

REVIEW ARTIKEL: METODE KROMATOGRAFI CAIR PADA PEMISAHAN ENANSIOMER OFLOKSASIN

ARTICLE REVIEW: LIQUID CHROMATOGRAPHIC METHODS FOR ENANTIO SEPARATION OF OFLOXACIN

Zenith Putri Dewianti^{1*}, Arini Aprilliani¹, Hilda Damayanti¹

¹Sekolah Tinggi Farmasi Muhhamdiah Tangerang

*Corresponding Author Email : zenith@stfm.ac.id

DOI: <http://dx.doi.org/10.47653/farm.v6i2.133>

ABSTRAK

Hampir 56% dari obat-obatan yang dipasarkan dan digunakan adalah senyawa kiral, dan 88% diantaranya masih merupakan suatu rasemat. Aktivitas anti-bakteri dari (S)-ofloksasin (levofloksasin) adalah 8-128 kali lebih tinggi dari (R)-ofloksasin, yang dapat berbahaya bagi fungsi hati dan ginjal jika diberikan dalam bentuk rasemat sehingga perlu untuk menetapkan metode yang tepat dalam mendapatkan enansiomer tunggal. Metode kromatografi cair dapat digunakan untuk memisahkan enansiomer baik secara tidak langsung dengan reagen derivatisasi kiral atau penambahan fase gerak kiral, maupun dengan fase diam kiral. Metode ini telah dikembangkan sejak lama sebagai pemisahan senyawa kiral fluorokuinolon menggunakan berbagai pendekatan yang berbeda. Review artikel ini menyajikan perbandingan metode pemisahan enansiomer ofloksasin menggunakan kromatografi cair diantaranya metode fase diam kiral dan fase gerak kiral dengan penambahan penukar ligan/siklodekstrin.

Kata Kunci: Kromatografi Cair, Ofloksasin, Pemisahan Enansiomer

ABSTRACT

Nearly 56% of the drugs marketed and used are chiral compounds, 88% of them are still racemates. The antibacterial activity of (S)-ofloxacin (levofloxacin) is 8-128 times higher than (R)-ofloxacin. It should be given as pure enantiomer so that it will not be harmful to the liver and kidney function. The liquid chromatography method can be used to enantioseparation by chiral derivatization reagent and also by the chiral stationary phase or by using the chiral mobile phase. This method was developed a long time ago as a form of chiral fluoroquinolone compounds using different methods. This review article presents a method comparison of enantioseparation of ofloxacin using liquid chromatography including the chiral stationary phase and the chiral mobile phase additive by a ligand exchange/cyclodextrin.

Keywords : Enantioseparation, Liquid Chromatographic, Ofloxacin

PENDAHULUAN

Telah diketahui bahwa sebagian besar senyawa biologis untuk kepentingan farmakologis merupakan senyawa kiral (Schmid & Gerald, 2011). Hampir 56% dari obat-obatan yang dipasarkan dan digunakan adalah senyawa kiral, dan 88% diantaranya masih merupakan suatu rasemat (Singh dkk,

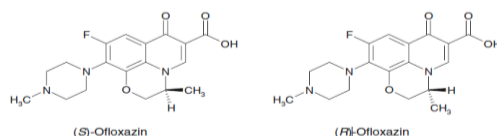
2019). Adanya perbedaan farmakodinamik, farmakokinetik, dan toksikologi antara enansiomer, menjadikan stereokimia sebagai topik hangat dalam penelitian dan pengembangan obat (Fang dkk, 2013).

Kontrol kemurnian enansiomer dan penentuan molekul obat enansiomer tunggal

tetap menjadi subjek penting untuk tujuan klinis, analisis dan regulasi serta evaluasi yang akurat dari risiko yang ditimbulkan oleh produk terhadap kesehatan manusia.(Singh dkk, 2019).Peningkatan jumlah obat kiral yang pesat menunjukkan bahwa teknologi pemisahan memang sangat penting (Davankov, 2012).

Ofloksasin merupakan suatu antibakteri kuinolon berflorinasi yang menargetkan

penghambatan enzim bakteri DNA gyrase dan DNA topoisomerase IV (Horstkotter dan Blaschke, 2001), dan merupakan senyawa kiral karena gugus metil pada posisi C-3 dari cincin oksazin.Senyawa ini banyak digunakan untuk mengobati beberapa penyakit seperti gangguan pada sistem pernafasan, sistem urin, dan infeksi beberapa jaringan (Cheng dkk, 2002).



Gambar 1. Struktur Molekul Enansiomer Ofloksasin (Tian dkk, 2010)

Aktivitas anti-bakteri dari (S)-enansiomer (levofloksasin) adalah 8-128 kali lebih tinggi dari (R)-enansiomer, yang dapat berbahaya bagi fungsi hati dan ginjal jika diberikan dalam bentuk rasemat.Selain itu, kedua enansiomer ini menunjukkan perbedaan yang jelas pada strain bakteri secara *in vitro* (Eliopoulos dkk, 1996).Namun demikian, tidak dapat dihindari bahwa kedua produk dapat mengandung sintesis levofloksasin sehingga perlu untuk menetapkan metode yang tepat dalam mendapatkan kedua enansiomer tersebut (Fang dkk, 2013).

Beberapa teknik telah diusulkan untuk penentuan ofloksasin, seperti voltametri (Yang dkk, 2008), spektroskopi resonansi magnetik nuklir, spektrofotometri (Sevgi, 2009), potensiometri (Pimenta dkk, 2011), elektroforesis kapiler (Lin dkk 2004), dan Kromatografi Cair Kinerja Tinggi (KCKT) (Bi dkk, 2011).

Kelebihan metode KCKT jika dibandingkan dengan metode lainnya, khususnya dalam pengujian kemurnian (Done dkk, 1974; Snyder dan Kirkland, 1979; Hamilton dan Sewell, 1982; Johnson dan Stevenson, 1978):mampu memisahkan

molekul-molekul dari suatu campuran,mudah melaksanakannya, kecepatan analisis dan kepekaan yang tinggi, dapat dihindari terjadinya dekomposisi / kerusakan bahan yang dianalisis, Resolusi yang baik, dapat digunakan bermacam-macam detektor, kolom dapat digunakan kembali, dan mudah melakukan *sample recovery*.

KCKT dapat digunakan untuk memisahkan enansiomer baik secara tidak langsung dengan reagen derivatisasi kiral maupun dengan fase diam kiral atau penambahan fase gerak kiral.Metode ini telah dikembangkan sejak lama sebagai pemisahan senyawa kiral fluorokuinolon menggunakan berbagai pendekatan yang berbeda.Tujuan dari review artikel ini yaitu menyajikan perbandinganmetode pemisahan enansiomer ofloksasin menggunakan kromatografi cair.

METODEOLOGI PENELITIAN

Alat

Alat-alat yang akan digunakan meliputi berbagai alat gelas yang umum digunakan, neraca analitis, seperangkat alat kromatografi preparatif, Kromatografi Cair Kinerja Tinggi beserta detektor, dan kolom C18.

Bahan

Bahan-bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah kuabides, asam amino (L-fenilalanin, L-leusin, L-isoleusin), metanol, (S)-ofloksasin, tembaga(II)sulfat, campuran (\pm)-ofloksasin (rasemat), siklodektrindan bahan-bahan kimia lainnya.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Kromatografi merupakan metode yang paling dikenal dalam pemisahan enansiomer (Fang dkk, 2013). Pemisahan enansiomer metode kromatografi cair kinerja tinggi (KCKT) dapat dilakukan dengan menggunakan fase diam kiral atau dengan penambahan fase gerak kiral (Tian dkk, 2010). Perhitungan resolusi pemisahan (R_s):

$$R_s = \frac{2(t_R - t_S)}{(w_R + w_S)}$$

Metode KCKT Fase Diam Kiral

Pendekatan langsung dengan menggunakan kolom fase diam kiral lebih sesuai dan dapat diaplikasikan untuk memisahkan enansiomer skala preparatif, hanya saja diperlukan kolom kiral yang relatif mahal (Elbashirdkk, 2010).

Kolom dengan fase diam kiral tidak diperlukan keterlibatan pembentukan kompleks diastereomer dalam pemilihan fase gerak (Fang dkk, 2013). Fase gerak yang dipilih adalah asetronitril (ACN) dan trietilamonium (TEAA) dengan hasil sebagai berikut.

Tabel 1. Hasil Pemisahan Variasi Fase Gerak

Fase Gerak	k_1	A	R_s
95:5	-	-	0,000
90:10	0,19	1,21	0,874
85:15	0,23	2,75	6,574
80:20	0,25	1,89	1,466
75:25	0,14	1,47	0,573

Berdasarkan hasil tersebut, campuran ACN-TEAA (85:15) merupakan eluen yang paling sesuai untuk dilakukan percobaan lebih lanjut. Metode KCKT cara langsung menggunakan fase diam kiral telah menunjukkan banyak keuntungan dalam enantioseparation senyawa kiral, seperti fleksibilitas, selektivitas yang luas, efisiensi dan relatif mudah dioperasikan, dan telah banyak diterapkan. Yang paling penting, teknik KCKT kiral sebagai alat preparatif juga menunjukkan prospek industri yang baik. Pemisahan yang jauh lebih cepat dibanding cara tidak langsung. Namun, metode ini jarang diteliti dalam beberapa tahun terakhir dikarenakan kurang ekonomis.

Metode KCKT Fase Gerak Kiral

Dalam pendekatan ini, resolusi kiral dihasilkan dengan mencampurkan kiral selektor yang cocok ke dalam fase gerak. Kiral selektor yang biasa digunakan adalah siklodekstrin, penukar ligan, protein, antibiotik makrosiklik, dan sebagainya. Namun demikian, hanya penukar ligan yang digunakan dalam pemisahan kiral fluorokuinolon (Elbashir dkk, 2010).

Keuntungan teknik ini adalah sederhana dan mudah dilakukan, selain itu juga tidak memerlukan derivatisasi kiral. Pemisahan enansiomer ini menggunakan penukar ligan atau zat aditif (penambahan) siklodekstrin sebagai fase gerak kiral.

1. Penambahan Penukar Ligan ke Dalam Fase Gerak

Kromatografi cair menggunakan penukar ligan yang ditambahkan ke dalam fase gerak diperkenalkan sejak tahun 1960an sebagai metode pemisahan suatu analit rasemat. Prinsip dasar dari pendekatan ini adalah keterlibatan logam pengompleks ion ke dalam

interaksi antara analit enansiomer agar menjadi suatu kompleks diastereomer terner. Enansiomer fluorokuinolon, termasuk ofloksasin, dapat dipisahkan menggunakan pendekatan ini (Elbashir dkk, 2010).

Tabel 2. Pemisahan Enansiomer Ofloksasin metode KCKT dengan Penambahan Penukar Ligan pada Fase Gerak Kiral

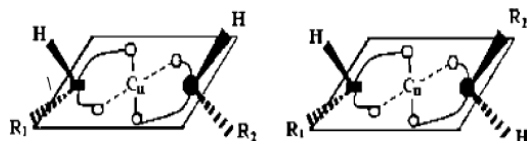
Fase Gerak	Aditif Fase Gerak Kiral (AFGK)	Fase Diam	Detektor	Referensi
AFGK:Metanol 85:15	1,2mmol/L L-fenilalanin dan 1mmol/L tembaga(II) sulfat	Kolom C18	FL $\lambda_{em} = 505 \text{ nm}$	Yan dan Row, 2007
AFGK:Metanol-air 88:12	10 mmol/L L-leucine dan 5 mmol/L tembaga(II) sulfat	Kolom C18	UV 293 nm	Yan dan Row, 2007
AFGK:Metanol-air 88:12	4mmol/L tembaga(II) sulfat dan 5mmol/L L-isoleusin	Kolom C18	FL $\lambda_{ex} = 303 \text{ nm}$	Shao dkk, 2008
AFGK:Metanol-air 12:88	9 mM L-isoleusin dan 4 mM tembaga sulfat pH 3,07	Kolom C18	UV 293 nm	Oktasari, 2014
AFGK:Metanol-air 12:88	4 mM L-isoleusin dan 9 mM tembaga(II) sulfat laju alir 0,8 mL/menit	Kolom C18	UV 293 nm	Hendrati dkk, 2015

Prinsip pemisahan kromatografi pertukaran ligan, yaitu melalui pembentukan diastereomer (kompleks) dengan melibatkan asam amino (L-fenilalanin, L-isoleusin, L-leusin, dll) sebagai ligan pengompleks dan logam tembaga (II) dari reagen tembaga (II) sulfat sebagai atom pusat, yang ditambahkan ke dalam fase gerak.

Senyawa kompleks merupakan senyawa yang tersusun dari suatu ion logam pusat dengan satu atau lebih ligan yang

menyumbangkan pasangan elektron bebasnya kepada ion logam pusat. Donasi pasangan electron ligan kepada ion logam pusat menghasilkan ikatan kovalen koordinasi (Cotton dan Wilkinson, 1989).

Tembaga (II) memiliki stabilitas kompleks yang paling besar dengan senyawa ofloksasin jika dibandingkan dengan logam transisi deret pertama yang lain dan paling stabil jika dibandingkan dengan bilangan oksidasi tembaga lain.



Gambar 2. Skema Struktur Senyawa Kompleks Ligan dari Ofloksasin, Asam Amino, dan Ion Logam (Tian *et al.*, 2010)

Stereoisomer cis memiliki waktu retensi lebih cepat daripada trans dikarenakan terdapat interaksi intramolekul antara asam amino dengan (S)-ofloxacin, sehingga penyerapan oleh kolom menjadi lemah. Sementara itu, posisi trans antara asam amino dan (R)- ofloxacin berjauhan, sehingga tidak ada interaksi intramolekul. Interaksi antar molekul terjadi untuk trans-stereoisomer pada kolom, sehingga waktu retensi lebih lama (Hendrati, 2015).

2. Penambahan Siklodekstrin

Fase gerak kiral dengan penambahan siklodekstrin dan turunannya sangat efektif dalam pemisahan enansiomer namun memerlukan biaya yang besar dan fase gerak yang mengandung selektor kiral ini tidak dapat digunakan kembali. Metode ini memberikan hasil pemisahan dua enansiomer yang sangat baik dengan resolusi lebih dari 2 (Yeole dkk, 2006).

KESIMPULAN

Metode pemisahan enansiomer ofloksasin dapat dilakukan dengan KCKT fase diam kiral maupun penambahan penukar ligan/siklodekstrin ke dalam fase gerak. Kedua cara ini memiliki keunggulan dan kelemahannya masing-masing. Penggunaan dengan fase diam kiral memiliki waktu yang singkat namun kurang ekonomis, sementara penambahan penukar ligan/siklodekstrin lebih ekonomis dengan waktu retensi yang lebih panjang. Mengingat pentingnya pengembangan metode pemisahan enansiomer, penelitian ataupun review lebih lanjut dengan metode lain diperlukan untuk mendapatkan referensi dan hasil terbaik.

DAFTAR PUSTAKA

- Bi, W.T., Tian, M.L., Row, K.H. 2011: Chiral separation and determination of ofloxacin enantiomers by ionic liquid-assisted ligand-exchange chromatography. *Analyst*, 136: 379–387.
- Cheng, F.C., T.R. Tsai, Y.F. Chen, L.C. Hung & T.H. Tsai. 2002. *Journal of Chromatography A*: 131-961.
- Cotton, F.A. dan Wilkinson, G. 1989. *Kimia Anorganik Dasar*. Penerbit Universitas Indonesia. Jakarta
- Davankov, V.A. 2012. *Chiral Separation by HPLC Using the Ligand-Exchange Principle*. Humana Press, Inc. New York.
- Elbashir, A.A., Bahruddin, S., and Hassan Y.A.E. 2010. Recent Developments of Enantioseparations for Fluoroquinolones Drugs Using Liquid Chromatography and Capillary Electrophoresis Egypt. *Pharmaceutical and Medicinal Chemistry Department*.
- Eliopoulos, G.M., Wennersten, C.B., Moellering, R.C. 1996. Comparative invitro activity of levofloxacin and ofloxacin against Gram-positive bacteria. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, 25: 35–41.
- Fang, Z., Guo, Z., Qin, Q., Fan, J., Yin, Y., Zhang, W. 2013. Semi-Preparative Enantiomeric Separation of Ofloxacin by HPLC. *Journal of Chromatographic Science*, 51: 133–137.
- Hendrati, D., Bahti H.H., Pratomo, U., & Dewianti, Z.P. 2015. Forming of Diastereoisomer with L-Isoleucin to Separate Ofloxacin Enantiomer Using Preparative Liquid Chromatography. *Chimica et Natura Acta*, 3.
- Horstkotter, C. Dan Blaschke, G. 2001. Stereoselective determination of ofloxacin and its metabolites in human urine by capillary electrophoresis using laser-induced fluorescence detection. *Journal of Chromatography B*, 754: 169–178.
- Lin, F.-M., Kou, H.-S., Wu, S.-M., Chen, S.-H., Wu, H.-L. 2004. Capillary electrophoresis analysis of gabapentin and vigabatrin in pharmaceutical preparations. *ofloxacin*

- derivatives. *Analytica Chimica Acta*, 523: 9–14.
- Oktasari, S. 2014. *Pemisahan Enansiomer Ofloksasin Melalui Pembentukan Diastereoisomer dengan L-Isoleusin Menggunakan Kromatografi Cair Kinerja Tinggi*. Universitas Padjadjaran Jurusan Kimia. Jatinangor.
- Pimenta, A.M., Souto, M.R.S., Catarino, R.I.L., Leal, M.F.C., Lima, J.L.F.C. 2011. Determination of ofloxacin in pharmaceuticals, human urine and serum using a potentiometric. *Sensor Electroanalysis*, 23: 1013–1022.
- Schmid, M.G dan Gerald G. 2011. Chiral Separation by Ligand-Exchange. *Macedonian Journal of Chemistry and Chemical Engineering*, 30(2): 127-137.
- Sevgi, T.U. 2019. Rapid and sensitive spectrofluorimetric determination of enrofloxacin, levofloxacin and ofloxacin with 2,3,5,6-tetrachlorop-benzoquinone; *Spectrochimica Acta*, 72: 1038–1042.
- Shao, B., Sun, X., Zhang, J., Hu, J., Dong, H., Yang, Y. 2008. Determination of ofloxacin enantiomers in sewage using two-step solidphase extraction and liquid chromatography with fluorescence detection. *J. Chromatogr. A*, 1182: 77-84.
- Singh, M., Sethi, S., Bhushan, R. 2019. Liquid chromatographic methods for separation, determination and bioassay of enantiomers of etodolac: A review. *Journal of Separation Science*, 1-40.
- Tian, M., H.S. Row., K.H Row. 2010. Chiral Separation of Ofloxacin Enantiomers by Ligand Exchange Chromatography. *Monatsh Chem*, 141: 285–290.
- Yan dan Row, K.H. 2007. Rapid Chiral Separation and Impurity Determination of Levofloxacin by Ligand-Exchange Chromatography. *Analytica Acta*, 584: 160-165.
- Yan, H. dan Row, K.H. 2007. Direct determination of ofloxacin enantiomers in human urine by ligand exchange chromatography. *J. Liq. Chromatogr. Rel. Technol.*, 30: 1497-1511.
- Yan, H. dan Row, K.H. 2007. Rapid chiral separation and impurity determination of levofloxacin by ligand-exchange chromatography. *Anal. Chim. Acta*, 584: 160-165.
- Yang, C.H., Xu, Y.X., Hu, C.G., Hu, S.S. 2008. Voltammetric detection of ofloxacin in human urine at a congo red functionalized water-soluble carbon nanotube film electrode. *Electroanalysis*, 20: 144–149.

