

## Optimasi Metode KCKT-ELSD dengan Pemisahan HILIC untuk Penetapan Kadar Glukosamin Hidroklorida pada Suplemen Kesehatan

Etik Wahyuningsih<sup>1</sup>, Riesta Primaharinastiti<sup>2</sup>, Mochammad Yuwono<sup>2\*</sup>

<sup>1</sup>Program Studi S2 Ilmu Farmasi, Fakultas Farmasi, Universitas Airlangga, Surabaya, Indonesia

<sup>2</sup>Departemen Kimia Farmasi, Fakultas Farmasi, Universitas Airlangga, Surabaya, Indonesia

\*Corresponding author: yuwono05@yahoo.com

Submitted: 11 Februari 2020

Accepted: 15 April 2020

Published: 30 November 2020

### Abstract

**Background:** The analysis of glucosamine hydrochloride in dietary supplements poses several challenges due to the lack of a sufficient UV chromophore and its high polarity. **Objective:** To get optimized condition of high performance liquid chromatography with evaporative light scattering detector (HPLC-ELSD) using a hydrophilic interaction liquid chromatography column (HILIC) for the separation of glucosamine hydrochloride in dietary supplements. **Methods:** The influence of the concentration of ammonium formate, mobile phase pH, and composition of acetonitrile as mobile phase on chromatographic separation of glucosamine hydrochloride in the dietary supplement were investigated in detail. ZIC-HILIC 150 x 4.6 mm, 5  $\mu$ m were used as column and ELSD was used as detector. **Results:** The best separation demonstrating symmetrical peak of glucosamine was achieved under isocratic condition using mobile phase composition of acetonitrile : water : 30 mM ammonium formate (77 : 3 : 20, v/v/v) at pH of 4.5, column temperature of 35°C, flow rate of 1 mL/min, and injection volume of 5  $\mu$ L. The temperatures of nebulization and evaporation were 50°C and 80°C, respectively, and the flow rate of nitrogen was at 1.10 standard liter per minutes (SLM). **Conclusion:** The optimized condition of HPLC with ELSD by using HILIC mode proved to be selective and sensitive for the separation of glucosamine hydrochloride in dietary supplements.

**Keywords:** HPLC-ELSD, HILIC, method optimization, glucosamine hydrochloride, dietary supplements

### Abstrak

**Pendahuluan:** Analisis glukosamin hidroklorida dalam suplemen kesehatan memiliki beberapa kesulitan dikarenakan rendahnya absorpsi pada daerah UV dan sifat kepolarannya yang tinggi. **Tujuan:** Mendapatkan kondisi optimum metode kromatografi cair kinerja tinggi dengan detektor hamburan cahaya evaporatif (KCKT-ELSD) menggunakan kolom kromatografi cair interaksi hidrofilik (HILIC) untuk pemisahan glukosamin hidroklorida dalam suplemen kesehatan. **Metode:** Optimasi kondisi KCKT dilakukan terhadap pengaruh konsentrasi amonium format, pH fase gerak, dan komposisi asetonitril dalam fase gerak pada pemisahan glukosamin hidroklorida dalam suplemen makanan. ZIC-HILIC 150 x 4,6 mm, 5  $\mu$ m digunakan sebagai kolom. Optimasi kondisi ELSD dilakukan terhadap pengaruh suhu nebulasi dan evaporasi. **Hasil:** Pemisahan terbaik yang menghasilkan puncak simetris dari glukosamin hidroklorida dicapai dalam kondisi isokratik menggunakan komposisi fase gerak asetonitril : air : 30 mM ammonium format (77 : 3 : 20, v/v/v) pada pH 4,5, suhu kolom 35°C, laju alir fase gerak 1 mL/menit, dan volume injeksi sampel 5  $\mu$ L. Suhu nebulisasi dan evaporasi berturut-turut adalah 50°C dan 80°C, dengan laju aliran nitrogen adalah 1,10 standar liter per menit (SLM). **Kesimpulan:** Kondisi optimum KCKT-ELSD dengan mode HILIC yang diperoleh dalam penelitian ini menghasilkan kromatogram dengan puncak glukosamin hidroklorida yang simetris, dan terpisah secara selektif dan sensitif dari komponen matriks suplemen kesehatan.

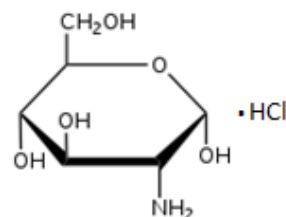
**Kata kunci:** KCKT-ELSD, HILIC, optimasi metode, glukosamin hidroklorida, suplemen kesehatan

## PENDAHULUAN

*Hydrophilic interaction liquid chromatography* (HILIC) merupakan metode pilihan untuk analisis senyawa polar yang saat ini banyak digunakan. HILIC pertama kali diperkenalkan pada tahun 1990 oleh Alpert, menggunakan fase gerak campuran pelarut organik khususnya asetonitril. Secara prinsip model pemisahan dilakukan seperti pada kromatografi fase normal (*Normal Phase*) yaitu dengan kolom fase diam polar sedangkan fase gerak berupa campuran pelarut organik (asetonitril 60-95%) dan pelarut protik yang umumnya adalah air karena mempunyai sifat eluasi yang kuat dan garam mudah menguap seperti ammonium asetat atau amonium format (Ikegami dkk., 2008). Beberapa penelitian menyatakan bahwa HILIC merupakan teknik pemisahan yang efektif untuk senyawa polar seperti protein, peptida, nukleotida dan sediaan farmasi (Guo, 2015). Secara prinsip mekanisme kerja HILIC adalah mekanisme partisi dari analit diantara lapisan air pada fase diam dan fase gerak. Ketebalan lapisan air berbeda-beda tergantung pada tipe kolom (Dinh dkk., 2013). Untuk analit yang mengalami mekanisme partisi, ketebalan lapisan air memegang peranan penting. Selain mekanisme partisi, interaksi *ion-exchange*, ikatan hidrogen, ikatan dipol-dipol dan interaksi hidrofobik juga terjadi pada HILIC. Gaya elektrostatis analit pada fase diam juga memegang peranan penting (Alpert, 2008). Kompleksnya mekanisme retensi dan tersedianya bermacam-macam kolom HILIC mengindikasikan bahwa pengembangan dan optimasi metode tersebut sangat diperlukan, karena adanya perbedaan hidrofobilitas kolom, interaksi ion dan perbedaan struktur kimia analit (Kawachi dkk., 2011).

Glukosamin hidroklorida (Gambar 1) merupakan senyawa yang memiliki polaritas tinggi dengan nilai pKa 8,23 dan log P sebesar -2,175 (Megantara dkk., 2016). Pemilihan HILIC untuk pemisahan glukosamin hidroklorida memiliki keunggulan dibandingkan kolom fase normal dan kolom fase terbalik. Pada kromatografi cair kinerja tinggi (KCKT) kolom fase terbalik (*reversed phase*), senyawa glukosamin hidroklorida dengan polaritas yang tinggi tersebut tidak teretensi kuat pada fase diam sehingga analisis menjadi sulit karena puncak analit seringkali terganggu oleh matriks sampel. Metode KCKT kolom fase terbalik (*reversed phase*) sebelumnya telah dikembangkan dengan menggunakan mode pasangan ion (*ion pairing*) dengan fase gerak yang mengandung pereaksi seperti garam heksana sulfonat atau oktana sulfonat untuk

meningkatkan retensi (Way dkk., 2000). Penggunaan mode pasangan ion memiliki beberapa keterbatasan antara lain mahalnya pereaksi pasangan ion dan dapat mengurangi daya tahan kolom serta dibutuhkan waktu ekuilibrasi yang relatif lama.



**Gambar 1.** Struktur kimia glukosamin hidroklorida

Ditinjau dari struktur kimianya, glukosamin hidroklorida merupakan gula amino yang memiliki serapan lemah pada daerah ultraviolet/visual (UV-VIS). Metode analisis yang secara umum digunakan untuk analisis glukosamin hidroklorida adalah KCKT dengan detektor UV. Masalah yang timbul pada penggunaan detektor UV adalah deteksi glukosamin hidroklorida yang rendah sehingga harus dilakukan derivatisasi lebih dahulu dengan penambahan pereaksi tertentu sebelum dilakukan analisis, sehingga memerlukan waktu yang lebih lama. Detektor lain yang dapat digunakan untuk pemisahan glukosamin hidroklorida adalah indeks bias refraktif (RID), tetapi sensitivitas RID lebih rendah dibandingkan ELSD. Selain itu, detektor lain yang kurang umum digunakan untuk analisis rutin dalam laboratorium pengujian adalah *corona charged aerosol detector* (cCAD) (Chhavi dkk., 2019). Analisis glukosamin pada sediaan suplemen dengan kolom ZIC-HILIC metode UPLC-QToF-MS juga dilaporkan (Zheng dkk., 2017), namun instrumen tersebut mahal dan butuh keahlian khusus dalam operasional instrumen.

Pada penelitian ini dilakukan pengembangan dan optimasi metode KCKT detektor ELSD mode HILIC untuk analisis glukosamin hidroklorida pada sediaan suplemen kesehatan sehingga komponen lain dalam matriks sampel dapat terpisah dan tidak mengganggu selama proses analisis.

## BAHAN DAN METODE

### Bahan

Standar glukosamin HCl (USP, US/Canada), sampel suplemen kesehatan diperoleh dari apotek di Surabaya, amonium format (Sigma-Aldrich), asetonitril HPLC grade (Mallinckrodt), air HPLC grade (Merck, US/Canada), asam klorida (Merck, US/Canada), asam format (Merck, US/Canada).

## Alat

Instrumen KCKT yang digunakan adalah Agilent 1100 series HPLC dengan detektor ELSD Agilent 380 dan pemisahan *zwitterion hydrophilic interaction liquid chromatography* (ZIC-HILIC) *column* ukuran pori 200 Å (SeQuant ZIC-HILIC, 150 mm x 4.6 mm x 5 µm, Merck Millipore, VIC, Australia), *ultrasonic bath* (Elma Transsonic TI-H-25).

## Metode

### Pembuatan larutan baku induk

Stok larutan standar adalah larutan standar glukosamin hidroklorida pada konsentrasi 1000 µg/mL yang disiapkan dari 10,0 mg standar glukosamin hidroklorida (99%) yang dilarutkan dalam air (v/v) dan dicukupkan sampai 10,0 mL dalam labu ukur.

### Preparasi sampel

Sebanyak 20 tablet suplemen kesehatan yang mengandung 500 mg glukosamin hidroklorida ditentukan keseragaman bobotnya kemudian digerus hingga halus. Ditimbang seksama 200 mg sampel yang

telah dihaluskan, dimasukkan ke dalam labu ukur 50 mL, ditambahkan air hingga garis tanda, kemudian disonikasi selama 20 menit dan disaring dengan penyaring membran nilon 0,45 µm dan disuntikkan ke dalam sistem KCKT.

### Optimasi kondisi

Metode pengembangan menggunakan dapar 5, 20 atau 30 mM amonium format dilakukan pada berbagai pH 4,0, 4,5 and 6,0 (fase gerak A), air HPLC 3% (fase gerak B) dan berbagai komposisi asetonitril (60%, 62%, 5%, 72,5 % and 77 %) (fase gerak C). Fase gerak kemudian disaring dengan *Millipore vacuum* menggunakan filter 0,45 µm and disonikasi selama 10 menit sebelum digunakan. Kondisi ELSD adalah temperatur nebulasi diatur pada 50°C, temperatur evaporasi diatur pada 80°C dengan laju alir gas nitrogen sebesar 1,10 standar liter per menit (SLM). Optimasi kondisi analisis glukosamin hidroklorida dapat dilihat pada Tabel 1.

**Tabel 1.** Optimasi kondisi pada analisis glukosamin hidroklorida

Kondisi	I	II	III	IV
Konsentrasi asetonitril	60%	62,5%	72,5 %	77%
pH	4,0	4,5	6,0	-
Konsentrasi dapar	5 mM	20 mM	30 mM	-

## HASIL DAN PEMBAHASAN

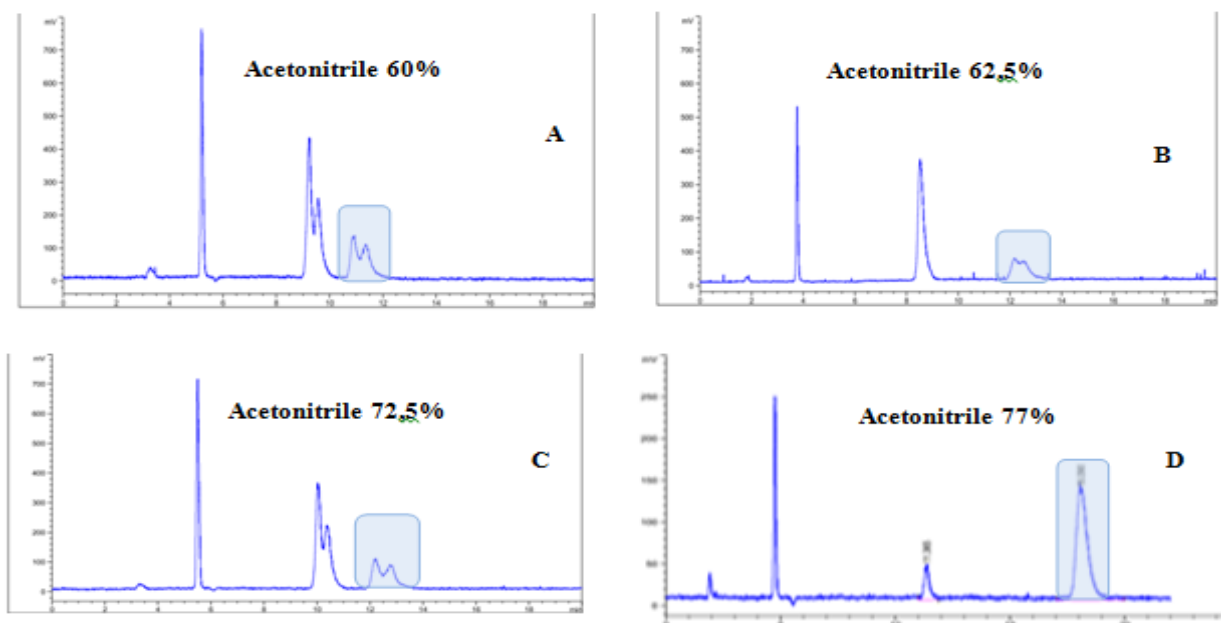
### Optimasi komposisi asetonitril

Asetonitril direkomendasikan sebagai pelarut organik pada HILIC, karena memiliki kemampuan membentuk ikatan hidrogen dan mudah menguap. Pengaruh perbedaan komposisi asetonitril terhadap pemisahan, waktu retensi dan area puncak glukosamin hidroklorida tersaji pada Gambar 2. Pada penelitian ini dilakukan variasi komposisi asetonitril dari 60 - 77% (Gambar 2 A, B, C, D). Ketika asetonitril diubah pada konsentrasi 60%, 62,5%, dan 72,5%, area puncak glukosamin hidroklorida terlihat melebar (Gambar 2 A, B, C). Ketika komposisi asetonitril ditingkatkan 77%, maka resolusi juga meningkat (Gambar 2.D).

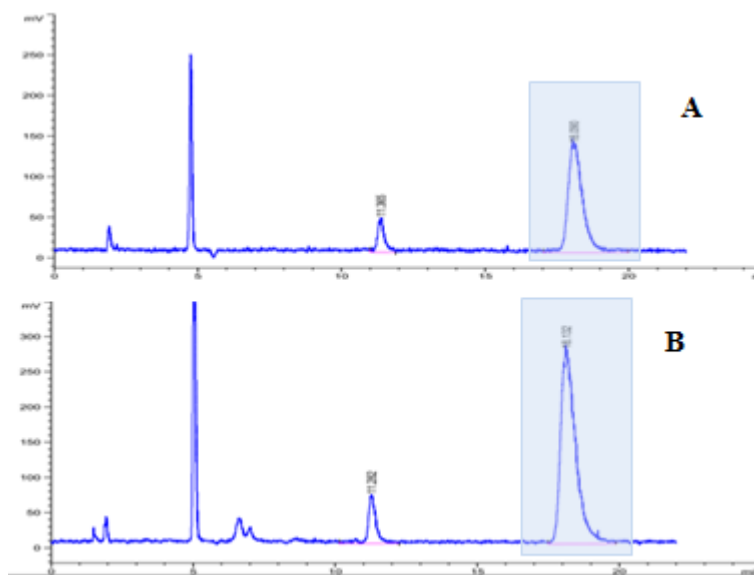
Penambahan persentase air pada fase gerak akan meningkatkan waktu retensi, namun menurunkan resolusi (Gambar 2). Air membentuk lapisan *pseudo-stationary* pada fase polar kolom ZIC-HILIC (Sentkowska dkk., 2013), sehingga air merupakan bagian penting pada HILIC dan diperlukan minimal 2% dari volume fase gerak (Lifford dkk., 2009). Glukosamin hidroklorida merupakan senyawa polar dan teretensi pada lapisan *pseudo-stationary* yang kaya akan air. Penurunan komposisi asetonitril dari 80% -

65% memberikan interaksi yang lemah pada lapisan *pseudo-stationary*, sehingga menurunkan waktu retensi glukosamin (Hao dkk., 2008).

Hasil penelitian ini menunjukkan bahwa komposisi asetonitril 77%, 3% air dan 20% amonium format 30 mM memberikan hasil yang optimum (Gambar 2 D) dengan resolusi > 1,5. Dibandingkan dengan metode analisis glukosamin hidroklorida pada sediaan suplemen dengan fase gerak metanol dengan penambahan pereaksi pasangan ion garam oktana sulfonat (Way dkk., 2000), metode pemisahan HILIC dalam penelitian ini memiliki keunggulan tidak diperlukannya pereaksi pasangan ion sehingga dapat meningkatkan daya tahan kolom, hasil pemisahan yang lebih baik dengan resolusi > 1,5 dan dapat mengatasi interferensi komponen matrik sampel (Gambar 3). Dibandingkan dengan metode derivatisasi dengan *Phenylisothiocyanate* dengan fase gerak metanol asam fosfat pada analisis glukosamin hidroklorida pada sediaan suplemen (David dkk., 2005) dan metode *capillary electrophoretic* (CE) dengan derivatisasi menggunakan *o-phtalaldehyde* (Shigeki & Takao, 2012), metode pemisahan HILIC menghasilkan resolusi yang baik tanpa derivatisasi.



**Gambar 2.** Pengaruh komposisi asetonitril pada penetapan kadar glukosamin hidroklorida menggunakan ZIC HILIC column (150, 4,6 mm), 200 Å 5 µm, fase gerak berbagai komposisi asetonitril (pada kromatogram), 30 mM amonium format 77%, Air 3%, pH 4,5; temperatur kolom 35°C, detektor ELSD, flow rate 1 mL/menit, volume injeksi 5 µL



**Gambar 3.** Kromatogram standar glukosamin hidroklorida (A) dan sampel (B) pada fase gerak asetonitril : air : amonium format 30 mM (77 : 3 : 20, v/v/v), pH 4,5, temperatur kolom 35°C, detektor ELSD, flow rate 1 mL/menit, volume injeksi 5 µL

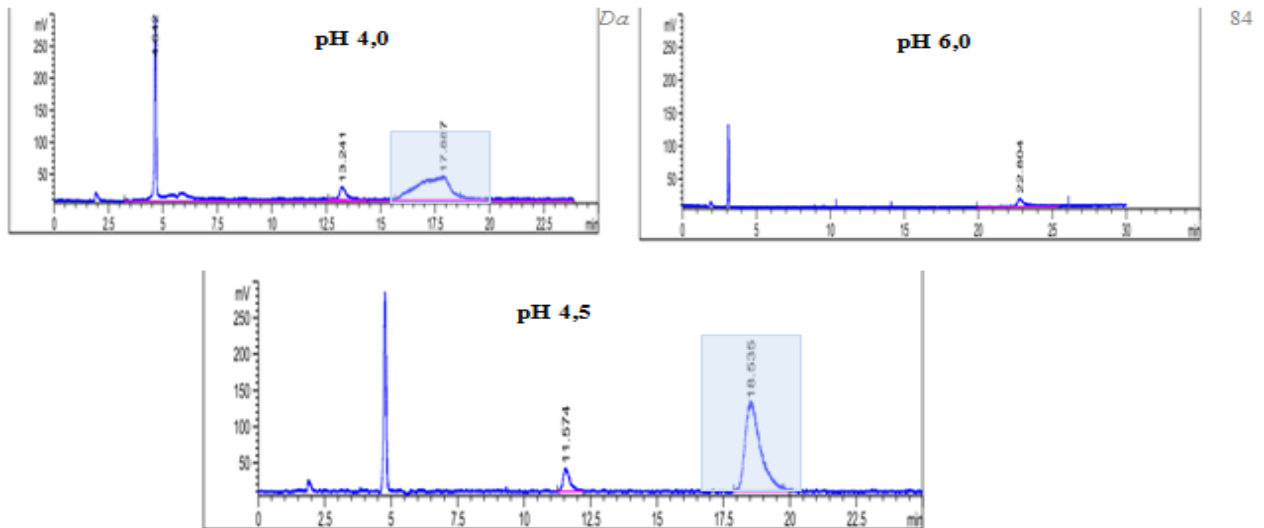
**Optimasi pH dapar**

Pengaruh pH dapar pada penelitian ini dilakukan pada rentang pH 4 - 6. Pada dapar pH = 4, resolusi menurun dan puncak melebar (Gambar 4 A), namun jika pH ditingkatkan menjadi 6, maka tidak muncul puncak glukosamin hidroklorida walaupun waktu analisis diperpanjang sampai 30 menit. Hal ini disebabkan oleh retensi yang lebih lama pada kolom (Gambar 4 B). Resolusi optimum diperoleh pada dapar

pH = 4,5 (Gambar 4 C). Analit yang mudah terionisasi, waktu retensi dipengaruhi oleh pH (Hana dkk., 2014). Analit bermuatan lebih hidrofilik dan lebih teretensi dalam teknik pemisahan HILIC. Glukosamin hidroklorida memiliki nilai pKa sebesar 8,23 sehingga dengan peningkatan pH dapar (pH 4 – 6) glukosamin hidroklorida bermuatan positif dan akan terjadi interaksi elektrostatis dengan fase diam pada HILIC yang berakibat meningkatkan retensi. pH dapar juga

mempengaruhi muatan pada fase diam dimana  $\text{pH} > 5$ , silanol akan terdeprotonasi, sehingga permukaan silika

bermuatan negatif dan menyebabkan analit dengan muatan positif teretensi lebih lama.



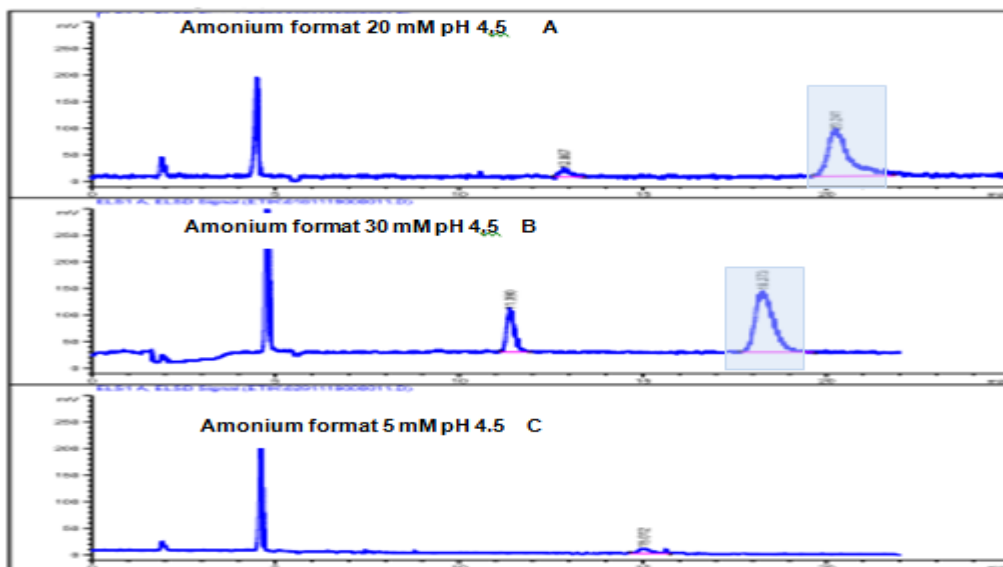
**Gambar 4.** Pengaruh pH pada pemisahan glukosamin hidroklorida menggunakan ZIC HILIC *column* (150, 4,6 mm), 200 Å 5µm, berbagai pH (pada kromatogram), fase gerak asetonitril : air : amonium format 30 mM (77 : 3 : 20, v/v/v), temperatur kolom 35°C, detektor ELSD, *flow rate* 1 mL/menit, volume injeksi 5 µL

**Optimasi komposisi amonium format**

Pada penelitian ini diamati pengaruh amonium format terhadap proses pemisahan glukosamin hidroklorida. Konsentrasi yang digunakan adalah 5 – 30 mM (Gambar 5).

Pada konsentrasi amonium format 5 mM area puncak glukosamin hidroklorida tidak tampak, karena glukosamin hidroklorida teretensi lebih lama pada kolom (Gambar 5 B). Ketika konsentrasi amonium format ditingkatkan menjadi 20 mM, resolusi

meningkat dan waktu retensi lebih lama (20,31 menit). Pada peningkatan konsentrasi amonium format menjadi 30 mM, waktu retensi lebih singkat yaitu 18,53 menit (Gambar 5 C). Untuk menentukan konsentrasi dapar dengan kondisi terpilih dilakukan penyuntikan masing-masing 6 kali pada penggunaan dapar amonium format 20 mM dan 30 mM dengan kondisi terpilih pada konsentrasi 600 µg/mL. Hasil dapat dilihat pada Tabel 2 dan Tabel 3.



**Gambar 5.** Pengaruh komposisi amonium format pada pemisahan glukosamin hidroklorida menggunakan ZIC HILIC *column* (150, 4,6 mm), 200 Å 5 µm, berbagai komposisi amonium format (pada kromatogram), fase gerak asetonitril : air : amonium format 30 mM (77 : 3 : 20, v/v/v), pH 4,5; temperatur kolom 35°C, detektor ELSD, *flow rate* 1 mL/menit, volume injeksi 5 µL

**Tabel 2.** Harga Rt, area, *Theoretical Plate* (N), resolusi (Rs), selektivitas ( $\alpha$ ) dan *symmetry* pada konsentrasi dapar amonium format 20 mM

Rep	Glukosamin hidroklorida					
	Amonium format 20 mM					
	Rt (menit)	Area	N	Rs > 1.5	$\alpha > 1$	Tf $\leq 2.0$
1	20,23	3669	8195	10,70	1,57	0,53
2	20,24	3747	9355	11,38	1,57	0,55
3	20,26	3678	9617	12,02	1,57	0,47
4	20,24	3631	9519	11,88	1,57	0,48
5	20,24	3714	9471	10,96	1,57	0,49
6	20,24	3757	9255	10,98	1,57	0,50
Mean	20,24	3699,33	-	-	-	-
SD	0,01	48,70	-	-	-	-
RSD	0,05	1,32	-	-	-	-

**Tabel 3.** Harga Rt, area, *Theoretical Plate* (N), resolusi (Rs), selektivitas ( $\alpha$ ) dan *symmetry* pada konsentrasi dapar amonium format 30 mM

Rep	Glukosamin hidroklorida					
	Amonium format 30 mM					
	Rt (menit)	Area	N	Rs > 1.5	$\alpha > 1$	Tf $\leq 2.0$
1	18,66	4023	7455	12,05	1,61	0,73
2	18,57	4115	8152	11,73	1,60	0,60
3	18,53	4039	8771	12,29	1,60	0,64
4	18,48	4149	7297	11,50	1,60	0,70
5	18,35	4109	6861	11,00	1,61	0,73
6	18,42	4123	7198	11,86	1,60	0,60
Mean	18,50	4093,00	-	-	-	-
SD	0,11	50,18	-	-	-	-
RSD	0,59	1,23	-	-	-	-

Pengaruh konsentrasi dapar dalam fase gerak pada konsentrasi 20 mM dan 30 mM memberikan nilai faktor selektivitas ( $\alpha$ ) > 1, resolusi (Rs) > 1,5 dan bilangan lempeng teoritis (N) > 2000. Dapar pada HILIC berperan sangat penting untuk menurunkan interaksi elektrostatis antara analit yang bermuatan dengan fase diam. Peningkatan konsentrasi dapar akan menurunkan retensi analit yang bermuatan berlawanan dengan muatan pada fase diam (Dinh dkk., 2013). Fenomena tersebut dapat diamati dari retensi glukosamin hidroklorida yang menurun dengan meningkatnya konsentrasi dapar. Peningkatan konsentrasi amonium format tidak dilakukan, karena larutan dapar akan berinteraksi dengan gugus sulfonat pada fase diam sehingga mengurangi usia kolom.

Waktu retensi pada penggunaan dapar 30 mM lebih singkat rata-rata 18,50 menit dengan nilai RSD 0,59% sedangkan pada pemakaian dapar 20 mM diperoleh waktu retensi rata-rata 20,24 menit dengan nilai RSD 0,05%. Area puncak analit pada penggunaan dapar 30 mM memberikan hasil yang lebih tinggi dengan rata-rata 4093 dan nilai RSD 1,23%, sedangkan pada penggunaan dapar 20 mM area puncak yang diperoleh rata-rata 3699,33 dengan nilai RSD 1,32%.

Dibandingkan dengan metode KCKT menggunakan *detektor corona charged aerosol detector* (cCAD) kolom ZIC-HILIC dengan komposisi asetonitril 65% dan 35% amonium asetat 100 mM (Chhavi dkk., 2019), pada metode KCKT-ELSD dengan kolom ZIC-HILIC menggunakan dapar amonium format 30 mM 20% menghasilkan resolusi yang baik. Pada pemakaian dapar amonium asetat 100 mM, konsentrasi yang tinggi dapat berinteraksi dengan gugus sulfonat pada fase diam yang dapat mengurangi daya tahan kolom.

Suhu kolom, laju alir fase gerak, kondisi ELSD antara lain suhu nebulasi dan evaporasi serta laju alir gas nitrogen mempengaruhi resolusi dan mekanisme retensi dari analit sehingga perlu dilakukan optimasi lebih lanjut. Pada kondisi ELSD, suhu nebulisasi dan ukuran tetapan aerosol (berkisar antara 4 hingga 40  $\mu$ m) mempengaruhi respons detektor (Lafosse & Herbretau, 2002). Pembentukan aerosol membutuhkan gas inert sebagai contoh nitrogen, helium atau argon. Laju alir gas mempengaruhi ukuran tetapan (*droplet*) yang terbentuk pada saat nebulasi. Aliran gas yang tinggi akan menghasilkan droplet yang kecil dan penguapan akan lebih mudah, namun droplet

yang terlalu kecil memiliki efektifitas yang rendah terhadap hamburan cahaya sehingga menghasilkan respon yang rendah (Laksmi dkk., 2012). Optimasi kondisi ELSD pada analisis *2-Deoxy D-Glucose* dengan HILIC pada suhu *drift tube* 30 - 50°C dan laju alir nitrogen 1,5 – 2,5 mL/menit telah dilaporkan. Hasil yang optimum diperoleh pada laju alir nitrogen 1,5 mL/menit dan suhu *drift tube* 30°C. Peningkatan laju alir nitrogen lebih besar dari 2,0 mL/menit menurunkan respon detektor (Laksmi dkk., 2012). Pada analisis karbohidrat, optimasi kondisi ELSD dilakukan pada suhu nebulasi antara 70°C - 85°C, suhu evaporator antara 85°C - 100°C dan laju alir nitrogen antara 0,6 - 1,2 SLM. Kondisi optimum diperoleh pada suhu nebulizer 88,8°C, suhu evaporator 77,9°C dan laju alir nitrogen sebesar 1,1 SLM (Luis dkk., 2015).

Pengaturan suhu evaporasi ditujukan untuk menguapkan fase gerak. Beberapa contoh fase gerak yang dapat digunakan adalah TFA (*trifluoro acetic acid*), amonium format, amonium asetat, asam asetat, amonium karbonat dan amonium hidroksida (Lucena dkk., 2007). Pada analisis glukosamin dan karbohidrat dengan detektor ELSD secara umum fase gerak yang sering digunakan adalah amonium format dan amonium asetat (Hubert dkk., 2010).

## KESIMPULAN

Metode KCKT-ELSD dengan mode pemisahan *Hydrophilic interaction liquid chromatography* untuk analisis glukosamin hidroklorida pada sediaan suplemen kesehatan didapatkan kondisi optimum dengan penggunaan kolom ZIC HILIC (150, 4,6 mm), 200 Å 5 µm, fase gerak asetronitril : 30 mM amonium format : air (77 : 20 : 3, v/v/v) secara isokratik, temperatur kolom 35°C, pH 4,5, laju alir fase gerak 1 mL/menit, volume injeksi 5 µL dengan kondisi detektor ELSD suhu nebulasi dan evaporator 50°C : 80°C, *flow rate* Nitrogen 1,10 SLM.

## UCAPAN TERIMA KASIH

Penulis mengucapkan terima kasih kepada Unit Layanan Pengujian dan Departemen Kimia Farmasi Fakultas Farmasi Universitas Airlangga atas dukungan sarana.

## DAFTAR PUSTAKA

Alpert, A. J. (2008). Electrostatic Repulsion Hydrophilic Interaction Chromatography for Isocratic Separation of Charged Solutes and

Selective Isolation of Phosphopeptide. *Analytical Chemistry*; 80; 62-77.

Chhavi, A., Gregory, M. P., Mandhur, S. & Rahul, P. P. (2019). Development and Validation of a Novel High Performance Liquid Chromatography-Coupled with Corona Charged Aerosol Detector Method for Quantification of Glucosamine in Dietary Supplements. *PLoSOne*; 14; 1-20.

David, J., Lingjun, Z., Jianhai, C. & Emily, P. (2005). Precolumn Derivatization Liquid Chromatography Method for Analysis of Dietary Supplements for Glucosamine: Single Laboratory Validation Study. *Journal of AOAC International*; 88; 413-417.

Dinh, N. P., Jonsson, T. & Irgum, K. (2013). Water Uptake on Polar Stationary Phases Under Conditions for Hydrophilic Interaction Chromatography and Its Relation to Solute Retention. *Journal of Chromatography A*; 1320; 33-47.

Guo, Y. (2015). Recent Progress in the Fundamental Understanding of Hydrophilic Interaction Chromatography (HILIC). *Analyst*; 140; 6652-6466.

Hana, V., Katerina, J., Katerina, S., Helena, T., Petr, S. & Lucie, N. (2014). Study of the Retention Behavior of Small Polar Molecules on Different Types of Stationary Phases Used in Hydrophilic Interaction Liquid Chromatography. *Journal of Separation Science*; 37; 1-11.

Hao, Z., Xiao, B. & Weng, N. (2008). Impact of Column Temperature and Mobile Phase Components on Selectivity of Hydrophilic Interaction Chromatography (HILIC). *Journal of Separation Science*; 31; 1449-1464.

Hubert, C., Hovan, S., Locamte, F., Houbart, V., Deeby, C. D., Fillet, M. & Piel, G. (2010). Development & Validation of a Sensitive Solid Phase Extraction/HILIC/MS Method for the Accurate of Glucosamine in Dog Plasma. *Journal of Chromatography A*; 1217; 3275-3281.

Ikegami, T., Tomomatsu, K., Takubo, H., Horie, K. & Tanaka, N. (2008). Separation Efficiencies in Hydrophilic Interaction Chromatography. *Journal of Chromatography A*; 1184; 474-503.

Kawachi, Y., Ikegami, T., Tokubo, H., Ikegami, Y., Miyamoto, M. & Tanaka, N. (2011). Chromatographic Characterization of Hydrophilic Interaction Liquid Chromatography Stationary

- Phase: Hydrophilicity, Charge Effect, Structural Selectivity and Separation Efficiency. *Journal of Chromatography A*; 1218; 5903-5919.
- Lafosse, M. & Herbreteau, B. (2002). Carbohydrate Analysis by LC and SFC Using Evaporative Light Scattering Detection. *Journal of Chromatography*; 66; 1101–1134.
- Laksmi, N. C., Subrahmanyam, D. & Dubey, P. K. (2012). A Novel LC-ELSD Method for the Quantification of 2-Deoxy D-glucose Using HILIC Chromatography. *Schoolar Research Library*; 4; 591-598.
- Lifford, R. M., Ye, B., Nancy, J. B. & Shuhong, Z. (2009). Comparison of the Sensitivity of Evaporative Universal Detector and LC/MS in the HILIC and the Reversed-phase HPLC Mode. *Journal of Chromatography B*; 877; 4133-4139.
- Lucena, R., Cárdenas, S. & Valcárcel, M. (2007). Evaporative Light Scattering Detection: Trends in Its Analytical Uses. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*; 388; 1663–1672.
- Luis, C. H., Elena, P. L. & Pilar, R. (2015). Improved Evaporative Light Scattering Detection for Carbohydrate Analysis. *Food chemistry*; 180; 265-271.
- Megantara, S., Mutakin, M. & Levita, J. (2016). Prediction of Log P and Spectrum Quersetin, Glucosamine and Andrographolide and Its Corellation with Laboratory Analysis. *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Science*; 8; 33-37.
- Sentkowska A., Biesaga M. & Pyrzynska K. (2013). Effects of the Operation Parameters on HILIC Separation of Flavonoids on Zwitterionic Column. *Talanta*; 115; 284-90.
- Shigeki, A. & Takao, A. (2012). Development of a Simple Capillary Electrophoretic Determination of Glucosamine in Nutritional Supplements Using In-Capillary Derivatization with *O*-Phthalaldehyde. *Food chemistry*; 130; 1137-1141.
- Way, W. K, Gibson, K. G. & Breite, A. G. (2000). Determination Glucosamine in Nutritional Supplement by RP-ion Pair HPLC. *Journal Liquid Chromatography & Real Technology*; 23; 2861-2871.
- Zheng, L., Kim, M., Han, P. & Quigley, C. L. (2017). Determination Glucosamine in Food Supplement by HILIC-ESI-MS. *European Pharmaceutical Review*; 22; 62-65.