak risperidon/klozapin	PAR	Konsentrasi risperidon terukur (ng/mL)	% <i>diff</i>
20,56/10070,0	0	6307/107293	0,0588	19,71	-4,14
		8333/133317	0,0625	20,83	1,32
		9430/145571	0,0648	21,52	4,65
	6	6577/120181	0,0547	18,49	-10,09
		7558/125952	0,0600	20,08	-2,35
		5291/79378	0,0667	22,08	7,40
164,44/10070,0	0	76034/142903	0,5321	162,41	-1,23
		49233/88315	0,5575	170,07	3,42
		61490/127485	0,4823	147,41	-10,35
	6	58743/101810	0,5770	175,95	7,00
		71461/145403	0,4915	150,17	-8,68
		65137/119435	0,5454	166,42	1,21

Tabel 4.14 Data uji stabilitas *post-preparatif* (autosampler) risperidon dalam plasma *in vitro* dengan penambahan baku dalam

Konsentrasi risperidon/klozapin (ng/mL)	Jam ke-	Luas puncak risperidon/klozapin	PAR	Konsentrasi risperidon terukur (ng/mL)	% <i>diff</i>
20,56/10070,0	0	9823/145473	0,0675	18,01	-12,40
		11375/170583	0,0667	17,79	-13,48
		10767/150646	0,0715	19,05	-7,34
	24	11444/165132	0,0693	19,56	-4,88
		11380/181958	0,0625	17,69	-13,94
		11283/169546	0,0665	18,80	-8,57
164,44/10070,0	0	89879/159257	0,5644	149,00	-9,39
		85569/159903	0,5351	141,29	-14,08
		104371/192192	0,5431	143,38	-12,81
	24	77538/148731	0,5213	144,14	-12,35
		85815/158841	0,5403	149,35	-9,18
		78167/143674	0,5441	150,40	-8,54

Tabel 4.15 Data hasil optimasi metode analisis

Parameter analisis	KV (%)	Syarat	% <i>diff</i>	Syarat	% <i>recovery</i>	Syarat
<b>LLOQ</b>	5,03	≤ 20%	-3,62 s/d 11,05	-20% s/d +20%		
<b>Akurasi</b>						
20,56/10070,0			-14,28 s/d 14,59			
92,50/10070,0			-14,64 s/d 8,86	-15% s/d +15%		
164,44/10070,0			-14,88 s/d 13,54			
<b>Presisi</b>						
20,56/10070,0	2,97 s/d 7,26	≤ 15%				
92,50/10070,0	3,08 s/d 7,49					
164,44/10070,0	2,17 s/d 6,00					
<b>% <i>recovery</i></b>						
20,56/10070,0					85,72 s/d 114,59	80-120 %
92,50/10070,0					85,36 s/d 108,86	
164,44/10070,0					85,12 s/d 111,56	
<b>Selektivitas</b>	9,16	≤ 20%	-12,71 s/d 11,90	-20% s/d +20%		
<b>Stabilitas jangka pendek</b>						
20,56/10070,0			-10,09 s/d 7,40			
164,44/10070,0			-10,35 s/d 7,00	-15% s/d +15%		
<b>Stabilitas larutan stok (sampai hari ke-3)</b>			-0,10 s/d 1,90	-15% s/d +15%		
<b>Stabilitas post-preparatif</b>						
20,56/10070,0			-13,94 s/d -4,88	-15% s/d +15%		
164,44/10070,0			-14,08 s/d -8,54			



## Lampiran 1 Cara perhitungan nilai N, HETP, dan Tf

$$N = 16 \left( \frac{t_R}{W} \right)^2$$

$$\text{HETP} = \frac{L}{N}$$

$$T_f = \frac{w_{0,05}}{2f}$$

$$R = 2 \frac{(t_{R2} - t_{R1})}{W_1 + W_2}$$

Keterangan :

N = jumlah lempeng teoritis

$t_R$  = waktu retensi (menit)

W = lebar puncak

HETP = ukuran efisiensi kolom

L = panjang kolom (cm)

$T_f$  = faktor ikutan

$W_{0,05}$  = lebar puncak diukur pada titik yang ketinggiannya 5% dari tinggi puncak di atas garis dasar

## Lampiran 2 Cara memperoleh regresi linear

Persamaan garis  $y = a + bx$

Untuk memperoleh nilai a dan b digunakan metode kuadrat terkecil (*least square*)

$$a = \frac{(\sum yi)(\sum xi^2) - (\sum xi)(\sum xi.yi)}{N(\sum xi^2) - (\sum xi)^2}$$

$$b = \frac{N(\sum xi.yi) - (\sum xi)(\sum yi)}{N(\sum xi^2) - (\sum xi)^2}$$

Linearitas ditentukan berdasarkan nilai koefisien korelasi (r)

$$r = \frac{N(\sum xy) - (\sum x)(\sum y)}{[N(\sum x^2) - (\sum x)^2 \times N(\sum Y^2) - (\sum y)^2]^{1/2}}$$

## Lampiran 3 Cara perhitungan koefisien variasi dari fungsi

$$V_{x_0} = \frac{S_{x_0}}{\bar{X}}$$

$$S_{y/x} = \frac{\sum(Y - Y_i)^2}{N - 2}$$

$$S_{x_0} = \frac{S_{y/x}}{b}$$

Keterangan ;

$S_{y/x}$  = simpangan baku residual

$S_{x_0}$  = standar deviasi fungsi

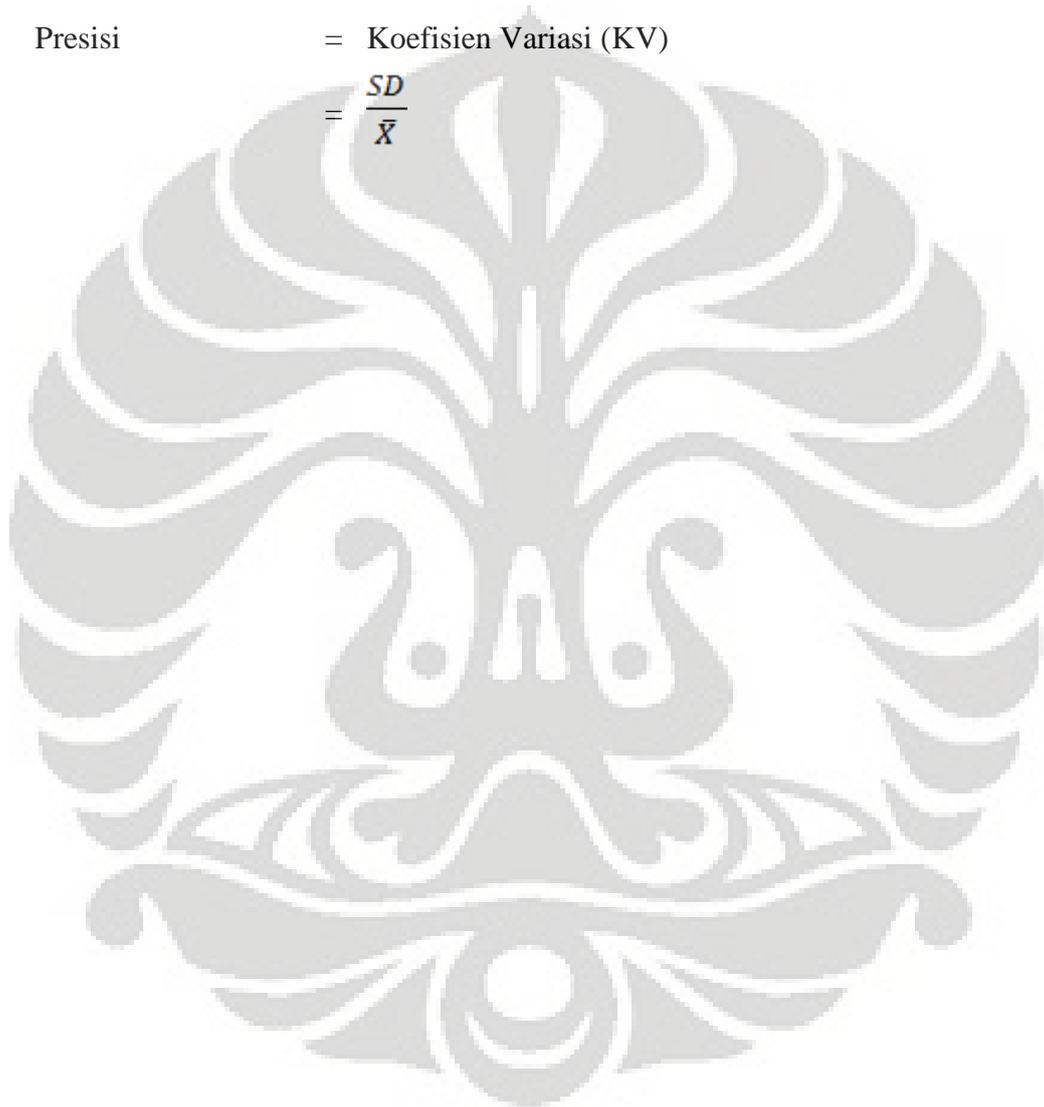
$b$  = arah garis linear dari kurva kalibrasi

## Lampiran 4 Cara perhitungan presisi

$$\text{Simpangan baku (SD)} = \left( \frac{\sum(X - \bar{X})^2}{N-1} \right)^{1/2}$$

$$\text{Presisi} = \text{Koefisien Variasi (KV)}$$

$$= \frac{SD}{\bar{X}}$$



## Lampiran 5 Cara perhitungan akurasi

$$\begin{aligned} \text{Akurasi} &= \% \text{ diff} \\ &= \frac{(\text{konsentrasi terukur} - \text{konsentrasi sebenarnya})}{\text{konsentrasi sebenarnya}} \times 100 \% \end{aligned}$$

Keterangan :

Konsentrasi terukur merupakan konsentrasi risperidon yang diperoleh dari plot kurva kalibrasi



## Lampiran 6 Cara perhitungan uji perolehan kembali

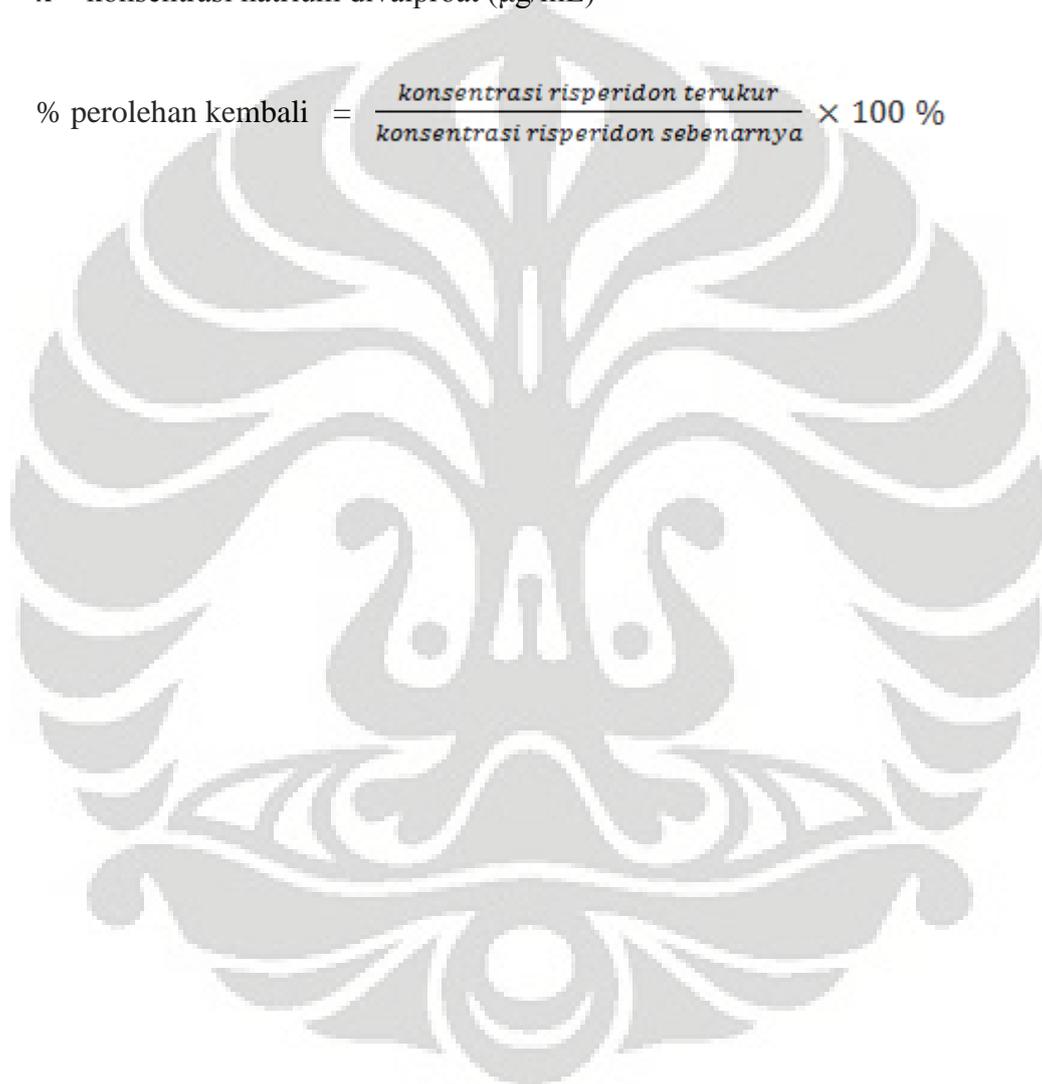
Persamaan kurva kalibrasi

$$y = a + bx$$

y = perbandingan luas puncak

x = konsentrasi natrium divalproat ( $\mu\text{g/mL}$ )

$$\% \text{ perolehan kembali} = \frac{\textit{konsentrasi risperidon terukur}}{\textit{konsentrasi risperidon sebenarnya}} \times 100 \%$$





## CERTIFICATE OF ANALYSIS

Product Name	Risperidone USP	Page 2 of 2	
Batch Number	ARD09U0010055	A.R.No.	09FP00084
Mfg. Date	February 2009	Date of Release	18/02/2009
Dispatch Quantity	1.00 Kg	Retest Date	January 2012
S.No.	Test	Specification	Result
4	Loss on drying (% w/w, determined on 1g of finely powdered sample at 100°C to 105°C for 4h)	Not more than 0.5	0.23
5	Residue on ignition (% w/w, determined on 1g)	Not more than 0.1	0.03
6	Heavy metals (ppm)	Not more than 10	Less than 10
7	Related substances (By HPLC, %w/w)		
	<b>Specified impurities:</b>		
	<b>Process impurity:</b>		
	Risperidone related compound A [E-Oxime of USP]	Not more than 0.15	Not detected
	Risperidone related compound B [Z-Oxime of USP]	Not more than 0.15	Below LOQ
	Risperidone related compound D [5-Fluororisperidone of USP]	Not more than 0.15	Below LOQ
	Risperidone related compound E [6-Methylrisperidone of USP]	Not more than 0.15	Below LOQ
	<b>Process impurity / Degradation product:</b>		
	Risperidone related compound C [9-Hydroxyrisperidone of USP]	Not more than 0.20	Below LOQ
	<b>Unspecified impurities:</b>		
	Any other individual	Not more than 0.10	0.05
	Total (Specified and Unspecified impurities)	Not more than 0.3	0.05
8	Assay (By HPLC, % w/w, as C <sub>23</sub> H <sub>27</sub> FN <sub>4</sub> O <sub>2</sub> , on dried basis)	Not less than 98.5 and Not more than 101.0	99.3

REMARKS: The Material complies as per above specification.

	Prepared By	Checked By	Approved By
Signature	<i>[Signature]</i>	<i>[Signature]</i>	<i>[Signature]</i>
Date	03/12/2009	03/12/2009	03/12/2009

## AUROBINDO PHARMA LTD

Unit 1 : Sy. No. 385, 396, 388-395 &amp; 269, Borpatla (V), Hathnora (M), Medak Dist. A.P., INDIA Pin : 502 296, Tel : + 91 8458 220 050, 220 051, 220 114 Fax + 91 8458 220 115

Regd. Off. Plot No. 2, Maitriyihar, Amecrest, Hyderabad - 500 038 A.P., INDIA Tel + 91 40 6672 5000 Fax + 91 40 2374 6833, 2374 1080

www.aurobindo.com

台州市星明药业有限公司

TAIZHOU XINGMING PHARMACEUTICAL CO., LTD

检 验 报 告 单

## CERTIFICATE OF ANALYSIS

NO.:0912-203

PRODUCT NAME: CLOZAPINE 品 名: 氯氮平		BATCH NO 批号: C103-091204
SOURCE 来源: 01 workshop 车间		QUANTITY 数量: 100.0kg
TEST DATE 检验日期: 2009.12.11		REPORT DATE 报告日期: 2009.12.11
MFG.DATE 生产日期: 2009.12.10		EXPIRY DATE 有效期: 2011.11.15
STANDARD CODE 标准代号: BP2005 版		
ITEMS 检验项目	STANDARDS 标准要求	RESULTS 检验结果
Appearance 外观	Yellow crystalline powder 黄色结晶性粉末	Yellow crystalline powder 黄色结晶性粉末
Identification 鉴别	Positive 呈正反应	Positive 呈正反应
Melting Point 熔点	182~186°C	183.5~ 186.0°C
Related substances 相关物质	Conforms 应符合规定	Conforms 符合规定
Heavy metal 重金属	≤0.002%	<0.001%
Loss on drying 干燥失重	≤0.5%	0.05%
Sulfate ash 硫酸灰份	≤0.1%	0.03%
Assay 含量	99.0~101.0%	99.7%
CONCLUSION 结论	The results conform with the BP (2005) standards 本品符合英国药典 (2005) 版标准	

Q.C. Director

质检科长:

Checker

复核人:

Analyst

化验员:

Add: 89 Binhai Road, Jiaojiang, Taizhou city, Zhejiang, China