

## Review :Validasi Metode Analisis Kromatografi Cair Untuk Senyawa Anti Kanker

### Review: Validation of Liquid Chromatography Analysis Methods for Anti-cancer Compounds

Grace Natasya Hutauruk

Program Studi Profesi Apoteker, Fakultas Farmasi, Universitas Padjadjaran

Corresponding Author:

[grace18002@mail.unpad.ac.id](mailto:grace18002@mail.unpad.ac.id)

#### ARTICLE HISTORY

Received [07 Mei 2023]

Revised 22 Juni 2023]

Accepted [28 Juni 2023]

#### Kata Kunci :

Validasi, Kromatografi Cair, Anti kanker

#### Keywords :

Validation, Liquid Chromatography, Anti-cancer

This is an open access

article under the [CC-BY-SA](https://creativecommons.org/licenses/by-sa/4.0/) license



#### ABSTRAK

**Pendahuluan:** Kanker merupakan penyakit dengan berbagai variasi dan tingkat morbiditas tinggi. Terapi kanker mengalami perkembangan yang signifikan dengan munculnya senyawa anti kanker baru dan penggunaan kombinasi senyawa anti kanker. Oleh karena itu diperlukan metode analisis yang sederhana dan sesuai untuk analisis senyawa anti kanker dalam berbagai bentuk sampel. Kromatografi cair merupakan metode analisis yang umum dilakukan. Pada review ini akan memberikan informasi validasi metode analisis kromatografi cair dalam analisis senyawa antikanker. Parameter yang diamati adalah linearitas, akurasi dan presisi, sensitivitas dan spesifisitas, serta kesesuaian sistem.

#### ABSTRACT

**Introduction:** Cancer is a disease with many variations and a high level of morbidity. Cancer therapy has significant development with the emergence of new anti-cancer compounds and using combinations of anti-cancer compounds. Therefore, a simple and appropriate analytical method is needed for the analysis of anti-cancer compounds in various sample forms. Liquid chromatography is a common method of analysis. This review will provide information on the validation of liquid chromatography analysis methods in the analysis of anticancer compounds. Parameters observed were linearity, accuracy and precision, sensitivity and specificity, and system suitability.

## PENDAHULUAN

Penyakit kanker terjadi akibat pembelahan tidak terkendali dari sel-sel tubuh abnormal dengan kemampuan untuk menyebar ke seluruh tubuh dan merusak jaringan tubuh normal. Berdasarkan studi populasi yang dilakukan oleh (Wilson et al., 2019), estimasi pasien yang membutuhkan kemoterapi mengalami peningkatan relatif sekitar 53% dengan indikasi utama kanker paru, kanker payudara, dan kanker kolorektal. Jumlah kasus yang terus meningkat dan banyaknya variasi dari jenis kanker mengakibatkan meningkatnya jumlah dan jenis anti kanker yang dikembangkan.

Untuk mencapai efek sitotoksik yang diinginkan dari anti kanker pada pasien, obat antikanker harus memiliki kemurnian yang baik dan bebas dari senyawa lain yang dapat membahayakan pasien. Metode analisis yang baik dapat mendukung optimasi dan pengembangan terapi pasien (Plesnik et al., 2022).

Dalam fase uji klinis obat dan senyawa anti kanker tidak terlepas dari metode analisis kuantitatif dengan sensitivitas dan selektifitas yang baik. Pengembangan dan validasi metode analisis anti kanker secara berkesinambungan terus berlanjut untuk mendapatkan spesifikasi yang dibutuhkan (Ferreira et al., 2020).

Validasi metode analisis memegang peran esensial dalam evaluasi kimia senyawa. Validasi metode merupakan prosedur pengujian untuk verifikasi bahwa suatu sistem analisis sesuai dan mampu untuk memberikan data analitikal yang sah dan bermanfaat (Rao, 2018).

Metode analisis yang telah berkembang dan umum digunakan untuk anti kanker antara lain adalah kromatografi cair (liquid chromatography) pada sampel sediaan farmasetik maupun spesimen biologi. Metode analisis yang baik memiliki dampak besar pada penelitian dan quality control. Validasi metode HPLC untuk setiap obat dalam suatu campuran menunjukkan tidak ada interferensi antar senyawa dalam kondisi yang diuji (Guichard et al., 2019).

## METODE PENELITIAN

Dalam review artikel ini menggunakan metode pengumpulan data primer. Data primer yang digunakan berasal dari pencarian langsung jurnal secara online menggunakan mesin pencari PubMed dan Google Scholar, Kata kunci pencarian yang dilakukan adalah "analytical method", "validation", "liquid chromatography", "anticancer", "chromatography validation" dan "validation of analytical method".

Pencarian lebih lanjut dilakukan dengan skринing data primer yang sesuai untuk digunakan

dalam penulisan artikel. Kriteria inklusi yang digunakan adalah pustaka yang diterbitkan 10 tahun terakhir dari berbagai obat anti kanker sehingga didapatkan data yang up to date.

## HASIL

### Metode Kromatografi

Kromatografi merupakan metode analisa dengan pemisahan komponen dalam suatu pelarut. Dalam analisa obat-obatan anti kanker, metode kromatografi dapat digunakan untuk memisahkan fraksi predominant senyawa (Plesnik et al., 2022) dan mengetahui profil keamanan in vivo dari kombinasi obat kanker (Mangla et al., 2020). Metode kromatografi yang digunakan antara lain HPLC, RP-HPLC, dan UPLC.

Kelebihan metode kromatografi cair antara lain adalah sensitivitas dan selektifitas yang tinggi dengan akurasi yang baik serta dapat mendeteksi banyak senyawa secara bersamaan. Oleh karena itu metode kromatografi cair dapat digunakan dalam quality control sediaan farmasi (Reinders et al., 2021).

### High Performance Liquid Chromatography (HPLC)

HPLC merupakan suatu metode yang paling umum digunakan dalam analisa senyawa anti kanker. HPLC memiliki sensitivitas tinggi sehingga dapat digunakan dalam analisis sampel dengan jumlah yang sedikit dan penentuan analit dengan konsentrasi rendah dalam matriks (Esim et al., 2020).

### Reversed-Phase High Performance Liquid Chromatography (RP-HPLC)

RP-HPLC merupakan pengembangan dari teknik HPLC, dimana fase gerak menjadi non polar dan fase gerak menjadi polar dengan campuran pelarut organik, air, dan larutan penyangga. Kelebihan metode ini adalah reproduksibilitas dan recovery yang lebih baik dalam waktu yang lama (Amirtharaj & Lavanya, 2021).

### Ultra Performance Liquid Chromatography (UPLC)

Sebagai salah satu metode kromatografi cair, UPLC memiliki waktu ekuilibrasi yang lebih singkat dan kecepatan deteksi yang lebih baik bila dibandingkan dengan metode HPLC karena dead volume yang lebih kecil (Li et al., 2022).

Parameter validasi kromatografi cair adalah :

- a. Linearitas  
Linearitas menunjukkan kemampuan metode analisis untuk mendapatkan hasil uji yang berbanding lurus dengan konsentrasi analit dalam sampel. Korelasi antara rasio luas puncak dengan konsentrasi didapatkan dengan regresi linear dari kurva kalibrasi larutan stok (Llopis et al., 2021).
- b. Akurasi dan Presisi  
Akurasi menunjukkan kedekatan nilai dari hasil yang diperoleh dengan metode analisa terhadap nilai sebenarnya. Akurasi ditentukan dengan nilai % recovery dengan syarat uji dalam rentang bervariasi mendekati nilai 100% (Latha et al., 2017). Presisi merupakan tingkat kesamaan hasil setiap uji yang dilakukan dengan pengulangan uji pada sampel homogen. Nilai presisi dapat menunjukkan indikasi kesalahan hasil uji dalam bentuk % RSD dengan syarat < 2% . Presisi ditentukan dalam presisi intra-day (satu hari) ,presisi inter-day (beberapa hari), dan repeatability. Sebagai bagian dari penentuan presisi, repeatability menunjukkan variasi analisis pada kondisi pengujian yang sama dalam waktu singkat. Semakin rendah presisi inter-day menunjukkan reproduksibilitas metode analisis (Souza et al., 2021).
- c. Sensitivitas dan Spesifisitas  
Sensitivitas metode pengujian tampak dalam nilai Limit of Detection (LOD) yaitu konsentrasi terkecil analit yang dapat terdeteksi dan Limit of Quantification (LOQ) yaitu konsentrasi terkecil analit yang dapat diukur secara akurat dan presisi. Semakin rendah LOD dan LOQ maka semakin sensitif metode uji (Zakkula et al., 2019). Spesifisitas metode menunjukkan kemampuan metode dalam deteksi analit walaupun terdapat bahan lain untuk memastikan hasil yang diperoleh tidak terpengaruh oleh zat pengotor. Spesifisitas metode analisa kromatografi pada obat anti kanker baik, dengan bentuk puncak terpisah dan resolusi yang tinggi. Oleh karena itu, metode kromatografi tepat untuk digunakan untuk analisa obat kanker campuran (Kumbhar et al., 2020).
- d. Kesesuaian Sistem  
Kesesuaian sistem berfungsi sebagai verifikasi resolusi dan reproduktifitas sistem untuk analisis

yang dilakukan. Tujuannya ialah untuk memastikan kelengkapan sistem pengujian termasuk instrumen, reagen, dan kolom yang digunakan. Kesesuaian sistem dapat diamati dengan waktu retensi, tailing factor, dan efisiensi kolom dengan parameter jumlah plat teoritis (Kumar & Gandla, 2021).

**Tabel 1 Parameter Validasi Metode Analisis pada Anti Kanker**

Senyawa	Sampel	Metode	Kolom	Fase gerak	Panjang Gelombang (nm)	LOD (µg/ml)	LOQ (µg/ml)	Ref
Paclitaxel Sulforaphane	Formulasi mikroemulsi	HPLC-UV	C18 (250 x 4.6 mm) Kinetex	Acetonitrile : KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> (60 :40) isokratik	202	0.1638 0.4419	0.4964 1.3389	(Kamal & Nazzal, 2019)
Carboplatin Decitabine	Sediaan Farmasi	Reversed-Phase HPLC	C18 (250 x 4,6 ;5µm) Xselect CSH	Metanol : H <sub>2</sub> O (3:97) isokratik	220	0.04 0.10	0.13 0.31 Loq	(Esim et al., 2020)
Cyclopamine Paclitaxel	Sampel Biologi	UPLC-MS/MS	C18 (50 x 2.1 mm, 1.9 µm) Hypersil GOLD™	Asam Format : Asetonitril	-	-	0.5 ng/ml	(Hsiao et al., 2019)
Nilotinib Gemcitabine	Tablet	RP-HPLC	C18 (4.6 x 150mm, 5µm, Make: XTerra)	Asetonitril : H <sub>2</sub> O 50:50	242	0.0421 0.047	0.1276 0.1424	(Kumar & Gandla, 2021)
Imatinib Cabacitabine	Tablet	HPLC	C18 (4.6 x 150mm, 5µm, Make: XTerra)	Asetonitril : H <sub>2</sub> O 50:50	242	0.0421 0.047	0.1276 0.1424	(Raja et al, 2015)
Temozolomide	Kapsul	HPLC	C18 (4.6 x 150mm, 5µm)	Asetat : Asetonitril (90:10)	260	0.02	0.06	(Kapçak & Şatana-Kara, 2018)
CHC Cetuximab	Zat aktif	HPLC	C18	Asetonitril : H <sub>2</sub> O	245 280	0.48 0.19	1.49 0.56	(Ferreira et al., 2020)
Paclitaxel Doxorubicin	Zat aktif	RP-HPLC	C18 (100, 250mm x 4:6mm)	Asetonitril : H <sub>2</sub> O	231	0.021 0.012	0.066 0.038	(Saklani et al., 2022)

## KESIMPULAN DAN SARAN

Berdasarkan review artikel yang dilakukan, metode analisa senyawa obat anti kanker dengan menggunakan kromatografi cair dapat dilakukan pada sampel biologis maupun sediaan farmasi. Parameter validasi yaitu linearitas, akurasi, presisi, sensitivitas, spesifitas, dan kesesuaian sistem memenuhi syarat sehingga tepat digunakan dalam pengembangan terapi kanker maupun untuk tujuan quality control sediaan obat kanker.

## DAFTAR PUSTAKA

- Amirtharaj, R. V., & Lavanya, S. (2021). Development and validation of RP-HPLC and UV method for erlotinib hydrochloride tablets. *IP International Journal of Comprehensive and Advanced Pharmacology*, 6(3), 144–151. <https://doi.org/10.18231/j.ijcaap.2021.026>
- Esim, O., Gumustas, M., Hascicek, C., & Ozkan, S. A. (2020). A novel stability-indicating analytical method development for simultaneous determination of carboplatin and decitabine from nanoparticles. *Journal of Separation Science*, 43(17), 3491–3498. <https://doi.org/10.1002/jssc.202000320>
- Ferreira, N. N., Boni, F. I., Baltazar, F., & Gremião, M. P. D. (2020). Validation of an innovative analytical method for simultaneous quantification of alpha-cyano-4-hydroxycinnamic acid and the monoclonal antibody cetuximab using HPLC from PLGA-based nanoparticles. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 190. <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2020.113540>
- Guichard, N., Rudaz, S., Bonnabry, P., & Fleury-Souverain, S. (2019). Validation and uncertainty estimation for trace amounts determination of 25 drugs used in hospital chemotherapy compounding units. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 172, 139–148. <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2019.04.042>
- Hsiao, C. H., Zhao, J., Gao, S., Farhan, N., Wang, Y., Li, C., & Chow, D. S. L. (2019). Development and validation of a rapid and sensitive UPLC–MS/MS assay for simultaneous quantification of paclitaxel and cyclopamine in mouse whole blood and tissue samples. *Biomedical*

- Chromatography, 33(9). <https://doi.org/10.1002/bmc.4518>
- Kamal, M. M., & Nazzal, S. (2019). Development and validation of a HPLC-UV method for the simultaneous detection and quantification of paclitaxel and sulforaphane in lipid based self-microemulsifying formulation. *Journal of Chromatographic Science*, 57(10), 931–938. <https://doi.org/10.1093/chromsci/bmz068>
- Kapçak, E., & Şatana-Kara, E. H. (2018). Development and full validation of a stability-indicating HPLC method for the determination of the anticancer drug temozolomide in pharmaceutical form. *Turkish Journal of Pharmaceutical Sciences*, 15(3), 271–277. <https://doi.org/10.4274/tjps.43265>
- Kumar, D. V., & Gandla, K. (2021). Method Development and Validation of Anticancer Drugs ( Nilotinib and Gemcitabine ) By Rp-Hplc Method. 7(11), 150–160.
- Kumbhar, P. S., Diwate, S. K., Mali, U. G., Shinde, T. U., Disouza, J. I., & Manjappa, A. S. (2020). Development and validation of RP-HPLC method for simultaneous estimation of docetaxel and ritonavir in PLGA nanoparticles. *Annales Pharmaceutiques Francaises*, 78(5), 398–407. <https://doi.org/10.1016/j.pharma.2020.07.004>
- Latha, S. T., Ananda Thangadurai, S., Jambulingam, M., Sereya, K., Kamalakannan, D., & Anilkumar, M. (2017). Development and validation of RP-HPLC method for the estimation of Erlotinib in pharmaceutical formulation. *Arabian Journal of Chemistry*, 10, S1138–S1144. <https://doi.org/10.1016/j.arabjc.2013.02.006>
- Llopis, B., Robidou, P., Tissot, N., Pinna, B., Gougis, P., Aubart, F. C., Campedel, L., Abbar, B., Weil, D. R., Uzunov, M., Gligorov, J., Salem, J. E., Funck-Brentano, C., & Zahr, N. (2021). Development and clinical validation of a simple and fast UPLC-ESI-MS/MS method for simultaneous quantification of nine kinase inhibitors and two antiandrogen drugs in human plasma: Interest for their therapeutic drug monitoring. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 197. <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2021.113968>
- Mangla, B., Alam, O., Rub, R. A., Iqbal, M., Singh, A., Patel, K. S., & Kohli, K. (2020). Development and validation of a high throughput bioanalytical UPLC-MS/MS method for simultaneous determination of tamoxifen and sulphoraphane in rat plasma: Application to an oral pharmacokinetic study. *Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences*, 1152, 122260. <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2020.122260>
- Plesnik, H., Bosnjak, M., Cemazar, M., Sersa, G., & Kosjek, T. (2022). An effective validation of analytical method for determination of a polar complexing agent: the illustrative case of cytotoxic bleomycin (revised version sent to Analytical and Bioanalytical chemistry). *Analytical and Bioanalytical Chemistry*. <https://doi.org/10.1007/s00216-023-04675-x>
- Raja, A. Anusha S., David B., Rao K., Selva K. (2015). Analytical Method Development And Validation of Anticancer Drugs (Imatinib and Cabacitabine) by RP-HPLC Method. *Asian Journal of Research in Chemistry and Pharmaceutical Science* 3(2), 51–65.
- Rao, T. N. (2018). Validation of Analytical Methods. *Analytical Chemistry*, 55(6), 600A-608A. <https://doi.org/10.1021/ac00257a001>
- Reinders, L. M. H., Klassen, M. D., vom Eyser, C., Teutenberg, T., Jaeger, M., Schmidt, T. C., & Tuerk, J. (2021). Quality control of cytostatic drug preparations—comparison of workflow and performance of Raman/UV and high-performance liquid chromatography coupled with diode array detection (HPLC-DAD). *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 413(9), 2587–2596. <https://doi.org/10.1007/s00216-021-03223-9>
- Saklani, R., Tiwari, A. K., Yadav, P. K., Yadav, P., & Chourasia, M. K. (2022). Validated HPLC-UV Method for Simultaneous Estimation of Paclitaxel and Doxorubicin Employing Ion Pair Chromatography: Application in Formulation Development and Pharmacokinetic Studies. *BioMed Research International*, 2022. <https://doi.org/10.1155/2022/7708235>
- Souza, A. L. R. de, Amorim, A. C. F., Cintra, E. R., Ferreira, N. N., Silva, L. A. D., Hayasaki, T. G., Diniz, D. G. A., & Lima, E. M. (2021). Development and validation of a rapid RP-HPLC method for simultaneous quantification of paclitaxel and cetuximab in immunoliposomes. *Talanta*, 225, 121988. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2020.121988>
- Wilson, B. E., Jacob, S., Yap, M. L., Ferlay, J., Bray, F., & Barton, M. B. (2019). Estimates of global chemotherapy demands and corresponding physician workforce requirements for 2018 and 2040: a population-based study. *The Lancet Oncology*, 20(6), 769–780. [https://doi.org/10.1016/S1470-2045\(19\)30163-9](https://doi.org/10.1016/S1470-2045(19)30163-9)
- Zakkula, A., Dittakavi, S., Maniyar, M. M., Syed, N., Sulochana, S. P., Zainuddin, M., & Mullangi, R. (2019). Validated HPLC method for simultaneous quantification of mutant IDH1/2 inhibitors (enasidenib, ivosidenib and vorasidenib) in mouse plasma: Application to a pharmacokinetic study. *Biomedical Chromatography*, 33(11), 1–8. <https://doi.org/10.1002/bmc.4658>