

PENGARUH MODIFIKASI KOLOM KROMATOGRAFI DENGAN HEPARIN PADA PEMISAHAN ENANSIOMER SENYAWA ANTIMALARIA *CHLOROQUINE*

(Modification effect of chromatographic column with heparin
to enantiomeric separation of antimalarial drug *chloroquine*)

S a f n i*

*Jurusan Kimia Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam
Universitas Andalas Padang

Abstract

The modification effect of chromatographic column with heparin as the stationary phase has been investigated to enantiomeric separation of antimalarial drug *chloroquine*. Mobile phase conditions such as pH, ionic strength and organic modifier affected the enantiomeric separation of *chloroquine*. The optical rotatory (OR) detection of *chloroquine* enantiomers shows the (+)-enantiomer was eluted first. This means that (-)-enantiomer exhibited stronger binding to heparin than (+)-enantiomer. Hydrophobic interaction contributed to the enantio-recognition.

Keywords: kolom kromatografi, modifikasi, heparin, pemisahan enansiomer, chloroquine

PENDAHULUAN

Kemajuan bidang kromatografi dipercepat oleh perkembangan kolom kromatografi dan *packing material* dari kolom yang berfungsi sebagai fasa diam [1]. Berbagai jenis *packing material* telah dikembangkan untuk metode kromatografi cair sejak pertama kali ditemukannya metode ini. Untuk tujuan pendeteksian, *packing material* dengan kapasitas penukar ion yang lebih rendah lebih diminati karena memungkinkan pengelusan dengan konsentrasi rendah. Akan tetapi untuk mengatur kapasitas penukar ion tidaklah mudah.

Para peneliti bidang kromatografi telah melakukan berbagai penelitian untuk meningkatkan efektivitas dan selektivitas dari kolom, termasuk untuk tujuan pemisahan senyawa-senyawa enansiomer [2-5]. Pemisahan enansiomer dari zat-zat obat yang bersifat chiral merupakan suatu hal yang penting untuk tingkat kemurnian obat, karena stereokimia dapat memberikan efek yang berarti bagi aktifitas biologis dari obat.

Dalam penelitian terdahulu telah dilakukan pemodifikasian penukar anion dengan heparin [6]. Heparin adalah ionik polisakarida yang mengandung gugus sulfat dan karboksil yang memungkinkannya teradsorpsi secara interaksi ionik pada permukaan *packing material* yang bermuatan positif. Sifat retensi dan selektivitas dari anion-anion

anorganik pada penukar anion dapat diatur sedemikian rupa setelah pemodifikasian secara elektrostatis dengan heparin [6]. Waktu retensi dari analit anion-anion pada fasa diam yang telah dimodifikasi berkurang dengan berkurangnya konsentrasi pengelusi [6,7]. Hal ini memungkinkan peningkatan sensitifitas dari kolom. Selain untuk pemisahan anion-anion, kolom yang telah dimodifikasi ini juga dapat digunakan untuk pemisahan anion-anion dan kation-kation secara serentak, sehingga dapat mengurangi waktu analisis dan menurunkan biaya analisis.

Heparin yang digunakan sebagai pemodifikasi juga bersifat chiral, sehingga mempunyai potensi untuk digunakan sebagai selektor untuk zat yang bersifat chiral. Heparin sudah digunakan dalam metoda elektroforesis kapiler sebagai selektor untuk zat yang bersifat chiral [8-11]. Pada metoda kromatografi cair, fasa diam yang berikatan dengan heparin secara kimiawi telah dikembangkan untuk afinitas kromatografi dari protein dan juga telah diaplikasikan untuk pemisahan enansiomer. Selagi mekanisme pemisahan senyawa chiral belum bisa dijelaskan, maka masih dibutuhkan banyak penelitian untuk dilakukan.

METODOLOGI PENELITIAN

Peralatan dan reagen yang digunakan

Peralatan yang digunakan terdiri dari: MF-2 Microfeeder (Azumadenki Kogyo, Tokyo, Japan), yang dilengkapi dengan MS-GAN 050 gas tight syringe (0.5 mL; Ito, Fuji, Japan), ML-522 microvalve injector dengan volume injeksi 0.2 μ L (Jasco, Tokyo, Japan), mikrokolom (100 \times 0,32 mm i.d.) dan UV-970 UV detector (Jasco). Kecepatan alir pompa 4.2 μ L/menit.

Pemakaian konvensional kolom QAE-3SW (50 \times 4,6 mm i.d) (Tosoh, Tokyo, Japan) dilengkapi dengan sebuah pompa 880-PU HPLC dengan kecepatan alir 1,0 mL/menit, injector dengan volume injeksi 20 μ L, detector UV UVIDEC-100 V dan Optical rotation OR-900 yang dipasang bersamaan.

Semua reagen yang digunakan dan garam natrium dari heparin diperoleh dari Nacalai Tesque (Kyoto, Japan). Bufer posfat dibuat dari K_2HPO_4 dan KH_2PO_4 . Bufer asetat dibuat dari CH_3COOH dan CH_3COONa . Reagen digunakan tanpa perlakuan tambahan. Akuades diperoleh dengan menggunakan Milli-Q Plus system (Millipore, Molsheim, France). Gambar 1 memperlihatkan struktur dari *chloroquine*.



Gambar 1. Struktur Chloroquine

Prosedur Kerja

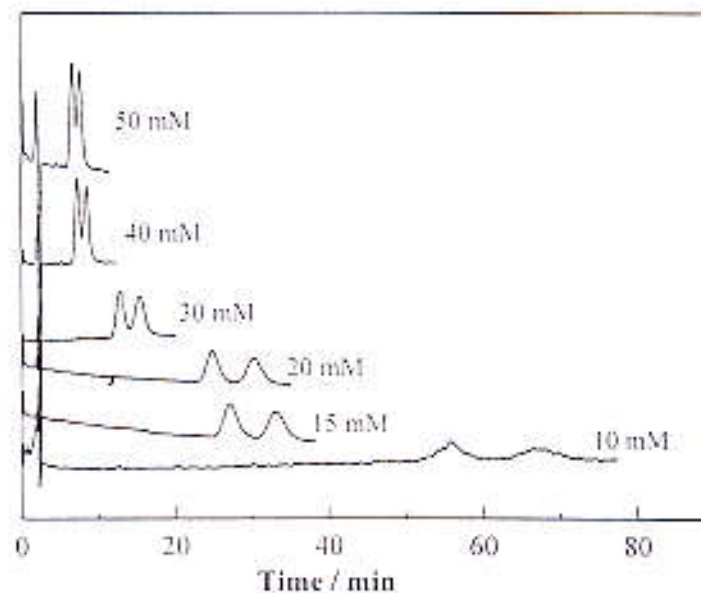
Kolom dicuci dengan 0.05 mL akuades, 0.2 mL 10 mM natrium sulfat, dan 0.05 mL akuades dengan kecepatan alir 4,2 $\mu\text{L}/\text{menit}$ untuk mikrokolom dan 1,0 mL/menit untuk kolom konvensional. 0,1-1,0% larutan heparin dialirkan ke kolom dengan kecepatan alir yang sama selama 2 jam, diakhiri dengan pencucian menggunakan akuades sampai *baseline* grafik pada detektor terlihat stabil. Selanjutnya dilakukan pemisahan enansiomer terhadap *chloroquine* dengan mengalirkan larutan *chloroquine* ke kolom yang sudah dimodifikasi dengan memakai larutan bufer yang ditambahkan asetonitril sebagai pengelusi.

HASIL DAN DISKUSI

Sebelum pemodifikasian dengan heparin, kolom tidak dapat digunakan untuk pemisahan senyawa enansiomer. Setelah pemodifikasian, dilakukan pemisahan enansiomer terhadap senyawa *chloroquine* dan diamati pengaruh fasa gerak terhadap pemisahan dengan cara memvariasikan konsentrasi bufer, pH larutan dan konsentrasi asetonitril. Hasil yang diperoleh ternyata komposisi dan pH dari fasa gerak sangat mempengaruhi pemisahan dari senyawa enansiomer.

Pengaruh dari konsentrasi bufer

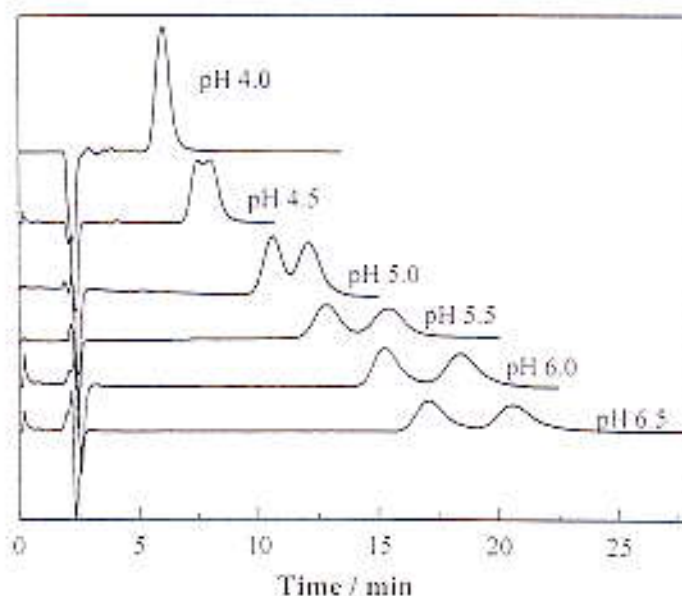
Pengaruh dari konsentrasi bufer terhadap pemisahan senyawa enansiomer *chloroquine* diuji dengan menggunakan larutan bufer asetat dengan konsentrasi 10 – 50 mM pada pH 5,5 yang mengandung 30% asetonitril. Resolusi pemisahan yang baik dapat dicapai dengan menggunakan fasa gerak yang mengandung bufer asetat dengan konsentrasi 10 sampai 50 mM, seperti terlihat pada Gambar 2.



Gambar 2. Pengaruh konsentrasi bufer asetat terhadap pemisahan enansiomer senyawa *chloroquine*

Pengaruh dari pH larutan

Pengaruh pH larutan bufer terhadap enansioselektivitas diuji dengan menggunakan larutan bufer (pH 4,0 – 7,0) dengan konsentrasi 30 mM yang mengandung 20% asetonitril. Retensi dan selektivitas dari *chloroquine* sangat tergantung pada pH, seperti diperlihatkan pada Gambar 3. Selektivitas yang baik dari *chloroquine* dapat dicapai pada pH 5,5 sampai 6,0. Penurunan resolusi pada pH tinggi dapat disebabkan oleh penurunan *charged density* pada *quinoline ring*, sebaliknya sifat hidrofobik bertambah. Nilai pH merupakan faktor yang penting diperhatikan untuk pemisahan senyawa-senyawa enansiomer lainnya.



Gambar 3. Pengaruh pH terhadap pemisahan enansiomer senyawa *chloroquine*.

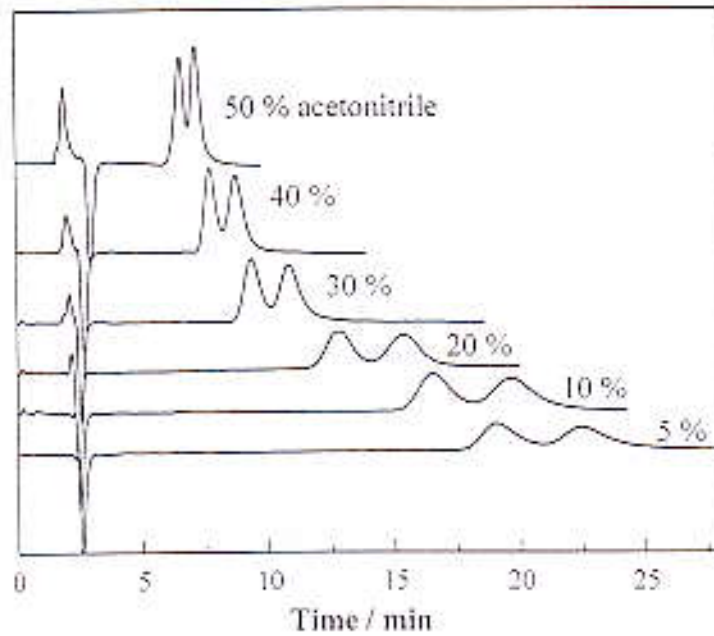
Pengaruh dari konsentrasi asetonitril

Asetonitril digunakan sebagai *organic modifier*. Gambar 4 memperlihatkan bahwa konsentrasi asetonitril mempengaruhi enansioselektivitas dari *chloroquine*. Selektivitas yang optimum untuk *chloroquine* dicapai pada konsentrasi 20% (v/v) asetonitril. Penambahan dari *organic modifier* menurunkan waktu retensi dari analit.

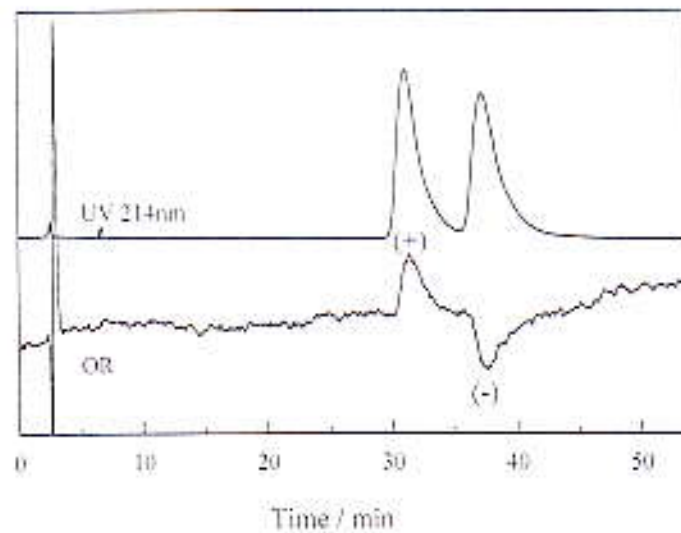
Pemisahan enansiomer senyawa chloroquine

Pada kolom IC-Anion-SW yang dimodifikasi dengan heparin, pemisahan enansiomer yang baik dari senyawa *chloroquine* dapat diperoleh dengan menggunakan larutan bufer asetat 30 mM (pH 5,5), dengan faktor pemisahan 1,24. Kekuatan ion dari fasa gerak mempengaruhi pemisahan enansiomer dari senyawa *chloroquine*. Sifat retensi, selektivitas dan resolusi dari *chloroquine* menurun saat menggunakan larutan bufer posfat sebagai fasa gerak pada kolom konvensional QAE-3SW yang dimodifikasi dengan 1,0 % heparin. Karakteristik ini konsisten dengan tipe mekanisme dari pertukaran ion. Gambar 5 memperlihatkan pemisahan enansiomer dari *chloroquine* dengan menggunakan detektor UV dan OR sebagai pendeteksi. Dengan menggunakan detektor OR, pemisahan

enansiomer dari *chloroquine* memperlihatkan bahwa bentuk (+)-enansiomer terelusi terlebih dahulu. Hal ini menunjukkan bahwa bentuk (-)-enansiomer lebih terikat kuat kepada heparin daripada bentuk (+)-enansiomer. Interaksi hidrofobik seperti halnya interaksi ionik mempengaruhi pemisahan dari senyawa enansiomer ini.



Gambar 4. Pengaruh konsentrasi asetonitril terhadap pemisahan enansiomer senyawa *chloroquine*



Gambar 5. Pemisahan enansiomer senyawa *chloroquine*

UCAPAN TERIMAKASIH

Ucapan terimakasih kepada Prof. T. Takeuchi, Prof. T. Miwa dan Lembaga Penelitian Universitas Andalas yang telah memberikan dukungan dan bantuan untuk terwujudnya artikel hasil penelitian ini.

DAFTAR PUSTAKA

1. T. Hanai, H. Hatano, *Advances in Liquid Chromatography*, World Scientific, Singapore, 1996.
2. Y. Okamoto, E. Yashima, *Angew. Chem. Int. Ed.* 37 (1998) 1020
3. A. V. Overbeke, W. Baeyens, H. Oda, H. Y. Aboul-Enein, *Chromatographia* 43 (1996) 599.
4. S. Hara, A. Dobashi, *J. Chromatogr.* 186 (1979) 543.
5. A. Davankov, Y. A. Zolotarev, *J. Chromatogr.* 155 (1978) 295.
6. T. Takeuchi, Safni, T. Miwa, Y. Hashimoto, H. Moriyama, *Analisis* 26 (1998) 61-64.
7. Safni, T. Takeuchi, T. Miwa, Y. Hashimoto, H. Moriyama, *J. Chromatogr. A* 850 (1999) 65-72.
8. H. Nishi, K. Nakamura, H. Nakai, T. Sato, *Anal. Chem.* 67 (1995) 2334.
9. H. Nishi, *J. Chromatogr. A* 735 (1996) 345.
10. N.M. Agyei, K.H. Gahm, A. M. Stalcup, *Anal. Chim. Acta* 307 (1995) 185.
11. A. M. Stalcup, K. H. Gahm, M. Baldueza, *Anal. Chem.* 68 (1996) 2248.

Biodata Peneliti

1. Nama : Dr. Safni, M.Eng.
2. Tempat dan tanggal lahir : Bukittinggi/ 12 Mei 1967.
3. NIP. : 131.912.580
4. Alamat
- Rumah : Komplek Taruko II Blok E/10 Padang,
Sumatera Barat, Indonesia, 25156.
Telp : 496818
e-mail : safni@yahoo.com
- Kantor : Jurusan Kimia, FMIPA Universitas Andalas
Kampus Limau Manis Padang, Sumbar.
Telp : (0751) 71681
Fax : (0751) 73118
e-mail : kimiaua@indo.net.id

5. Latar Belakang Pendidikan:

No.	Pendd	Universitas/Institut	Gelar	Tahun	Bidang studi
1	Sl	Unand, Padang	Dra.	1985-1989	Kimia Analisis