Keasaman-kebasaan. Pada 20 ml larutan S, tambah 0,1 ml larutan bromotimol biru. Tidak lebih dari 0,5 ml asam hidroklorida 0,01 M atau natrium hidroksida 0,01 M yang diperlukan untuk merubah warna indikator.

Bromida. Lakukan dengan metode spektrofotometer, menggunakan larutan uji: Pada 0,5 ml larutan S, tambah 4,0 ml air, 2,0 ml larutan merah fenol dan 1,0 ml kloramin (0,1 g/l) dan aduk. Setelah 2 menit, tambah 0,15 ml natrium tiosulfat 0,1 M, aduk dan encerkan dengan air sampai volume 10,0 ml. Ukur serapan pada panjang gelombang 590 nm, gunakan air sebagai larutan kompensasi, tidak lebih besar dari standar (gunakan 5,0 ml dari kalium bromida 3,0 mg/l) dengan cara yang sama (100 ppm).

Besi (II) sianida. Larutkan 2,0 g dalam 6 ml air. Tambah 0,5 ml campuran 5 ml besi (III) amonium sulfat (10 g/l) dalam asam sulfat (2,5 g/l) dan 95 ml besi sulfat (10 g/l). Tidak terbentuk warna biru dalam waktu 10 menit.

Iodium. Larutkan 5 g dalam campuran 0,15 ml natrium nitrit, 2 ml asam sulfat 0,5 M, 25 ml larutan kanji bebas iod dan 25 ml air. Setelah 5 menit, tidak terbentuk warna biru.

Nitrit. Lakukan dengan metode spektrofotometer, menggunakan larutan uji: Pada 10 ml larutan S, tambah 10 ml air. Ukur serapan pada panjang gelombang 354 nm. Serapan tidak lebih besar dari 0,01.

Fosfat. Encerkan 2 ml larutan S dengan air sampai batas volume 100 ml. Larutan memenuhi uji batas fosfat (25 ppm).

Sulfat. Encerkan 7,5 ml larutan S dengan air suling sampai volume 30 ml. Pada 15 ml larutan memenuhi uji batas sulfat (200 ppm).

Aluminium. Larutkan 20,0 g dalam 100 ml air dan tambah 10 ml dapar asetat pH 6,0. Larutan memenuhi uji batas aluminium (0,2 ppm). Gunakan larutan standar, campuran 2 ml larutan aluminium (2 ppm Al), 10 ml dapar asetat pH 6,0 dan 98 ml air. Siapkan blanko campuran 10 ml dapar asetat pH 6,0 dan 100 ml air.

Arsen. Pada 5 ml larutan S memenuhi uji batas arsen (1 ppm).

Barium. Pada 5 ml larutan S, tambah 5 ml air suling dan 2 ml asam sulfat encer. Setelah 2 jam, opalesen lain dalam larutan tidak lebih kuat intensitasnya dibandingkan campuran 5 ml larutan S dan 7 ml air suling.

Besi. Pada 10 ml larutan S memenuhi uji batas besi (2 ppm). Gunakan campuran 4 ml standar besi (1 ppm Fe) dan 6 ml air.

Magnesium dan kalsium. Pada 10,0 g memenuhi uji batas magnesium dan kalsium. Gunakan 150 mg hitam mordan. Jumlah natrium edetat 0,01 M yang digunakan tidak lebih 2,5 ml (100 ppm, dihitung sebagai Ca).

Kalium. Tidak lebih dari 500 ppm K. Lakukan dengan metode spektrofotometer serapan atom, menggunakan:

Larutan uji. Larutkan 1,0 g zat uji dalam air sampai batas volume 100,0 ml.

Larutan standar. Larutkan 1,144 kalium klorida (keringkan pada suhu 105°C selama 3 jam) dalam air sampai batas volume 1000,0 ml (600 µg/ml kalium). Ukur intensitas emisi pada panjang gelombang 766,5 nm.

Logam berat. Pada 12 ml larutan S memenuhi uji batas logam berat (5 ppm). Gunakan standar timbal (1 ppm Pb).

Susut pengeringan. Tidak lebih dari 0,5%. Keringkan pada suhu 105°C. Gunakan 1 g.

Bakteri endotoksin. Tidak lebih dari 5 IU/g.

Penetapan kadar

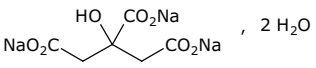
Larutkan dan encerkan 50,0 mg dalam air sampai batas volume 50 ml. Titrasi dengan perak nitrat 0,1 M. Tentukan titik akhir secara potensiometrik. Setiap ml perak nitrat 0,1 M setara dengan 5,844 mg dari NaCl.

Khasiat

Pengobatan kekurangan elektrolit.

Natrium Sitrat

Sodium Citrate



$C_6H_5Na_3O_7$, $2H_2O$ BM : 294,1 [6132-04-3]

Definisi

Natrium sitrat mengandung tidak kurang dari 99,0% dan tidak lebih dari 101,0% dari trinatrium 2-hidroksipropan-1,2,3-trikarboksilat, dihitung dengan standar terhadap zat anhidrat.

Karakteristik

Pemerian. Serbuk atau kristal putih, sedikit delikuesen.

Kelarutan. Mudah larut dalam air, praktis tidak larut dalam alkohol.

Identifikasi

A. Pada 1 ml larutan S, tambah 4 ml air. Larutan memberikan reaksi sitrat.

B. Pada 1 ml larutan S memberikan reaksi natrium.

Larutan S. Larutkan dan encerkan 10,0 g dalam air bebas karbon dioksida sampai batas volume 100 ml.

Kejernihan larutan. Larutan S jernih dan tidak berwarna.

Keasaman-kebasaan. Pada 10 ml larutan S, tambah 0,1 fenolftalein. Tidak lebih dari 0,2 ml asam hidroklorida 0,1 M atau natrium hidroksida 0,1 M yang diperlukan untuk merubah warna indikator.

Zat karbon. Pada 0,2 g zat uji, tambah 10 ml asam sulfat dan panaskan dalam penangas air pada suhu 90°C selama 60 menit. Dinginkan. Larutan tidak lebih kuat intensitas warnanya dibandingkan larutan standar Y_2 atau GY_2.

Klorida. Encerkan 10 ml larutan S dengan air sampai volume 15 ml. Larutan memenuhi uji batas klorida (50 ppm).

Oksalat. Larutkan 0,5 g dalam 4 ml air, tambah 3 ml asam hidroklorida dan 1 g serbuk seng dan panaskan di atas penangas air selama 1 menit. Diamkan selama 2 menit, pindahkan ke dalam tabung reaksi yang mengandung 0,25 ml fenilhidrazin hidroklorida (10 g/l) dan didihkan. Dinginkan, pindahkan ke dalam tabung sentrifus dan tambah asam hidroklorida dengan volume yang sama dan 0,25 ml kalium besi (III) sianida. Kocok dan diamkan selama 30 menit. Warna merah muda dalam larutan tidak lebih kuat intensitasnya dibandingkan standar yang dibuat dengan cara yang sama menggunakan 4 ml asam oksalat (50 mg/l) (300 ppm).

Sulfat. Pada 10 ml larutan S, tambah 2 ml asam hidroklorida 25% b/v dan encerkan dengan air sampai volume 15 ml. Larutan memenuhi uji batas sulfat (150 ppm).

Logam berat. Pada 12 ml larutan S, memenuhi uji batas logam berat (10 ppm). Gunakan standar timbal (1 ppm Pb).

Air. 11,0%—13,0%. Gunakan 0,3 g.

Pirogen. Memenuhi uji batas pirogen, bila digunakan untuk sediaan parenteral.

Penetapan kadar

Larutkan 0,15 g dalam 20 ml asam asetat anhidrat. Panaskan pada suhu 50°C, dinginkan. Gunakan 0,25 ml larutan naftolbenzen sebagai indikator, titrasi dengan asam perklorat 0,1 M sampai terbentuk warna hijau. Setiap ml asam perklorat 0,1 M setara dengan 8,602 mg dari $C_6H_5Na_3O_7$.

Penyimpanan

Kedap udara.

Khasiat

Zat pembasa sistemik.

Natrium Klorida dan Natrium Sitrat Infus Intravena

Definisi

Natrium klorida dan natrium sitrat infus intravena adalah larutan steril natrium klorida dan natrium sitrat dalam air untuk injeksi atau dalam pembawa yang sesuai.

Infus memenuhi persyaratan yang dinyatakan untuk sediaan infus dan persyaratan berikut:

Mengandung natrium klorida dan natrium sitrat tidak kurang dari 4,7% b/v dan tidak lebih dari 5,25% b/v.

Karakteristik

Pemerian. Larutan jernih, tidak berwarna.

Identifikasi

A. Tambah larutan raksa (II) sulfat dan saring. Panaskan hasil saringan sampai mendidih dan tambah 0,15 ml larutan kalium permanganat; larutan tidak berwarna, dan terbentuk endapan putih.

B. Menunjukkan reaksi garam natrium.

Keasaman-kebasaan. pH 6,0—8,0.

Penetapan kadar

Natrium klorida. Sediaan setara dengan 0,2 g natrium klorida, tambah 15 ml asam nitrat 2 M, 5 ml dibutil ftalat, dan 50 ml perak nitrat 0,1 M dan kocok selama beberapa menit. Tambah 5 ml larutan amonium (III) sulfat. Titrasi dengan amonium tiosianat 0,1 M sampai terbentuk warna coklat kemerahan yang tetap selama 5 menit. Setiap ml perak nitrat 0,1 M setara dengan 5,849 mg NaCl.

Natrium sitrat. Uapkan sediaan setara dengan 0,25 g natrium sitrat sampai kering dan panaskan residu sampai terkarbonisasi, dinginkan, didihkan residu dengan 50 ml asam hidroklorida 0,1 M dan saring. Bilas hasil saringan dengan air, dinginkan, campur hasil saringan dan cairan pembilas. Titrasi dengan natrium hidroksida 0,1 M, gunakan metil jingga sebagai indikator. Setiap ml natrium hidroksida 0,1 M setara dengan 9,804 mg $C_6H_5Na_3O_7,2H_2O$.

Penyimpanan

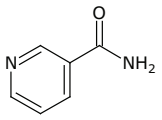
Dilindungi dari cahaya.

Penandaan

Harus tertera: 1) Komposisi. 2) Jenis sediaan. 3) Indikasi. 4) Waktu kadaluwarsa. 5) Kondisi penyimpanan.

Nikotinamid

Nicotinamide



$C_6H_6N_2O$ BM : 122,1 [98-92-0]

Definisi

Nikotinamid mengandung tidak kurang dari 99,0% dan tidak lebih dari 101,0% dari piridin-3-karboksamid, dihitung dengan standar terhadap zat kering.

Karakteristik

Pemerian. Serbuk kristal putih atau tidak berwarna.

Kelarutan. Mudah larut dalam air dan etanol.

Identifikasi

Identifikasi pertama: A, B.
Identifikasi kedua: A, C, D.

A. Suhu lebur 128°—131°C.

B. Spektrum serapan inframerah sesuai dengan spektrum serapan standar nikotinamid.

C. Didihkan 0,1 g dengan 1 ml larutan natrium hidroksida encer. Terbentuk bau amoniak.

D. Encerkan 2 ml larutan S dengan air sampai batas volume 100 ml. Pada 2 ml larutan, tambah 2 ml

larutan sianogen bromida dan 3 ml anilin (25 g/l) dan kocok. Terbentuk warna kuning.

Larutan S. Larutkan dan encerkan 2,5 g dalam air bebas karbon dioksida sampai batas volume 50 ml.

Kejernihan larutan. Larutan S jernih dan tidak lebih kuat intensitas warnanya dibandingkan larutan standar BY_7.

pH. Larutan S 6,0—7,5.

Senyawa sejenis. Lakukan dengan metode kromatografi lapis tipis, menggunakan:

Lempeng. Silika gel GF_{254}.

Larutan uji. Larutkan dan encerkan 0,4 g zat uji dalam campuran alkohol dan air dengan volume yang sama sampai volume 5,0 ml.

Larutan standar. Encerkan 0,5 ml larutan uji dalam campuran alkohol dan air dengan volume yang sama sampai batas volume 200 ml.

Fase gerak. Campuran 4 volume air, 45 volume etanol dan 48 volume kloroform.

Totolkan secara terpisah 5 µl dari setiap larutan. Angkat lempeng dan keringkan di udara. Periksa pada cahaya ultraviolet (254 nm). Bercak lain pada kromatogram yang diperoleh dengan larutan uji, selain dari bercak utama, tidak lebih kuat intensitas warnanya dibandingkan bercak yang diperoleh dengan larutan standar (0,25%).

Logam berat. Encerkan 12 ml larutan S dengan air sampai volume 18 ml. Pada 12 ml larutan S memenuhi uji batas untuk logam berat (30 ppm). Gunakan standar timbal (1 ppm Pb).

Susut pengeringan. Tidak lebih dari 0,5%. Pada pengeringan dengan suhu 105°C secara vakum sampai bobot tetap. Gunakan 1 g.

Abu sulfat. Tidak lebih dari 0,1%. Gunakan 1g.

Penetapan kadar

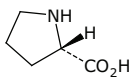
Larutkan 0,25 g dalam 20 ml asam asetat glasial, jika diperlukan panaskan sedikit, dan tambah 5 ml asetat anhidrat. Titrasi dengan asam perklorat 0,1 M, gunakan larutan kristal violet sebagai indikator sampai warna biru kehijauan. Setiap ml asam perklorat 0,1 M setara dengan 12,21 mg $C_6H_6N_2O$.

Khasiat

Komponen vitamin B.

Prolin

Proline



$C_5H_9NO_2$ BM : 115,1 [147-85-3]

Definisi

Prolin mengandung tidak kurang dari 98,5% dan tidak lebih dari 101,0% dari asam (S)-pirolidin-2-karboksilat, dihitung dengan standar terhadap zat kering.

Karakteristik

Pemerian. Serbuk kristal putih atau kristal tidak berwarna.

Kelarutan. Sangat larut dalam air, mudah larut dalam alkohol.

Identifikasi

Identifikasi pertama: A, B.
Identifikasi kedua: A, C.

A. Memenuhi uji rotasi jenis.

B. Spektrum serapan inframerah sesuai dengan spektrum serapan standar prolin.

C. Periksa kromatogram yang diperoleh dalam uji zat positif ninhidrin. Bercak utama pada kromatogram yang diperoleh dengan larutan uji (b) sesuai pada tempat, warna dan ukuran terhadap bercak utama yang diperoleh dengan larutan standar (a).

Larutan S. Larutkan dan encerkan 2,5 g dalam air bebas karbondioksida sampai batas volume 50 ml.

Kejerinihan larutan. Larutan S jernih dan tidak berwarna.

Rotasi jenis. Larutkan dan encerkan 1,0 g dalam air sampai batas volume 25,0 ml. Rotasi jenis adalah -84,0 sampai -86,5, dihitung dengan standar terhadap zat kering.

Senyawa positif ninhidrin. Lakukan dengan kromatografi lapis tipis, menggunakan:

Lempeng. Silika gel atau yang sesuai.

Larutan uji (a). Larutkan dan encerkan 0,1 g zat uji dalam asam hidroklorida 0,1 M sampai volume 10 ml.

Larutan uji (b). Encerkan 1 ml larutan uji (a) dengan air sampai batas volume 50 ml.

Larutan standar (a). Larutkan dan encerkan 10 mg standar lisin hidroklorida dalam asam hidroklorida 0,1 M sampai batas volume 50 ml.

Larutan standar (b). Encerkan 5 ml larutan uji (b) dengan air sampai volume 20 ml

Larutan standar (c). Larutkan dan encerkan 10 mg standar prolin dan 10 mg batas treonin dalam asam hidroklorida 0,1 M sampai batas volume 25 ml.

Fase gerak. Campur 20 volume asam asetat glasial, 20 volume air dan 60 volume butanol.

Totolkan secara terpisah 5 µl dari setiap larutan tion. Angkat lempeng dan keringkan di udara. Semprot dengan ninhidrin dan panaskan pada suhu 105°C selama 15 menit. Bercak pada kromatogram yang diperoleh dengan larutan uji (a), merupakan bagian bercak utama, adalah tidak lebih kuat intensitasnya dibandingkan bercak yang diperoleh dengan larutan standar (b) (0,5%). Uji tidak absah, kecuali jika pada kromatogram yang diperoleh dengan larutan standar (c) menunjukkan 2 bercak yang terpisah.

Klorida. Encerkan 5 ml larutan S dengan air sampai volume 15 ml. Larutan memenuhi uji batas klorida (200 ppm).

Sulfat. Encerkan 5 ml larutan S dengan air sampai volume 15 ml. Larutan memenuhi uji batas sulfat (300 ppm).

Amonium. Pada 50 mg, memenuhi uji batas amonium (200 ppm). Gunakan 0,1 ml larutan standar amonium (100 ppm NH_4).

Besi. Larutkan 1,0 g dalam 10 asam hidroklorida encer. Ekstraksi 3 kali masing-masing dengan 10 ml metil isobutil keton (campur 50 ml 4-metilpentan-2-on hasil penyulingan yang masih segar dengan 0,5 ml asam hidroklorida 7 M, kocok selama 1 menit, biarkan terpisah, buang lapisan bawah, larutan harus segar) kocok selama 3 menit. Campur fase organik, tambah 10 ml air, kocok selama 3 menit. Memenuhi uji batas besi (10 ppm).

Logam berat. Larutkan dan encerkan 2,0 g dalam air sampai volume 20 ml. Pada 12 ml, memenuhi uji batas logam berat (10 ppm). Gunakan standar timbal (1 ppm Pb).

Susut pengeringan. Tidak lebih dari 0,5%. Keringkan pada suhu 105°C. Gunakan 1,0 g.

Abu sulfat. Tidak lebih dari 0,1%. Gunakan 1g.

Penetapan kadar

Larutkan 0,1 g dalam 3 ml asam format anhidrat. Tambah 30 ml asam asetat glasial. Titrasi dengan asam perklorat 0,1 M. Tentukan titik akhir secara potensiometrik. Setiap ml asam perklorat 0,1 M setara dengan 11,51 mg $C_5H_9NO_2$.

Penyimpanan

Dilindungi dari cahaya.

Khasiat

Asam amino.

Kalium Selenat

Potassium Selenate

K_2SeO_4 BM : 221,2 [7790-59-2]

Definisi

Kalium selenat mengandung tidak kurang dari 97,0% dan tidak lebih dari 100,5% dari K_2SeO_4, dihitung dengan standar terhadap zat kering.

Karakteristik

Pemerian. Serbuk kristal tidak berwarna atau putih.

Kelarutan. Mudah larut di dalam air.

Identifikasi

A. Menunjukkan reaksi garam kalium.

B. Pada larutan 0,1 g dalam 3 ml air, tambah 1 ml asam hidrokhlorida, 0,5 ml hidrazin hidrat dan didihkan. Terbentuk endapan merah.

C. Asamkan 1 ml larutan 1% dengan asam hidroklorida 2 M dan tambah 0,15 ml larutan barium klorida. Bilas endapan dengan air dan didihkan dengan asam hidroklorida, memberikan reaksi klorida.

Klorida. Pada 0,3 g memenuhi uji batas klorida (170 ppm).

Selenit. Tidak lebih dari 0,1%, dihitung sebagai SeO_3. Larutkan 2,0 g dalam 50 ml air, tambah 50 ml asam sulfat 9 M, 12 g dinatrium hidrogen fosfat dan 10 ml kalium permanganat 0,02 M dan biarkan selama 20 menit. Titrasi kelebihan kalium permanganat dengan amonium besi (II) sulfat 0,1 M. Setiap ml kalium permanganat 0,02 M setara dengan 6,348 mg SeO_3.

Susut pengeringan. Tidak lebih dari 0,1%. Pada pengeringan dengan suhu 105°C sampai bobot tetap. Gunakan 1 g.

Penetapan kadar

Larutkan 1 g dalam 60 ml air, tambah 15 ml asam hidroklorida dan 5 ml hidrazin hidrat 50% b/v, didihkan dan panaskan di atas penangas air selama 3 jam. Biarkan semalam, bilas endapan dengan air panas sampai bebas ion klorida, bilas dengan etanol absolut dan keringkan pada suhu 105°C. Setiap mg selenium setara dengan 2,801 mg K_2SeO_4.

Khasiat

Digunakan dengan α-tokoferil asetat, untuk pengobatan muskular distrofi.

Selenit Natrium

Sodium Selenite

Na_2SeO_3 BM : 172,9 [10102-18-8]

Definisi

Selenit natrium mengandung tidak kurang dari 44,0% dan tidak lebih dari 46,0% dari Se, dihitung dengan standar terhadap zat kering.

Karakteristik

Pemerian. Serbuk putih atau merah keabuan.

Kelarutan. Mudah larut dalam air, praktis tidak larut dalam etanol (96%) dan eter.

Identifikasi

A. Larutkan 50 mg dalam 5 ml asam hidroklorida 7 M, tambahkan 2 ml natrium tiosulfat 0,1M dan panaskan sampai mendidih. Terbentuk endapan jingga kemerahan.

B. Pada 1 ml larutan S menghasilkan reaksi dari garam natrium.

Larutan S. Larutkan 2,0 g dalam air bebas karbon dioksida sampai batas volume 100 ml.

Kejernihan larutan. Larutan S tidak lebih opalesen dibandingkan standar.

Kebasaan. Pada 50 ml larutan S, tambah 0,2 ml larutan timolftalein. Tidak lebih dari 0,25 ml asam hidroklorida 1M diperlukan unuk merubah warna indikator.

Klorida. Encerkan 2,5 larutan S sampai 15 ml dengan air. Larutan memenuhi uji batas untuk klorida (0,1%).

Sulfat. Encerkan 3,75 ml larutan S dengan air sampai volume 15 ml. Larutan memenuhi uji batas untuk sulfat (0,2%).

Susut pengeringan. Tidak lebih dari 1,0%. Pada pengeringan dengan suhu 105°C sampai bobot tetap. Gunakan 1 g.

Penetapan kadar

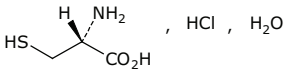
Larutkan 1 g dalam 100 ml air, tambah 30 ml asam hidroklorida dan didihkan. Tambah 100 ml asam sulfat (96% b/b), aduk, didihkan, sumbat dengan kaca arloji, dan panaskan di atas penangas air selama 2 jam. Tambah 10 ml asam sulfat (96% b/b), dinginkan. Saring melalui gelas saring (No. 16) dan bilas endapan dengan air sampai bilasan bebas klorida. Keringkan kertas saring pada suhu 105°C, timbang sampai bobot tetap.

Khasiat

Penanganan kekurangan selenium.

Sistein Hidroklorida

Cysteine Hydrochloride



$C_3H_7NO_2S$, HCl , H_2O BM : 175,6 [7048-04-6]

Definisi

Sistein hidroklorida monohidrat mengandung tidak kurang dari 98,5% dan tidak lebih dari 101,0% dari asam (2R)-2-amino-3-sulfanilpropanoat hidroklorida, dihitung dengan standar terhadap zat kering.

Karakteristik

Pemerian. Serbuk kristal putih atau kristal tidak berwarna.

Kelarutan. Mudah larut dalam air, sukar larut dalam alkohol.

Identifikasi

Identifikasi pertama: A, B, E.
Identifikasi kedua: A, C, D, E.

A. Memenuhi uji rotasi jenis.

B. Spektrum serapan inframerah sesuai dengan spektrum serapan standar sistein hidroklorida.

C. Periksa kromatogram yang diperoleh dalam zat positif ninhidrin. Bercak utama pada kromatogram yang diperoleh dengan larutan uji (b) sesuai pada tempat, warna dan ukuran terhadap bercak utama yang diperoleh dengan larutan standar (b).

D. Larutkan 5 mg dalam 1 ml natrium hidroksida encer. Tambah 1 ml natrium nitroprusida (30 g/l). Terbentuk warna merah kecoklatan dan jingga. Tambah 1 ml asam hidroklorida. Terbentuk warna hijau.

E. Memberikan reaksi klorida.

Larutan S. Larutkan dan encerkan 2,5 g dalam air sampai batas volume 50 ml.

Kejernihan larutan. Encerkan 10 ml larutan S dengan air sampai volume 20 ml. Larutan adalah jernih dan tidak lebih kuat intensitas warnanya dibandingkan larutan standar BY_6.

Rotasi jenis. Larutkan dan encerkan 2,0 g dalam asam hidroklorida sampai volume 25,0 ml. Rotasi jenis adalah +5,5 sampai +7,0, dihitung dengan standar terhadap zat kering.

Senyawa positif ninhidrin. Lakukan dengan kromatografi lapis tipis, menggunakan:

Lempeng. Silika gel atau yang sesuai.

Larutan uji (a). Larutkan dan encerkan 0,2 g zat uji dalam air sampai volume 10 ml. Pada 5 ml tambah 5 ml N-etilmaleimida (40 g/l dalam alkohol). Biarkan selama 5 menit.

Larutan uji (b). Encerkan 1 ml larutan uji (a) dengan air sampai batas volume 50 ml.

Larutan standar (a). Larutkan dan encerkan 0,2 g standar sistein hidroklorida dalam air sampai volume 10 ml. Pada 5 ml, tambah 5 ml N-etilmaleimid (40 g/l dalam alkohol). Biarkan selama 5 menit.

Larutan standar (b). Encerkan 2 ml larutan standar (a) sampai volume 10 ml.

Larutan standar (c). Encerkan 5 ml larutan uji (b) dengan air sampai volume 20 ml.

Larutan standar (d). Larutkan 10 mg standar tirosin dalam 10 ml larutan standar (a) dan encerkan dengan air sampai volume 25 ml.

Fase gerak. Campur 20 volume asam asetat glasial, 20 volume air dan 60 volume butanol.

Totolkan 5 µl secara terpisah pada lempeng dari setiap larutan. Angkat lempeng dan keringkan pada suhu 80°C selama 30 menit. Semprot dengan larutan ninhidrin (ninhidrin 0,2% b/v dalam campuran 95 volume butan-1-ol dan 5 volume asam asetat 2 M) dan panaskan pada suhu 105°C selama 15 menit. Bercak pada kromatogram yang diperoleh dengan larutan uji (a), merupakan bagian bercak utama, adalah tidak lebih kuat intensitasnya dibandingkan bercak yang diperoleh dengan larutan standar (c) (0,5%). Uji tidak absah, kecuali jika pada kromatogram yang diperoleh dengan larutan standar (c) menunjukkan 2 bercak yang terpisah.

Sulfat. Encerkan 10 ml larutan S dengan air sampai volume 15 ml. Larutan memenuhi uji bats sulfat (300 ppm).

Amonium. Pada 50 mg, memenuhi uji batas amonium (200 ppm). Gunakan 0,1 ml standar amonium (100 ppm NH_4).

Besi. Larutkan 1,0 g dalam 10 asam hidroklorida encer. Ekstraksi 3 kali masing-masing dengan 10 ml metil isobutil keton (Campur 50 ml 4-metilpentan-2-on hasil

penyulingan yang masih segar dengan 0,5 ml asam hidroklorida 7 M, kocok selama 1 menit, biarkan terpisah, buang lapisan bawah, larutan harus segar) kocok selama 3 menit. Campur fase organik, tambah 10 ml air, kocok selama 3 menit. Memenuhi uji batas besi (10 ppm).

Logam berat. Larutkan dan encerkan 2,0 g dalam air sampai volume 20 ml. Pada 12 ml, memenuhi uji batas logam berat (10 ppm). Gunakan standar timbal (1 ppm Pb).

Susut pengeringan. 8,0%—12,0%. Pada pengeringan dengan suhu 105°C dan tekanan tidak lebih dari 0,7 kPa sampai bobot tetap. Gunakan 1,0 g.

Abu sulfat. Tidak lebih dari 0,1%. Gunakan 1g.

Penetapan kadar

Larutakan 0,3 g zat uji dan 4 g kalium iodida dalam 20 ml air. Dinginkan dalam air es dan tambah 3 ml asam hidroklorida dan 25,0 ml iodium 0,05 M. Sumbat dan biarkan dalam gelap selama 20 menit. Titrasi dengan natrium tiosulfat 0,1 M menggunakan kanji sebagai indikator. Lakukan titrasi blanko. Setiap ml iodium 0,05 M setara dengan 15,76 mg $C_3H_8ClNO_2S$.

Penyimpanan

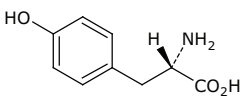
Dilindungi dari cahaya.

Khasiat

Asam amino.

Tirosin

Tyrosine



$C_9H_{11}NO_3$ BM : 181,2 [60-18-4]

Definisi

Tirosin mengandung tidak kurang dari 99,0% dan tidak lebih dari 101,0% dari asam (S)-2-amino-3-(4-hidroksifenil)propanoat, dihitung dengan standar terhadap zat kering.

Karakteristik

Pemerian. Serbuk kristal putih atau kristal tidak berwarna.

Kelarutan. Sangat sukar larut dalam air, praktis tidak larut dalam alkohol. Larut dalam asam mineral dan alkali hidroksida encer.

Identifikasi

Identifikasi pertama: A, B.
Identifikasi kedua: A, C, D, E.

A. Memenuhi uji rotasi jenis.

B. Spektrum serapan inframerah sesuai dengan spektrum serapan standar tirosin.

C. Periksa kromatogram yang diperoleh dalam zat positif ninhidrin. Bercak utama pada kromatogram yang diperoleh dengan larutan uji (b) sesuai pada tempat, warna dan ukuran terhadap bercak utama yang diperoleh dengan larutan standar (a).

D. Pada 50 mg tambah 1 ml asam nitrat encer. Terbentuk warna merah tua selama 15 menit.

E. Larutkan 30 mg dalam 2 ml natrium hidroksida. Tambah 3 ml larutan segar dari campuran dengan volume yang sama natrium nitrit (100 g/l) asam sulfanilat (0,5 g dalam campuran 6 ml asam hidroklorida dan 94 ml air). Terbentuk warna jingga-merah.

Kejernihan larutan. Larutkan dan encerkan 0,5 g dalam asam hidroklorida encer sampai volume 20 ml. Larutan jernih dan tidak lebih kuat intensitas warnanya dibanding dengan larutan standar Y_7.

Rotasi jenis. Larutkan dan encerkan 1,25 g dalam campuran asam hidroklorida encer dan air dengan volume yang sama sampai volume 25,0 ml. Rotasi jenis adalah –11,0 sampai –12,3, dihitung dengan standar terhadap zat kering.

Senyawa positif ninhidrin. Lakukan dengan kromatografi lapis tipis, menggunakan:

Lempeng. Silika gel atau yang sesuai.

Larutan uji (a). Larutkan dan encerkan 0,1 g zat uji dalam amonia encer sampai volume 10 ml.

Larutan uji (b). Encerkan 1 ml larutan uji (a) dengan air sampai batas volume 50 ml.

Larutan standar (a). Larutkan dan encerkan 10 mg standar tirosin dalam amonia encer sampai volume 10 ml.

Larutan standar (b). Encekan 5 ml larutan uji (b) dengan air sampai volume 20 ml.

Larutan standar (c). Larutkan 10 mg standar tirosin dan 10 mg standar fenilalanin dalam 1 ml amonia encer dan encerkan dengan air sampai batas volume 25 ml.

Fase gerak. Campur 30 volume amonia pekat dan 70 volume propanol.

Totolkan secara terpisah 5 µl dari setiap larutan tion. Angkat lempeng dan biarkan kering diudara. Totolkan 5 µl secara terpisah pada lempeng dari setiap larutan tion. Angkat lempeng dan keringkan di udara. Semprot dengan ninhidrin dan panaskan pada suhu 105°C selama 15 menit. Bercak pada kromatogram yang diperoleh dengan larutan uji (a), merupakan bagian bercak utama, adalah tidak lebih kuat intensitasnya dibandingkan bercak yang diperoleh dengan larutan standar (b) (0,5%). Uji tidak absah, kecuali jika pada kromatogram yang diperoleh dengan larutan standar (c) menunjukkan 2 bercak yang terpisah.

Klorida. Larutkan 0,25 g dalam 3 ml asam nitrat encer dan encerkan dengan air sampai volume 15. Memenuhi uji batas klorida (200 ppm).

Sulfat. Pada 0,5 g dalam 5 ml asam hidroklorida encer dan encerkan dengan air sampai volume 15 ml, panaskan. Larutan memenuhi uji batas sulfat (300 ppm).

Amonium. Pada 50 mg, memenuhi uji batas amonium (200 ppm). Gunakan 0,1 ml larutan standar amonium (100 ppm NH_4).

Besi. Larutkan 1,0 g dalam 10 asam hidroklorida encer. Ekstraksi 3 kali masing-masing dengan 10 ml metil isobutil keton (campur 50 ml 4-metilpentan-2-on hasil penyulingan yang masih segar dengan 0,5 ml asam hidroklorida 7 M, kocok selama 1 menit, biarkan terpisah, buang lapisan bawah, larutan harus segar) kocok selama 3 menit. Campur fase organik, tambah 10 ml air, kocok selama 3 menit. Memenuhi uji batas besi (10 ppm).

Logam berat. Pada 2,0 g, memenuhi uji batas logam berat (10 ppm). Gunakan standar timbal (10 ppm Pb).

Susut pengeringan. Tidak lebih dari 0,5%. Pada pengeringan dengan suhu 105°C sampai bobot tetap. Gunakan 1,0.g

Abu sulfat. Tidak lebih dari 0,1%. Gunakan 1g.

Penetapan kadar

Larutkan 0,1 g dalam 3 ml asam format anhidrat. Tambah 30 ml asam asetat glasial. Titrasi dengan asam perklorat 0,1 M. Tentukan titik akhir secara potensiometrik. Setiap ml asam perklorat 0,1 M setara dengan 18,12 mg $C_9H_{11}NO_3$.

Penyimpanan

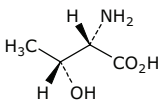
Dilindungi dari cahaya.

Khasiat

Asam amino.

Treonin

Threonine



$C_4H_9NO_3$ BM : 119,1 [72-19-5]

Definisi

Treonin mengandung tidak kurang dari 99,0% dan tidak lebih dari 101,0% dari asam (2S,3R)-2-amino-3-hidroxybutanoat, dihitung dengan standar terhadap zat kering.

Karakteristik

Pemerian. Serbuk kristal putih atau kristal berwarna.

Kelarutan. Larut dalam air, praktis tidak larut dalam alkohol.

Identifikasi

Identifikasi pertama: A, B.
Identifikasi kedua: A, C, D.

A. Memenuhi uji rotasi jenis.

B. Spektrum serapan inframerah sesuai dengan spektrum serapan standar treonin.

C. Periksa kromatogram yang diperoleh dalam uji zat positif ninhidrin. Bercak utama pada kromatogram yang diperoleh dengan larutan uji (b) sesuai pada tempat, warna dan ukuran terhadap bercak utama yang diperoleh dengan larutan standar (a).

D. Campur 1 ml zat uji (2 g/l) dengan 1 ml natrium periodat (20 g/l). Tambah 0,2 ml piperidin dan 0,1 ml natrium nitroprusida (25 g/l). Terbentuk warna biru yang berubah menjadi kuning setelah beberapa menit.

Larutan S. Larutkan dan encerkan 2,5 g dalam air bebas karbondioksida sampai batas volume 100,0ml.

Kejernihan larutan. Larutan S jernih dan tidak berwarna.

pH. Larutan S, 5,0—6,5.

Rotasi jenis. Larutkan dan encerkan 1,5 g dalam air sampai volume 25,0 ml. Rotasi jenis adalah -27,6 sampai -29,5, dihitung dengan standar terhadap zat batas kering.

Senyawa positif ninhidrin. Lakukan dengan kromatografi lapis tipis, menggunakan:

Lempeng. Silika gel atau yang sesuai.

Larutan uji (a). Larutkan dan encerkan 0,1 g zat uji dalam asam hidroklorida encer sampai volume 10 ml.

Larutan uji (b). Encerkan 1 ml larutan uji (a) dengan air sampai batas volume 50 ml.

Larutan standar (a). Larutkan dan encerkan 10 mg standar treonin dalam asam hidroklorida (1% v/v) sampai volume 50 ml.

Larutan standar (b). encerkan 5 ml larutan uji (b) sampai volume 20 ml.

Larutan standar (c). Larutkan dan encerkan 10 mg standar treonin dan prolin dalam asam hidroklorida (1% v/v) sampai batas volume 25 ml.

Fase gerak. Campur 20 volume asam asetat glasial, 20 volume air dan 60 volume butanol.

Totolkan 5 µl secara terpisah pada lempeng dari setiap larutan tion. Angkat lempeng dan keringkan di udara. Semprot dengan ninhidrin dan panaskan pada suhu 105°C selama 15 menit. Bercak pada kromatogram yang diperoleh dengan larutan uji (a), merupakan bagian bercak utama, adalah tidak lebih kuat intensitasnya dibandingkan bercak yang diperoleh dengan larutan standar (b) (0,5%). Uji tidak absah, kecuali jika pada kromatogram yang diperoleh dengan larutan standar (c) menunjukkan 2 bercak yang terpisah.

Klorida. Encerkan 10 ml larutan S dengan air sampai volume 15 ml. Larutan memenuhi uji batas klorida (200 ppm).

Sulfat. Larutkan dan encerkan 0,5 g dalam air sampai volume 15 ml. Larutan memenuhi uji batas sulfat (300 ppm).

Amonium. Pada 50 mg, memenuhi uji batas amonium (200 ppm). Gunakan 0,1 ml larutan standar amonium (100 ppm NH_4).

Besi. Larutkan 1,0 g dalam 10 asam hidroklorida encer. Ekstraksi 3 kali masing-masing dengan 10 ml metil isobutil keton (campur 50 ml 4-metilpentan-2-on hasil penyulingan yang masih segar dengan 0,5 ml asam hidroklorida 7 M, kocok selama 1 menit, biarkan terpisah, buang lapisan bawah, larutan harus segar) kocok selama 3 menit. Campur fase organik, tambah 10 ml air, kocok selama 3 menit. Memenuhi uji batas besi (10 ppm).

Logam berat. Pada 2,0 g memenuhi uji batas logam berat (10 ppm). Gunakan standar timbal (10 ppm Pb).

Susut pengeringan. Tidak lebih dari 0,5%. Pada pengeringan dengan suhu 105°C sampai bobot tetap. Gunakan 1,0 g.

Abu sulfat. Tidak lebih dari 0,1%. Gunakan 1g.

Penetapan kadar

Larutkan 0,1 g dalam 3 ml asam format anhidrat. Tambah 30 ml asam asetat glasial. Titrasi dengan asam perklorat 0,1 M. Tentukan titik akhir secara potensiometrik. Setiap ml asam perklorat 0,1 M setara dengan 11,91 mg $C_4H_9NO_3$.

Penyimpanan

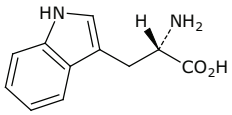
Dilindungi dari cahaya.

Khasiat

Asam amino.

Triptofan

Tryptophan



$C_{11}H_{12}N_2O_2$ BM : 204,2 [73-22-3]

Definisi

Triptofan mengandung tidak kurang dari 98,5% dan tidak lebih dari 101,0% dari asam (S)-2-amino-3-(1H-indol-3-il)propanoat, dihitung dengan standar terhadap zat kering.

Karakteristik

Pemerian. Serbuk kristal putih atau sebuk amorf.

Kelarutan. Sukar larut dalam air, sukar larut dalam alkohol. Larut dalam asam mineral dan natrium hidroksida encer.

Identifikasi

Identifikasi pertama: A, B.
Identifikasi kedua: A, C, D.

A. Memenuhi uji rotasi jenis.

B. Spektrum serapan inframerah sesuai dengan spektrum serapan standar triptofan.

C. Periksa kromatogram yang diperoleh dalam uji zat positif ninhidrin. Bercak utama pada kromatogram yang diperoleh dengan larutan uji (b) sesuai pada tempat, warna dan ukuran terhadap bercak utama yang diperoleh dengan larutan standar (a).

D. Larutkan 20 mg dalam 10 ml air. Tambah 5 ml dimetilaminobenzaldehida [larutkan 0,125 g 4-dimetilaminobenzaldehida dalam campuran dingin dari 65 ml asam sulfat dan 35 ml air dan tambah 0,1 ml besi (III) klorida 5% b/v. Biarkan selama 24 jam, lindungi dari cahaya] dan 2 ml asam hidroklorida 2 ml. Panaskan di atas penangas air. Terbentuk warna biru-ungu.

Kejernihan larutan. Larutkan dan encerkan 0,1 g dalam asam hidroklorida 1 M sampai volume 10 ml. Larutan jernih dan tidak lebih kuat intensitas warnanya dibanding dengan larutan standar BY_6.

Rotasi jenis. Larutkan dan encerkan 0,25 g dalam air, panaskan jika perlu, sampai batas volume 25,0 ml. Rotasi jenis adalah -30,0 sampai -33,0, dihitung dengan standar terhadap zat kering.

Senyawa positif ninhidrin. Lakukan dengan kromatografi lapis tipis, menggunakan:

Lempeng. Silika gel atau yang sesuai.

Larutan uji (a). Larutkan 0,1 g zat uji dalam campuran asam asetat glasial dan air dengan volume yang sama sampai volume 10 ml.

Larutan uji (b). Encerkan 1 ml larutan uji (a) dalam campuran asam asetat dan air dengan volume yang sama sampai volume 50 ml.

Larutan standar (a). Larutkan dan encerkan 10 mg standar triptofan dalam campuran asam asetat glasial dan air dengan volume yang sama sampai batas volume 50 ml.

Larutan standar (b). Encerkan 5 ml larutan uji (b) dalam campuran asam asetat glasial dan air dengan volume yang sama sampai volume 20 ml.

Larutan standar (c). Larutkan 10 mg standar triptofan dan 10 mg standar tirosin dalam campuran asam asetat glasial dan air dengan volume yang sama sampai batas volume 25 ml.

Fase gerak. Campur 20 volume asam asetat glasial, 20 volume air dan 60 volume butanol.

Totolkan 5 µl secara terpisah pada lempeng dari setiap larutan tion. Angkat lempeng dan keringkan di udara. Semprot dengan ninhidrin dan panaskan pada suhu 105°C selama 15 menit. Bercak pada kromatogram yang diperoleh dengan larutan uji (a), merupakan bagian bercak utama, adalah tidak lebih kuat intensitasnya dibandingkan bercak yang diperoleh dengan larutan standar (b) (0,5%). Uji tidak absah, kecuali jika pada kromatogram yang diperoleh dengan larutan standar (c) menunjukkan 2 bercak yang terpisah.

1,1′-Etilidenebistriptofan dan senyawa sejenis lain. Lakukan dengan metode kromatografi cair, menggunakan:

Dapar pH 2,3. Larutkan 3,90 g natrium dihidrogen fosfat dalam 1000 ml air. Tambah 700 ml asam fosfat

(2,9 g/l) dan atur pH 2,3 dengan asam fosfat. Larutan harus segar.

Larutan standar. Larutkan dan encerkan 10,0 mg N-asetiltriptofan dalam campuran 10 volume asetonitril dan 90 volume air sampai batas volume 100,0 ml. Encerkan 2,0 ml dengan campuran yang sama sampai batas volume 100,0 ml.

Larutan uji (a). Lurutkan dan encerkan 0,10 g zat uji dalam campuran 10 volume asetonitril dan 90 volume air sampai volume 10,0 ml.

Larutan uji (b). Larutkan dan encerkan 0,10 g zat uji dalam larutan standar sampai volume 10,0 ml.

Larutan standar (a). Larutkan dan encerkan 1,0 mg standar 1,1'-etilidenebistriptofan dalam campuran 10 volume asetonitril dan 90 volume air sampai batas volume 100,0 ml.

Larutan standar (b). Encerkan 10,0 ml larutan standar (a) dalam larutan standar (a) sampai batas volume 50,0 ml.

Larutan standar (c). Encerkan 10,0 ml larutan standar (a) dengan campuran 10 volume asetonitril dan 90 volume air sampai batas volume 50,0 ml.

Larutan standar (d). Larutkan dan encerkan 0,1 g zat uji dalam larutan standar (c) sampai volume 10,0 ml.

Larutan standar (e). Encerkan 1,0 ml larutan standar (c) dalam campuran 10 volume asetonitril dan 90 volume air sampai volume 10,0 ml.

Kolom. Silika gel oktadesilsilil ,5 µm, ukuran 25 cm x 4,6 mm atau yang sesuai dengan suhu 40°C.

Fase gerak A. Campur 115 volume asetonitril dan 885 volume dapar pH 2,3.

Fase gerak B. Campur 350 volume asetonitril dan 650 volume dapar pH 2,3.

Laju alir. 0,7 ml/menit.

Waktu (menit)	Fase gerak A (% v/v)	Fase gerak B (% v/v)	Keterangan
0 — 10	100	0	Isokratik
10 — 45	100 → 0	0 → 100	Linier gradien
45 — 65	0	100	Isokratik
65 — 66	0 → 100	100 → 0	Linier gradien
66 — 80	100	0	Re-ekuilibrasi

Injek 20 µl larutan standar (b), (d) dan (e). Waktu tambat triptofan sekitar 8 menit, N-asetiltriptofan sekitar 29 menit dan 1,1'-etilidenebistriptofan sekitar 34 menit. Atur sensitivitas sistem, sehingga tinggi puncak N-asetiltriptofan pada kromatogram yang diperoleh dengan larutan standar (b) adalah 50% skala penuh. Uji tidak absah, kecuali jika: (A). Pada kromatogram yang duipeoleh dengan larutan standar (b), resolusi antara puncak N-asetiltriptofan dan 1,1'-etillidene-bistriptofan adalah 8,0. Jika perlu, Atur waktu elusi gradien. Peningkatan selama elusi dengan fase gerak A menghasilkan waktu tambat dan resolusi yang baik; (B). Pada kromatogram yang diperoleh dengan larutan standar (e) mempunyai rasio pengganggu sekitar 15.

Injek 20 µl larutan uji (a) dan (b). Periksa kromatogram yang diperoleh dengan larutan uji (a), tidak ada puncak dengan waktu tambat yang sama dengan N-asetiltriptofan (dalam beberapa kasus, koreksi area puncak N-asetiltriptofan). Pada kromatogram yang diperoleh dengan larutan uji (b): area puncak 1,1'-etilidenebistriptofan adalah tidak lebih besar dari 0,5 kali area puncak utama pada kromatogram yang diperoleh dengan larutan standar (e) (10 ppm); Jumlah area puncak dengan waktu tambat kurang dari waktu tambat triptofan adalah tidak lebih dari 0,6 kali area puncak N-asetiltriptofan pada kromatogram yang diperoleh dengan larutan stándar (b) (100 ppm); jumlah area dengan waktu tambat lebih besar dari waktu tambat triptofan, merupakan bagian N-asetiltriptofan, dan sampai 1,8 kali waktu tambat N-asetiltriptofan, tidak lebih besar dari 1,9 kali area puncak N-asetiltriptofan pada kromatogram yang diperoleh larutan standar (b) (300 ppm). Abaikan puncak kurang dari 0,02 kali area puncak N-asetiltriptofan pada kromatogram yang diperoleh dengan larutan standar (b).

Klorida. Larutkan 0,25 g dalam 3 ml asam nitrat encer dan encerkan dengan air sampai volume 15 ml. Memenuhi uji batas klorida (200 ppm).

Sulfat. Larutkan dan encerkan 0,5 g dalam campuran 5 volume asam hidroklorida encer dan 25 volume air sampai volume 15 ml. Larutan memenuhi uji batas sulfat (300 ppm).

Amonium. Pada 0,1 g, memenuhi uji batas amonium (200 ppm). Gunakan 0,1 ml larutan standar amonium (100 ppm NH_4).

Besi. Larutkan 1,0 g dalam 10 asam hidroklorida encer. Ekstraksi 3 kali masing-masing dengan 10 ml metil isobutil keton (campur 50 ml 4-metilpentan-2-on hasil penyulingan yang masih segar dengan 0,5 ml asam hidroklorida 7 M, kocok selama 1 menit, biarkan terpisah, buang lapisan bawah, larutan harus segar) kocok selama 3 menit. Campur fase organik, tambah 10 ml air, kocok selama 3 menit. Memenuhi uji batas besi (10 ppm).

Logam berat. Pada 12 mg, memenuhi uji batas logam berat (10 ppm). Gunakan standar timbal (10 ppm Pb).

Susut pengeringan. Tidak lebih dari 0,5%. Pada pengeringan dengan suhu 105°C sampai bobot tetap. Gunakan 1,0 g.

Abu sulfat. Tidak lebih dari 0,1%. Gunakan 1g.

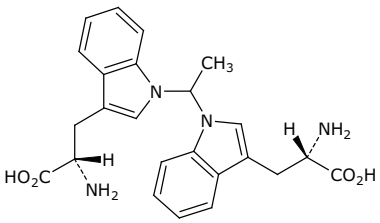
Penetapan kadar

Larutkan 0,1 g dalam 3 ml asam format anhidrat. Tambah 30 ml asam asetat glasial. Titrasi dengan asam perklorat 0,1 M. Dan gunakan 0,1 ml of naftolbenzen sebagai indukator. Setiap ml asam perklorat 0,1 M setara dengan 20,42 mg $C_{11}H_{12}N_2O_2$.

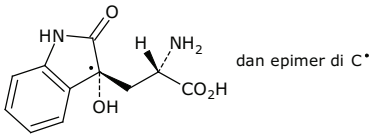
Penyimpanan

Dilindungi dari cahaya.

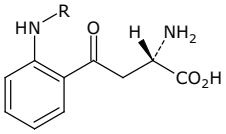
Ketidakmurnian



A. Asam 3,3'-[etilidinbis(1H-indola-1,3-diil)]bis[(2S)-2-aminopropanoat](1,1'-etilidenebistriptofan).

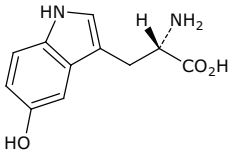


B. Asam (S)-2-amino-3-[(3RS)-3-hidroksi-2-okso-2, 3-dihidro-1H-indol-3-il]propanoat(dioksiindolil-alanina).

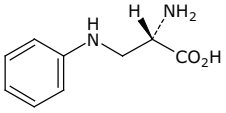


C. R = H: Asam (S)-2-amino-4-(2-aminofenil)-4-oksobutanoat (kinurenina).

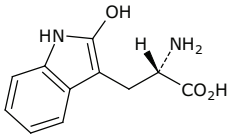
E. R = CHO: Asam (S)-2-amino-4-[2-(formilamino) fenil]-4-oksobutanoat (N-formilkinurenina).



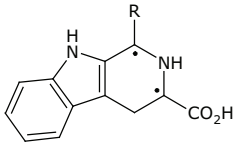
D. Asam (S)-2-amino-3-(5-hidroksi-1H-indol-3-il)propanoat (5-hidroksitriptofan).



F. Asam (S)-2-amino-3-(fenilamino)propanoat (3-fenilaminoalanina).

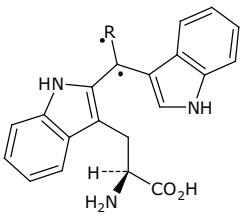


G. Asam (S)-2-amino-3-(2-hidroksi-1H-indol-3-il)propanoat (2-hidroksitriptofan).



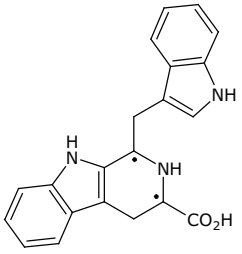
H. R = H: Asam (3RS)-1,2,3,4-tetrahidro-9H-β-karbolina-3-karboksilat.

I. R = CH_3: Asam 1-metil-1,2,3,4-tetrahidro-9H-β-karbolina-3-karboksilat.



J. R = CHOH-CH_2-OH: Asam (S)-2-amino-3-[2-[2, 3-dihidroksi-1-(1H-indol-3-il)propil]-1H-indol-3-il] propanoat.

K. R = H: Asam (S)-2-amino-3-[2-(1H-indol-3-ilmetil)-1H-indol-3-il]propanoat.



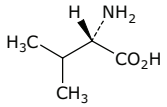
L. Asam 1-(1H-indol-3-ilmetil)-1,2,3,4-tetrahidro-9H-β-karbolina-3-karboksilat.

Khasiat

Asam amino.

Valin

Valine



$C_5H_{11}NO_2$ BM : 117,1 [72-18-4]

Definisi

Valin mengandung tidak kurang dari 98,5% dan tidak lebih dari 101,0% dari asam (S)-2-amino-3-metil-butanoat, dihitung dengan standar terhadap zat kering.

Karakteristik

Pemerian. Serbuk kristal putih atau kristal tidak berwarna.

Kelarutan. Larut dalam air, sukar larut dalam alkohol.

Identifikasi

Identifikasi pertama: A, B.
Identifikasi kedua: A, C.

A. Memenuhi uji rotasi jenis.

B. Spektrum serapan inframerah sesuai dengan spektrum serapan standar valin.

C. Periksa kromatogram yang diperoleh dalam uji zat positif ninhidrin. Bercak utama pada kromatogram yang diperoleh dengan larutan uji (b) sesuai pada tempat, warna dan ukuran terhadap bercak utama yang diperoleh dengan larutan standar (a).

Larutan S. Larutkan dan encerkan 2,5 g dalam air sampai batas volume 100 ml.

Kejernihan larutan. Larutan S jernih dan tidak lebih kuat intensitas warnanya dibandingkan dengan larutan standar BY_6.

Rotasi jenis. Larutkan dan encerkan 2,0 g dalam asam hidroklorida encer sampai batas volume 25,0 ml. Rotasi jenis adalah +26,5 sampai +29,0, dihitung dengan standar terhadap zat kering.

Zat positif ninhidrin. Lakukan dengan kromatografi lapis tipis, menggunakan:

Lempeng. Silika gel atau yang sesuai.

Larutan uji (a). Larutkan dan encerkan 0,1 g zat uji dalam air sampai volume 10 ml.

Larutan uji (b). Encerkan 1 ml larutan uji (a) dengan air sampai batas volume 50 ml.

Larutan standar (a). Larutkan dan encerkan 10 mg standar valin dalam asam hidroklorida 0,1 M sampai batas volume 50 ml.

Larutan standar (b). Encerkan 5 ml larutan uji (b) dengan air sampai volume 20 ml.

Larutan standar (c). Larutkan 10 mg standar fenil-alanin dan 10 mg standar valin dalam asam hidroklorida 0,1 M sampai batas volume 25 ml.

Fase gerak. Campur 20 volume asam asetat glasial, 20 volume air dan 60 volume butanol.

Totolkan 5 µl secara terpisah pada lempeng dari setiap larutan tion. Angkat lempeng dan keringkan di udara. Semprot dengan ninhidrin dan panaskan pada suhu 105°C selama 15 menit.

Bercak pada kromatogram yang diperoleh dengan larutan uji (a), merupakan bagian bercak utama, adalah tidak lebih kuat intensitasnya dibandingkan bercak yang diperoleh dengan larutan standar (b) (0,5%).

Uji tidak absah, kecuali jika pada kromatogram yang diperoleh dengan larutan standar (c) menunjukkan 2 bercak yang terpisah.

Klorida. Encerkan 10 ml larutan S dengan air sampai volume 15 ml. Larutan memenuhi uji batas klorida (200 ppm).

Sulfat. Larutkan dan encerkan 0,5 g dalam air sampai volume 15 ml. Larutan memenuhi uji batas sulfat (300 ppm).

Amonium. Pada 50 mg, memenuhi uji batas amonium (200 ppm). Gunakan standar amonium (100 ppm NH_4).

Besi. Larutkan 1,0 g dalam 10 asam hidroklorida encer. Ekstraksi 3 kali masing-masing dengan 10 ml metil isobutil keton (campur 50 ml 4-metilpentan-2-on hasil penyulingan yang masih segar dengan 0,5 ml asam hidroklorida 7 M, kocok selama 1 menit, biarkan terpisah, buang lapisan bawah, larutan harus segar) kocok selama 3 menit. Campur fase organik, tambah 10 ml air, kocok selama 3 menit. Memenuhi uji batas besi (10 ppm).

Logam berat. Pada 2,0 g, memenuhi uji batas logam berat (10 ppm). Gunakan standar timbal (10 ppm Pb).

Susut pengeringan. Tidak lebih dari 0,5%. Pada pengeringan dengan suhu 105°C sampai bobot tetap. Gunakan 1,0 g.

Abu sulfat. Tidak lebih dari 0,1%. Gunakan 1g.

Penetapan kadar

Larutkan 0,1 g dalam 3 ml asam format anhidrat. Tambah 30 ml asam asetat glasial. Titrasi dengan asam perklorat 0,1 M. Tentukan titik akhir secara potensiometrik. Setiap ml asam perklorat 0,1 M setara dengan 11,71 mg $C_5H_{11}NO_2$.

Penyimpanan

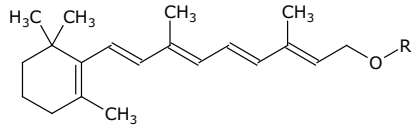
Dilindungi dari cahaya.

Khasiat

Asam amino.

Vitamin A

Retinol



$C_{20}H_{30}O$	BM : 286,5
$C_{22}H_{32}O_2$	BM : 328,5
$C_{23}H_{34}O_2$	BM : 342,5
$C_{36}H_{60}O_2$	BM : 524,9

Definisi

Vitamin A mengacu pada sejumlah dari zat dengan struktur yang sama (termasuk (Z)-isomer) ditemukan dalam jaringan hewan dan mempunyai proses aktivitas yang sama. Secara biologis zat aktif utama vitamin A adalah all-(E)-retinol (all-(E)-3,7-dimetil-9-(2,6,6-trimetilsikloheks-1-enil)nona-2,4,6,8-tetraen-1-ol; $C_{20}H_{30}O$). Secara umum vitamin A adalah dalam bentuk ester seperti asam asetat, propionat dan palmitat.

Sintetis ester retinol mengacu pada ester (asam asetat, propionat atau palmitat) atau campuran sintetis retinol ester.

Internasional Unit (IU) digunakan untuk menyatakan aktivitas vitamin A. Setiap IU vitamin A setara dengan 0,300 µg dari all-(E)-retinol. Aktivitas ester retinol lain dihitung secara stoikiometrik; setiap IU vitamin A setara dengan 0,344 µg dari all-(E)-retinol asetat, 0,359 µg dari all-(E)-retinol propionat dan 0,550 µg dari all-(E)-retinol palmitat. Setiap mg retinol setara dengan 3333 IU.

Karakteristik

Pemerian

Retinol asetat. Kristal kuning terang (suhu lebur 60°C).

Retinol propionat. Cairan minyak coklat kemerahan.

Retinol palmitat. Cairan minyak kental kuning atau padatan kuning terang (suhu lebur 26°C).

Kelarutan

Semua ester retinol. Praktis tidak larut dalam air, larut atau sebagian larut dalam etanol dan dapat bercampur dengan pelarut organik.

Vitamin A dan esternya. Sangat sensitif terhadap udara, zat oksidasi, asam, cahaya dan panas.

Identifikasi

A. Lakukan dengan metode kromatogarfi lapis tipis, menggunakan:

Larutan uji. Larutan mengandung 3,3 IU/µl dalam sikloheksan (mengandung 1 g/l butil hidroksitoluen).

Larutan standar. Standar ester retinol 10 mg/ml (3,3 IU/µl ester) dalam sikloheksan (mengandung 1 g/l butilhidroksitoluen).

Lempeng. Silika gel F_{254} atau yang sesuai.

Fase gerak. Campur eter dan sikloheksan (20:80 v/v).

Totolkan secara terpisah 3 µl dari setiap larutan. Angkat lempeng dan keringkan di udara. Periksa dengan cahaya ultraviolet (254 nm).

Kesesuaian sistem larutan standar. Pada kromatogram menunjukkan bercak individual ester. Pemisahan dari bawah ke atas, retinol asetat, retinol propionat dan retinol palmitat.

Hasil. Komposisi ester ditetapkan oleh bercak utama yang diperoleh larutan uji dengan yang diperoleh larutan standar.

B. Memenuhi uji untuk senyawa sejenis.

Retinol. Lakukan dengan metode kromatografi lapis tipis, menggunakan:

Larutan uji. Larutan mengandung 330 IU/µl vitamin A dalam sikloheksan (mengandung 1 g/l butilhidroksitoluen).

Larutan standar. Campur 1 ml larutan uji dengan 20 ml tetrabutilamonium hidroksida 0,1 M dalam 2-propanol, aduk selama 2 menit dan encerkan dengan sikloheksan (mengandung 1 g/l butilhidroksitoluen) sampai batas volume 100 ml.

Lempeng. Silika gel F_{254} atau yang sesuai.

Totolkan secara terpisah 3 µl dari setiap larutan. Angkat lempeng dan keringkan di udara. Periksa dengan cahaya ultraviolet (254 nm).

Kesesuaian sistem larutan standar. Pada kromatogram yang diperoleh hanya bercak ester retinol yang terlihat.

Batas. Bercak lain retinol pada kromatogram yang diperoleh dengan larutan uji tidak lebih kuat intensitasnya dibandingkan bercak yang diperoleh dengan larutan standar (1,0%).

Senyawa sejenis. Lakukan dengan metode spektrofotometer, menggunakan: Larutan memperlihatkan serapan maksimum pada panjang gelombang 325—327 nm. Ukur serapan pada panjang gelombang 300 nm, 350 nm dan 370 nm serta hitung perbandingan A_1/A_{326} untuk setiap panjang gelombang. Tidak ada satupun perbandingan A_1/A_{326} lebih dari 0,60 pada panjang gelombang 300 nm, 0,54 pada 350 nm dan 0,14 pada 370 nm.

Aktivitas. Lakukan dengan metode spektrofotometeri, menggunakan:

Larutan uji. Larutkan 25 -100 mg dengan ketelitian 0,1% dalam 5 ml pentan dan encerkan dengan 2-propanol sampai konsentrasi 10—15 IU/ml.

Ukur serapan maksimum pada panjang gelombang 326 nm. Hitung vitamin A dalam IU/g dengan rumus:

$$\frac{A_{326} \times V \times 1900}{100 \times m}$$

Keterangan:

A_{326} = serapan pada panjang gelombang 326 nm

m = massa zat uji dalam gram

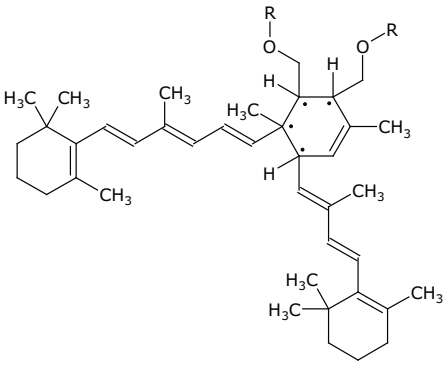
V = total volume yang digunakan sampai konsentrasi 10—15 IU/ml;

1900 = faktor konversi serapan spesifik ester dari retinol dalam IU/g.

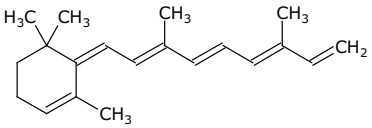
Penyimpanan

Kedap udara dan dilindungi dari cahaya.

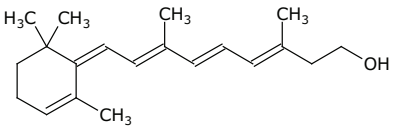
Ketidakmurnian



A. R = H, CO-CH_3: Kitol (Diels-Alder dimers dari vitamin A).



B. (3E,5E,7E)-3,7-dimetil-9-[(1Z)-2,6,6-trimetilsikloheks-2-enilidena)nona-1,3,5,7-tetraena (anhidrovitamin A).

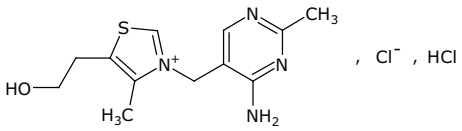


C. (3E,5E,7E)-3,7-dimetil-9-[(1Z)-2,6,6-trimetilsikloheks-2-enilidena)nona-3,5,7-trien-1-ol (retrovitamin A).

D. Produk oksidasi vitamin A.

Vitamin B_1

Thiamine Hydrochloride



$C_{12}H_{17}ClN_4OS$, HCl BM : 337,27 [67-03-8]

Definisi

Vitamin B_1 adalah 3-[(4-amino-2-metilpirimidin-5-il)metil]-5-(2-hidroksietil)-4-metiltiazolium hidroklorida.

Mengandung tidak kurang dari 98,0% dan tidak lebih dari 101,0%, dihitung dengan standar terhadap zat kering.

Karakteristik

Pemerian. Serbuk hablur putih.

Kelarutan. Mudah larut dalam air, sukar larut dalam alkohol, larut dalam gliserol.

Identifikasi

A. Spektrum serapan inframerah sesuai dengan spektrum serapan standar tiamin hidroklorida.

B. Larutkan 20 mg dalam 10 ml air, tambah 1 ml asam asetat encer dan 1,6 ml natrium hidroksida 1 M, panaskan di atas penangas air selama 30 menit, dinginkan. Tambah 5 ml larutan natrium hidroksida, 10 ml larutan kalium ferrisianida dan 10 ml butanol, kocok selama 2 menit. Periksa serapan pada panjang gelombang 365 nm. Ulang pengujian menggunakan 0,9 ml natrium hidroksida 1 M dan 0,2 g natrium sulfat dalam natrium hidroksida 1,6 ml 1 M.

C. Memberikan reaksi klorida.

Larutan S. Larutkan dan encerkan 2,5 g dalam air sampai batas volume 25 ml.

Kejernihan larutan. Larutan jernih dan tidak lebih kuat intensitas warnanya dibandingkan larutan standar.

pH. Larutan 1% b/v, pH 2,7—3,4.

Senyawa sejenis. Lakukan metode kromatografi cair, menggunakan:

Larutan (A). Campuran 5 volume asam asetat glasial dan 95 volume air.

Larutan uji. Larutkan 0,35 g zat uji sampai 15 ml larutan A dan encerkan sampai batas volume 100 ml dengan air.

Larutan standar. Larutkan 5 mg zat uji dan 5 mg ketidakmurnian tiamin dalam 4 ml larutan A dan encerkan dengan air sampai batas volume 25 ml. Pada 5 ml larutan, encerkan dengan air sampai batas volume 25 ml.

Kolom. Oktadesilsilil, ukuran 25 cm x 4,0 mm atau yang sesuai, suhu 45°C.

Fase gerak A. Natrium heksansulfonat 3,764 g/l, atur pH 3,1 dengan asam fosfat.

Fase gerak B. Metanol.

Waktu (menit)	Fase gerak A (% v/v)	Fase gerak B (% v/v)
0 — 25	90 → 70	10 → 30
25 — 33	70 → 50	30 → 50
33 — 40	50	50
40 — 45	50 → 90	50 → 10

Laju alir. 1,0 ml/menit.

Detektor. Spektrofotometer pada panjang gelombang 248 nm.

Injek. 25 µl.

Waktu tambat relatif. Standar tiamin sekitar 30 menit, ketidakmurnian A sekitar 0,3, ketidakmurnian B sekitar 0,9 dan ketidakmurnian C sekitar 1,2.

Kesesuaian sistem larutan standar. Resolusi tidak kurang dari 1,6 antara puncak ketidakmurnian E dan tiamin.

Batas

Ketidakmurnian lain. Tidak lebih dari area puncak utama pada kromatogram dengan larutan standar (b) (0,4%).

Total. Tidak lebih dari 2,5 kali area puncak utama pada kromatogram dengan larutan standar (b) (1,0%).

Abaikan batas. Area puncak utama pada kromatogram tidak lebih dari 0,125 kali larutan standar (b) (0,05%).

Sulfat. Tidak lebih dari 300 ppm. Pada 5 ml larutan S, encerkan dengan air sampai volume 15 ml.

Logam berat. Tidak lebih dari 20 ppm. Pada 12 ml larutan S memenuhi uji batas logam berat. Gunakan standar timbal (2 ppm Pb).

Air. Tidak lebih dari 5,0%. Gunakan 0,04 g.

Abu sulfat. Tidak lebih dari 0,1%. Gunakan 1g.

Susut pengeringan. Tidak lebih dari 5%. Pada pengeringan dengan suhu 105°C selama 2 jam sampai bobot tetap. Gunakan 0,5 g.

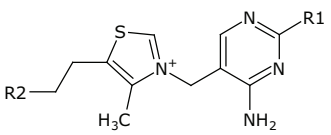
Penetapan kadar

Larutkan 0,110 g dalam 5 ml asam format anhidrat, tambah 50 ml asam asetat glasial. Titrasi menggunakan asam perklorat, tentukan titik akhir secara potensiometrik. Lakukan titrasi blanko. Setiap ml asam perklorat 0,1 M setara dengan 16,86 $C_{12}H_{17}ClN_4OS$.

Penyimpanan

Dalam wadah tertutup baik, dilindungi dari cahaya.

Ketidakmurnian



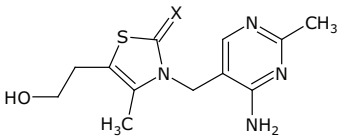
A. R1 = CH_3, R2 = $O\text{-}SO_3$: 3-[(4-amino-2-metilpirimidin-5-il)metil]-4-metil-5-[2-(sulfonatooksi)etil] tiazolium (tiamina sulfat ester).

B. R1 = H, R2 = OH: 3-[(4-aminopirimidin-5-il) metil]-5-(2-hidroksietil)-4-metiltiazolium (desmetiltiamina).

C. R1 = CH_3, R2 = Cl: 3-[(4-amino-2-metilpirimidin-5-il)metil]-5-(2-kloroetil)-4-metiltiazolium (klorotiamina).

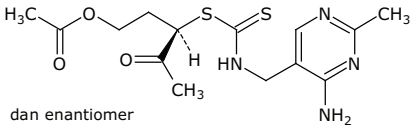
F. R1 = C_2H_5, R2 = OH: 3-[(4-amino-2-etilpirimidin-5-il)metil]-5-(2-hidroksietil)-4-metiltiazolium (etiltiamina).

G. R1 = CH_3, R2 = O-CO-CH_3: 5-[2-(asetiloksi)etil]-3-[(4-amino-2-metilpirimidin-5-il)metil]-4-metiltiazolium (asetiltiamina).



D. X = O: 3-[(4-amino-2-metilpirimidin-5-il)metil]-5-(2-hidroksietil)-4-metiltiazol-2(3H)-on (oksotiamina).

E. X = S: 3-[(4-amino-2-metilpirimidin-5-il)metil]-5-(2-hidroksietil)-4-metiltiazol-2(3H)-tion (tioksotiamina).

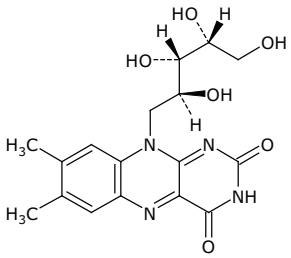


dan enantiomer

H. (3RS)-3-[[[(4-amino-2-metilpirimidin-5-il)metil]tiokarbamoil]sulfanil]-4-oksopentilasetat (ketoditiokarbamat).

Vitamin B_2

Riboflavin



$C_{17}H_{20}N_4O_6$ BM : 376,4 [83-88-5]

Definisi

Riboflavin adalah 7,8-dimetil-10-[(2S,3S,4R)-2,3,4,5-tetrahidrokspentil]benzo[g]pteridin-2,4(3H,10H)-dion.

Mengandung tidak kurang dari 97,0% dan tidak lebih dari 103,0%, dihitung dengan standar terhadap zat kering.

Karakteristik

Pemerian. Serbuk kristal, kuning atau jingga kuning.

Kelarutan. Sangat sukar larut dalam air, praktis tidak larut dalam alkohol. Dalam suasana alkali terlihat polimorfism.

Identifikasi

A. Memenuhi uji rotasi jenis.

B. Periksa kromatogram yang diperoleh dalam lumiflavin. Bercak utama pada kromatogram larutan uji sesuai pada tempat dan ukuran terhadap bercak yang diperoleh dengan larutan standar.

C. Larutkan 1 mg dengan air sampai batas volume 100 ml. Larutan berwarna kuning pucat dengan tranmisi cahaya, berwarna kuning hijau berfluoresensi dengan cahaya balik dan menghilang dengan penambahan asam mineral atau alkali.

Rotasi jenis. Antara +115° dan +135°, dihitung dengan standar terhadap zat kering. Larutkan dan encerkan 50,0 mg dalam natrium hidroksida 0,05 M bebas karbonat sampai volume 10,0 ml.

Serapan cahaya. Encerkan larutan untuk penetapan kadar dengan volume yang sama dengan air. Larutan menunjukkan 4 maksimum pada panjang gelombang 223 nm, 267 nm, 373 nm dan 444 nm. Perbandingan serapan pada maksimum 373 nm dengan maksimum 267 nm adalah 0,31—0,33 dan perbandingan serapan pada maksimum 444 nm dengan maksimum pada 267 nm adalah 0,36—0,39.

Lumiflavin. Lakukan dengan metode kromatografi lapis tipis, menggunakan:

Larutan uji (a). Larutkan 25 mg dalam air sampai volume 10 ml, aduk selama 5 menit dan saring.

Larutan uji (b). Larutkan 25 mg zat uji dalam metilen klorida sampai volume 10 ml dan saring.

Larutan standar (a). Larutkan 25 mg standar riboflavin dalam air sampai volume 10 ml, aduk selama 5 menit dan saring.

Larutan standar (b). Larutkan dan encerkan 25 mg standar lumiflavin dalam metilen klorida sampai batas volume 50,0 ml. Encerkan 1,0 ml larutan dengan metilen klorida sampai volume 20,0 ml.

Larutan standar (c). Encerkan 2,5 ml larutan uji (b) dengan metilen klorida sampai batas volume 100,0 ml.

Lempeng. Silika gel, ukuran 2-10 µm atau yang sesuai.

Fase gerak. Air.

Perlakuan. Untuk masing-masing perlakuan dalam udara kering dan dingin.

Perlakuan pertama. 2 µl metilen klorida R dengan 2 µl larutan uji (a).

Perlakuan kedua. 2 µl metilen klorida R dengan 2 µl larutan standar (a).

Perlakuan ketiga. 2 µl larutan standar dengan 2 µl larutan standar (a).

Perlakuan keempat . 10 µl larutan uji (b).

Perlakuan kelima. 10 µl larutan standar (c).

Detektor. Spektrofotometer pada panjang gelombang 365 nm.

Kesesuaian sistem. Pada kromatogram dengan perlakuan ketiga menunjukkan 2 bercak yang terpisah.

Batas. Pada kromatogram dengan larutan uji (b), bercak lain tidak lebih kuat intensitas warnanya dibandingkan terhadap bercak utama pada kromatogram dengan larutan uji.

Susut pengeringan. Tidak lebih dari 1,5%. Pada pengeringan dengan suhu 105°C sampai bobot tetap. Gunakan 1,0 g.

Abu sulfat. Tidak lebih dari 0,1%. Gunakan hasil residu dari susut pengeringan.

Penetapan kadar

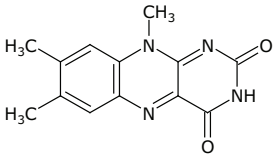
Lakukan dengan metode spektrofotometer, menggunakan larutan uji: Suspensikan 65,0 mg dalam 5 ml air, tambah 5,0 ml larutan natrium hidroksida 100 ml air dan 2,5 ml asam asetat glasial dan encerkan dengan air sampai batas volume 500,0 ml. Pada 20,0 ml larutan, tambah 3,5 ml natrium asetat (14 g/l) dan encerkan dengan air sampai batas volume 200,0 ml.

Ukur serapan pada panjang gelombang 444 nm.

Penyimpanan

Dalam wadah tertutup rapat dan dilindungi dari cahaya.

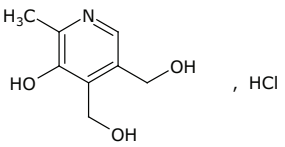
Ketidakmurnian.



7,8,10-trimetilbenzo[g]pteridina-2,4(3H,10H)-dion (Lumiflavin).

Vitamin B_6

Pyridoxine Hydrochloride



$C_8H_{11}NO_3$, HCl BM : 205,64 [58-56-0]

Definisi

Vitamin B_6 adalah (5-hidroksi-6-metilpiridin-3,4-diil) dimetanol hidroklorida. Mengandung tidak kurang dari 99,0% dan tidak lebih dari 101,0% dihitung dengan standar terhadap zat yang kering.

Karakteristik

Pemerian. Serbuk kristal putih atau tidak berwarna.

Kelarutan. Mudah larut dalam air, sukar larut dalam alkohol.

Identifikasi

Identifikasi pertama: B, D.
Identifikasi kedua: A, C, D.

A. Spektrum serapan inframerah sesuai dengan spektrum serapan standar piridoksin hidroklorida.

B. Encerkan 1,0 ml larutan S dengan asam hidroklorida 0,1 M sampai batas volume 50,0 ml (larutan A). Encerkan 1,0 ml larutan A dengan asam hidroklorida sampai batas volume 100,0 ml. Ukur serapan pada panjang gelombang 250—350 nm, menunjukkan serapan maksimum pada panjang gelombang 288—296 nm. Serapan spesifik maksimum pada panjang gelombang 425—445 nm. Encerkan 1,0 ml larutan A dengan campuran kalium dihidrogen fosfat 0,025 M dan larutan dinatrium hidrogen fosfat. Ukur serapan pada panjang gelombang 220 nm dan 350 nm, menunjukkan 2 serapan maksimum pada 248—256 nm dan 320—327 nm. Serapan spesifik maksimum pada 175—195 nm dan 345—365.

C. Periksa kromatogram larutan uji untuk Senyawa Sejenis. Bercak utama pada kromatogram larutan uji sesuai pada tempat, warna dan ukuran bercak utama pada kromatogram dengan larutan standar.

D. Larutan S memberikan reaksi klorida.

Larutan S. Larutkan dan encerkan 2,5 g dalam air bebas karbon dioksida sampai batas volume 50,0 ml.

Kejernihan larutan. Larutan S jernih dan tidak lebih kuat intensitas warnanya dibandingkan larutan standar.

pH. Larutan S pH 2—3,0.

Senyawa sejenis. Lakukan metode kromatografi lapis tipis, menggunakan:

Larutan uji (a). Larutkan dan encerkan 1,0 g zat uji dengan air sampai volume 10,0 ml.

Larutan uji (b). Larutkan 1,0 ml larutan uji (a) dengan air sampai volume 10,0 ml.

Larutan standar (a). Larutkan 0,10 g piridoksin hidroklorida dengan air sampai volume 10,0 ml.

Larutan standar (b). Encerkan 2,5 ml larutan uji dengan air sampai batas volume 100,0 ml.

Fase gerak. Campur 9 volume amoniak, 13 volume metilen klorida, 13 volume tetrahidrofuran dan 65 volume aseton.

Totolkan secara terpisah 2 µl dari setiap larutan. Angkat lempeng dan keringkan di udara. Semprot dengan natrium karbonat (50 g/l) dalam campuran 30 volume alkohol dan 70 volume air. Keringkan dengan bantuan udara aliran udara. Semprot dengan diklorokuinon klorimida (1 g/l) dalam alkohol. Bercak lain pada kromatogram sama dengan bercak utama yang diperoleh larutan uji, tidak lebih kuat intensitas warnanya terhadap bercak pada kromatogram yang diperoleh larutan standar (b) (0,25%). Abaikan bercak yang muncul pada garis awal.

Logam berat. Pada 12,0 ml larutan S dibandingkan dengan larutan uji A (20 ppm). Gunakan standar timbal (1 ppm Pb).

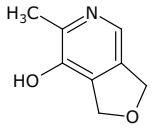
Susut pengeringan. Tidak lebih dari 0,5%. Pada pengeringan dengan suhu 105°C sampai bobot tetap. Gunakan 1,0 g.

Abu sulfat. Tidak lebih dari 0,1%. Gunakan 1g.

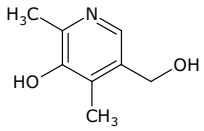
Penetapan kadar

Larutkan 0,150 g dengan 5 ml asam format anhidrat. Tambah 50 ml asetat anhidrat. Titrasi dengan asam perklorat, tentukan titik akhir secara potensiometrik. Lakukan titrasi blanko. Setiap ml asam perklorat 0,1 M setara dengan 20,56 mg $C_8H_{11}NO_3$, HCl.

Ketidakmurnian



A. 6-metil-1,3-dihidrofuro[3,4-c]piridin-7-ol.



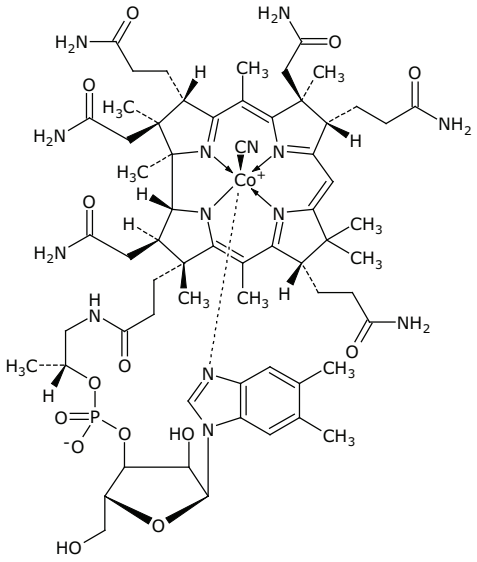
B. 5-(hidroksimetil)-2,4-dimetilpiridin-3-ol

Penyimpanan

Dalam wadah tertutup rapat dan dilindungi dari cahaya.

Vitamin B_{12}

Cyanocobalamin



$C_{63}H_{88}CoN_{14}O_{14}P$ BM : 1355,35 [68-19-9]

Definisi

Vitamin B_{12} adalah α-(5,6-dimetilbenzimida-zol-1-il) kobamida sianida.

Vitamin B_{12} mengandung tidak kurang dari 96,0% dan tidak lebih dari 102,0%, dihitung dengan standar terhadap zat kering.

Karakteristik

Pemerian. Kristal atau serbuk kristal merah tua. Bentuk anhidrat sangat higroskopik.

Kelarutan. Agak sukar larut dalam air dan alkohol, praktis tidak larut dalam aseton.

Identifikasi

A. Spektrum serapan inframerah sesuai dengan spektrum serapan standar sianokobalamin. Larutkan dan encerkan 2,5 mg dengan air sampai batas volume 100,0 ml. Periksa serapan pada panjang gelombang 260 nm dan 610 nm, larutan menunjukkan 3 serapan maksimum pada panjang gelombang 278 nm, panjang gelombang 361 nm dan panjang gelombang 547—559 nm. Nilai serapan pada panjang gelombang maksimum 361 nm, panjang gelombang 547—559 nm adalah 3,15—3,45. Nilai serapan pada maksimum 361 nm—278 nm adalah 1,70—1,90.

B. Lakukan metode kromatografi lapis tipis, menggunakan:

Lempeng. Silika gel G atau yang sesuai.

Larutan uji. Larutkan 2 mg zat uji dalam 1,0 ml campuran alkohol dan air dengan volume yang sama.

Larutan standar. Larutkan 2 mg standar sianokobalamin dalam 1,0 ml campuran alkohol dan air dengan volume yang sama.

Fase gerak. Campur 9 volume larutan amonia, 30 volume metanol dan 45 volume metilen klorida.

Totolkan secara terpisah 10 µl dari setiap larutan. Angkat lempeng dan keringkan di udara. Bercak utama pada kromatogram yang diperoleh dari larutan uji sesuai pada tempat, warna dan ukuran terhadap bercak utama yang diperoleh larutan standar.

Senyawa sejenis. Lakukan metode kromatografi cair, menggunakan:

Larutan uji. Larutkan dan encerkan 10,0 mg zat uji dalam fase gerak sampai volume 10,0 ml. Larutan harus segar.

Larutan standar (a). Encerkan 3,0 ml larutan uji dengan fase gerak sampai batas volume 100,0 ml. Larutan harus segar.

Larutan standar (b). Encerkan 5,0 ml larutan uji dengan fase gerak sampai batas volume 50,0 ml. Pada 1,0 ml larutan, encerkan dengan fase gerak sampai batas volume 100,0 ml. Larutan harus segar.

Larutan standar (c). Larutkan 25 mg zat uji dengan air sampai volume 10,0 ml, panaskan, dinginkan dan tambah 5 ml kloramin (1,0 g/l) dan 0,5 ml asam hidroklorida 0,05 M. Encerkan dengan air sampai batas volume 25,0 ml. Kocok dan diamkan selama 5 menit. Encerkan 1 ml larutan dengan fase gerak sampai 10,0 ml. Larutan harus segar.

Kolom. Oktilsilil (5 µm), ukuran 25 cm x 4 mm atau yang sesuai.

Fase gerak. Campur 26,6 volume metanol dan 73,5 volume disodium hidrogen fosfat (10 g/l), atur pH dengan asam fosfat.

Laju alir. 0,8 ml/menit.

Detektor. Spektrofotometer pada panjang gelombang 361 nm.

Injek. 20 µl dari setiap larutan.

Waktu uji. 3 kali waktu tambat sianokobalamin.

Pada kromatogram yang diperoleh dari larutan uji, jumlah area dari puncak lain yang merupakan bagian dari puncak utama tidak lebih besar dari area puncak utama pada kromatogram yang diperoleh dari larutan standar (a) (3%). Abaikan batas dari area yang kurang dari puncak utama pada kromatogram yang diperoleh

dengan larutan standar (b). Uji tidak absah kecuali jika, pada kromatogram yang diperoleh dengan larutan standar (c), menunjukkan 2 puncak utama, resolusi antara kedua puncak tersebut tidak kurang dari 2,5 dan kromatogram yang diperoleh larutan standar (b) menunjukkan puncak dengan perbandingan puncak gangguan tidak lebih dari 5.

Susut pengeringan. Tidak lebih dari 12%. Pada pengeringan dengan suhu 105°C secara vakum sampai bobot tetap, Gunakan 20,0 mg.

Penetapan kadar

Lakukan dengan metode spektrofotmeter, menggunakan larutan uji: Larutkan 25,0 mg dengan air sampai volume 1000 ml. Ukur serapan pada panjang gelombang 361 nm.

Penyimpanan

Wadah tetutup rapat, dilindungi dari cahaya.

Vitamin B_{12} Injeksi

Definisi

Vitamin B_{12} injeksi mengandung vitamin B_{12} dalam pembawa yang sesuai.

Injeksi memenuhi persyaratan yang dinyatakan untuk sediaan injeksi dan persyaratan berikut.

Mengandung sianokobalamin tidak kurang dari 90,0% dan tidak lebih dari 110,0% dari jumlah yang tertera pada etiket.

Identifikasi

Memenuhi identifikasi yang tertera pada vitamin B_{12}.

Keasaman. pH 4—5,5.

Penetapan kadar

Lakukan seperti yang tertera dalam penetapan kadar vitamin B_{12}.

Penyimpanan

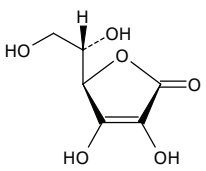
Dalam wadah tertutup, kedap dan dilindungi dari cahaya.

Penandaan

Harus tertera: 1) Komposisi. 2) Jenis sediaan. 3) Indikasi. 4) Waktu kadaluwarsa. 5) Kondisi penyimpanan.

Asam Askorbat

Ascorbic Acid



$C_6H_8O_6$ BM : 176,1 [50-81-7]

Definisi

Asam askorbat mengandung tidak kurang dari 99,0% dan tidak lebih dari 100,5% dari (5R)-5-[(1)-1,2-dihidroksietil]-3,4-dihidroksifuran-2(5H)-on.

Karakteristik

Pemerian. Serbuk kristal putih atau hampir putih.

Kelarutan. Mudah larut dalam air, larut dalam alkohol, praktis tidak larut dalam eter.

Suhu lebur. 190°C, dengan dekomposisi.

Identifikasi

Identifikasi pertama: B, C.
Identifikasi kedua: A, C, D.

A. Larutkan dan encerkan 0,10 g dalam air sampai batas volume 100,0 ml. Pada 1,0 ml larutan, tambah 10 ml asam hidroklorida 0,1 M dan sampai batas volume dengan air 100,0 ml. Ukur serapan maksimum pada panjang gelombang 243 nm dengan segera. Serapan spesifik maksimum adalah 545—585.

B. Spektrum serapan inframerah sesuai dengan spektrum serapan standar asam askorbat.

C. pH larutan S 2,1—2,6.

D. Pada 1 ml larutan S, tambah 2 ml asam nitrat encer dan 0,2 ml larutan perak nitrat. Terbentuk endapan abu-abu.

Larutan S. Larutkan dan encerkan 1,0 g dalam air bebas karbon dioksida sampai volume 20 ml.

Kejernihan larutan. Larutan S jernih dan tidak lebih kuat intensitas warnanya dibandingkan larutan standar BY_7.

Rotasi jenis. Larutkan dan encerkan 2,50 g dalam air sampai batas volume 25,0 ml. Rotasi jenis +20,5 sampai +21,5.

Asam oksalat

Larutan uji. Larutkan 0,25 g dalam 5 ml air. Netralkan dengan larutan natrium hidroksida encer, tambah 1 ml asam asetat encer dan 0,5 ml larutan kalsium klorida. Diamkan selama 1 jam.

Larutan standar. Larutkan 70 mg asam oksalat dalam air dan encerkan sampai batas volume 500 ml. Pada 5 ml larutan, tambah 1 ml asam asetat encer dan 0,5 ml larutan kalsium klorida. Diamkan selama 1 jam. Opalesensi dalam larutan uji tidak lebih kuat intensitasnya dibandingkan standar (0,2%).

Tembaga. Tidak lebih dari 5 ppm tembaga, lakukan dengan metode spektrofotometer serapan atom, menggunakan:

Larutan uji. Larutkan dan encerkan 2,0 g zat uji dalam asam nitrat 0,1 M sampai volume 25 ml.

Larutan standar. Encerkan larutan standar tembaga (10 ppm Cu) dengan asam nitrat 0,1 M sampai kosentrasi 0,2 ppm, 0,4 ppm dan 0,6 ppm tembaga.

Ukur serapan pada panjang gelombang 324,8 nm, gunakan lampu katoda tembaga dan gas asetilen-udara. Lakukan penyesuaian blanko menggunakan asam nitrat 0,1 M.

Besi. Tidak lebih dari 2 ppm besi, lakukan dengan metode spektrofotometer serapan atom, menggunakan:

Larutan uji. Larutkan 5,0 g zat uji dalam asam nitrat 0,1 M sampai volume 25,0 ml.

Larutan standar. Encerkan larutan standar besi (20 ppm Fe) dengan asam nitrat 0,1 M sampai kosentrasi 0,2 ppm, 0,4 ppm dan 0,6 ppm besi.

Ukur serapan pada panjang gelombang 248,3 nm, gunakan lampu katoda besi dan gas asetilen-udara. Lakukan penyesuaian blanko menggunakan asam nitart 0,1 M.

Logam berat. Larutkan dan encerkan 2,0 g dalam air sampai volume 20 ml. Pada 12 ml larutan memenuhi uji batas logam berat (10 ppm). Gunakan standar timbal (1 ppm Pb).

Abu sulfat. Tidak lebih dari 0,1%. Gunakan 1g.

Penetapan kadar

Larutkan 0,15 g dalam campuran 10 ml asam sulfat encer dan 80 ml air bebas karbon dioksida. Tambah 1 ml larutan kanji. Titrasi dengan iodium 0,05 M sampai terbentuk warna biru-violet. Setiap ml iodium 0,05 M setara dengan 8,81 mg $C_6H_8O_6$.

Penyimpanan

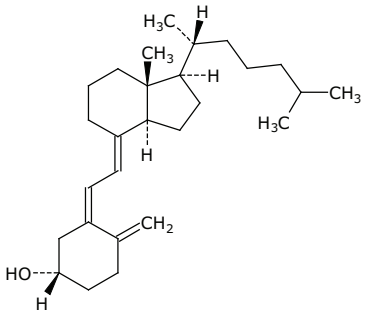
Dilindungi dari cahaya.

Khasiat

Gunakan dalam defisiensi vitamin C.

Vitamin D

Cholecalciferol



$C_{27}H_{44}O$ BM : 384,6 [67-97-0]

Definisi

Kolekalsiferol mengandung tidak kurang dari 97,0% dan tidak lebih dari 103,0% dari (5Z,7E)-9,10-sekokolesta-5,7,10(19)-trien-3b-ol. Setiap mg kolekalsiferol setara dengan 40.000 IU aktivitas antirakhitis (vitamin D) dalam tikus.

Karakteristik

Pemerian. Kristal putih atau hampir putih.

Kelarutan. Praktis tidak larut dalam air, mudah larut dalam alkohol, larut dalam minyak lemak. Sensitif terhadap udara, panas dan cahaya. Larutan mudah menguap dan harus segera digunakan.

Identifikasi

Spektrum serapan inframerah sesuai dengan spektrum serapan standar kolekalsiferol.

Rotasi jenis. Larutkan dan encerkan 0,2 g dalam alkohol bebas aldehid sampai volume 25,0 ml. Rotasi jenis +105 sampai +112.

Penetapan kadar

Lakukan dengan metode kromatografi cair, menggunakan:

Larutan uji. Larutkan 10,0 mg zat uji dalam 10,0 ml toluen dan encerkan dengan fase gerak sampai batas volume 100,0 ml.

Larutan standar (a). Larutkan 10,0 mg standar kolekalsiferol dalam 10,0 ml toluen dan encerkan dengan fase gerak sampai batas volume 100,0 ml.

Larutan standar (b). Encerkan 1,0 ml standar kolekalsiferol dengan fase gerak sampai volume 5,0 ml. Panaskan dalam penangas air pada suhu 90°C di bawah refluks kondensor selama 45 menit dan dinginkan.

Kolom. Silika gel 5 µm, ukuran 25 cm x 4,6 mm atau yang sesuai.

Laju alir. 2 ml/menit.

Fase gerak. Campur 3 volume pentanol dan 997 volume heksan.

Detektor. Spektrofotometer pada panjang gelombang 254 nm.

Injek larutan standar (b). Lakukan penyesuaian sensitivitas sistem sehingga tinggi puncak utama adalah 50% dari skala-penuh.

Injek larutan standar (b) 6 kali. Waktu tambat relatif terhadap kolekalsiferol adalah 0,4 untuk pre-kolekalsiferol dan 0,5 untuk trans-kolekalsiferol. Simpangan baku relatif tidak lebih besar dari 1%, resolusi antara puncak pre-kolekalsiferol dan trans-kolekalsiferol tidak kurang dari 1,0. Jika diperlukan, lakukan penyesuaian komposisi dalam fase gerak dan laju alir fase gerak untuk memperoleh resolusi.

Injek larutan standar (a). Lakukan penyesuaian sensitivitas sistem sehingga tinggi puncak utama adalah 50% dari skala-penuh.

Injek larutan uji dan hitung kolekalsiferol dalam IU/g dengan rumus:

$$\frac{m'}{m} \times \frac{S_D}{S'_D} \times 100$$

Keterangan:

m = jumlah zat uji (mg)

m' = jumlah standar kolekalsiferol dalam larutan standar (a) (mg)

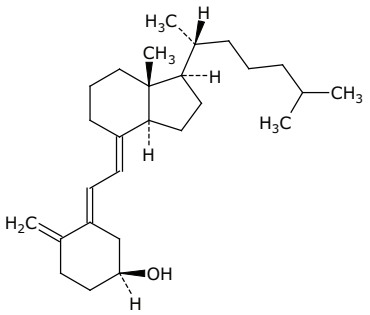
S_D = area kolekalsiferol larutan uji

S'_D = area kolekalsiferol larutan standar (a)

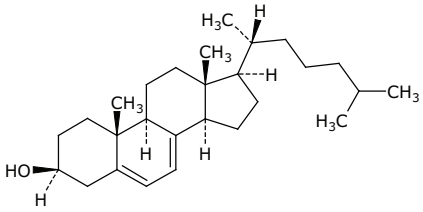
Penyimpanan

Simpan pada suhu 2°—8°C.

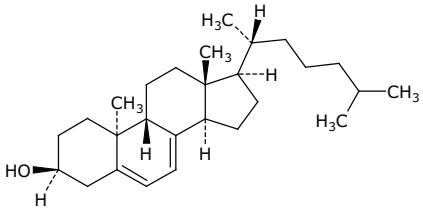
Ketidakmurnian



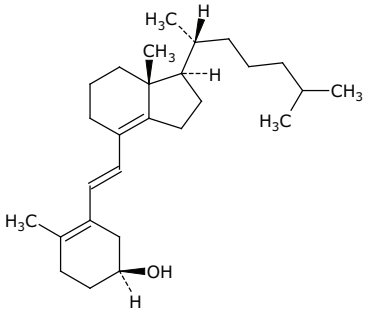
A. (5E,7E)-9,10-sekokolesta-5,7,10(19)-trien-3b-ol (transkolekalsiferol, trans-vitamin D3).



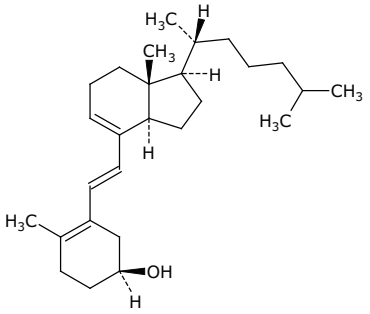
B. Kolesta-5,7-dien-3b-ol (7,8-didehidrokolesterol, provitamin D3).



C. 9b,10a-kolesta-5,7-dien-3b-ol (lumisterol 3).



D. (6E)-9,10-sekokolesta-5(10),6,8(14)-trien-3b-ol (isotakisterol 3).



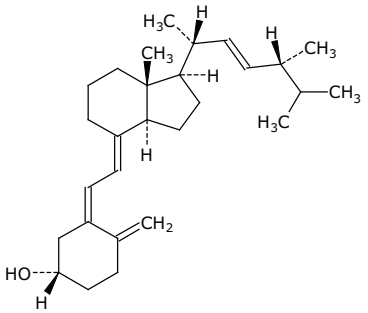
E. (6E)-9,10-sekokolesta-5(10),6,8-trien-3b-ol (takisterol 3).

Khasiat

Penanganan kekurangan vitamin D.

Vitamin D_2

Ergocalciferol



$C_{28}H_{44}O$ BM : 396,7 [50-14-6]

Definisi

Ergokalsiferol mengandung tidak kurang dari 97,0% dan tidak lebih dari 103,0% dari (5Z,7E,22E)-9,10-sekoergosta-5,7,10(19),22-tetraen-3b-ol.

Karakteristik

Pemerian. Serbuk kristal putih atau sedikit kekuningan.

Kelarutan. Praktis tidak larut dalam air, mudah larut dalam alkohol dan minyak mineral. Sensitif terhadap udara, panas dan cahaya. Larutan dalam pelarut yang mudah menguap tidak stabil dan harus segar.

Identifikasi

Spektrum serapan inframerah sesuai dengan spektrum serapan standar ergokalsiferol.

Rotasi jenis. Larutkan dan encerkan 0,2 dalam alkohol bebas aldehid sampai batas volume 25,0 ml. Uji dalam 30 menit +103 sampai +112.

Pengurangan senyawa. Lakukan dengan metode spektrofotometer, menggunakan:

Larutan uji. Larutkan dan encerkan 0,1 g dalam alkohol bebas aldehid sampai volume 10,0 ml. Tambah 0,5 ml tetrazolium biru (5 g/l dalam alkohol bebas aldehid) dan 0,5 ml tetrametilamonium hidroklorida encer. Biarkan selama 5 menit dan tambah 1,0 ml asam asetat glasial.

Larutan standar. Encerkan 10,0 ml larutan yang mengandung hidrokuinon (0,2 µg/ml dalam alkohol bebas aldehid) dalam alkohol bebas aldehid sampai volume 10,0 ml. Tambah 0,5 ml tetrazolium biru (5 g/l dalam alkohol bebas aldehid) dan 0,5 ml tetrametilamonium hidroklorida encer. Biarkan selama 5 menit dan tambah 1,0 ml asam asetat glasial. Ukur serapan pada panjang gelombang 525 nm menggunakan cairan kompensasi 10,0 ml alkohol bebas aldehid. Serapan larutan uji tidak lebih besar dari larutan standar (20 ppm).

Ergosterol. Lakukan dengan metode kromatografi lapis tipis, menggunakan:

Lempeng. Silika gel G atau yang sesuai.

Larutan uji. Larutkan dan encerkan 0,25 g zat uji dalam etilen klorida yang mengandung skualen (10 g/l) dan butil hidroksitoluen (0,1 g/l) sampai volume 5 ml. Larutan harus segar.

Larutan standar (a). Larutkan dan encerkan 0,1 g standar ergokalsiferol dalam etilen klorida yang mengandung skualen (10 g/l) dan butil hidroksitoluen (0,1 g/l) sampai volume 2 ml. Larutan harus segar.

Larutan standar (b). Larutkan dan encerkan 5 mg standar ergosterol dalam etilen klorida yang mengandung skualen (10 g/l) dan butil hidroksitoluen (0,1 g/l) sampai batas volume 50 ml. Larutan harus segar.

Larutan standar (c). Campur larutan standar (a) dan larutan standar (b) dengan volume yang sama. Larutan harus segar.

Fase gerak. Campur sikloheksan dan eter bebas peroksida dengan volume yang sama, campuran mengandung butilhidroksitoluen (0,1 g/l).

Totolkan 10 µl secara terpisah pada lempeng dari larutan uji, larutan standar (a), (b) dan 20 µl larutan standar (c). Lindungi dari cahaya. Angkat lempeng dan keringkan di udara. Semprot 3 kali dengan antimoni triklorida. (Larutkan 110 g antimoni triklorida dalam 400 ml 1,2-dikloroetan. Tambah 2 g aluminium oksida anhidrat, aduk dan saring. Encerkan dengan 1,2-dikloroetan sampai batas volume 500 ml, aduk. Serapan larutan pada panjang gelombang 500 nm tidak lebih dari 0,7). Periksa kromatogram selama 4 menit setelah penyemprotan. Bercak utama yang diperoleh dengan larutan uji adalah coklat. Pada kromatogram yang diperoleh dengan larutan uji, secara perlahan terlihat bercak violet (ergosterol) di bawah bercak utama dan tidak lebih kuat intensitas dibandingkan bercak yang diperoleh dengan larutan standar (b) (0,2%). Tidak ada bercak yang tidak sesuai dengan bercak yang diperoleh dengan bercak pada larutan standar (a) dan (b). Uji tidak absah, kecuali jika kromatogram yang diperoleh dengan larutan standar (c) menunjukkan dua bercak yang terpisah.

Penetapan kadar

Lakukan dengan metode kromatografi cair, menggunakan:

Larutan uji. Larutkan 10,0 mg zat uji dalam 10,0 ml toluen dan encerkan dengan fase gerak sampai batas volume 100,0 ml.

Larutan standar (a). Larutkan 10,0 mg standar ergokalsiferol dalam 10,0 ml toluen dan encerkan dengan fase gerak sampai batas volume 100,0 ml.

Larutan standar (b). Larutkan 1,0 ml standar kolekalsiferol dengan fase gerak sampai volume 5,0 ml. Panaskan dalam penangas air pada suhu 90°C dengan refluk kondensor selama 45 menit dan dinginkan.

Kolom. Silika gel 5 µm, 25 cm x 4,6 mm.

Laju alir. 2 ml/menit.

Fase gerak. Campur 3 volume pentanol dan 997 volume heksan.

Detektor. Spektrofotometer pada panjang gelombang 254 nm.

Injek larutan standar (b). Lakukan penyesuaian sensitivitas sistem sehingga tinggi puncak utama adalah 50% dari skala-penuh.

Injek larutan standar (b). 6 kali. Waktu tambat relatif terhadap kolekalsiferol adalah 0,4 untuk pre-kolekalsiferol dan 0,5 untuk trans-kolekalsiferol. Simpangan baku relatif kolekalsiferol tidak lebih besar dari 1% serta resolusi antara puncak pre-kolekalsiferol dan trans-kolekalsiferol tidak kurang dari 1,0. Jika diperlukan, lakukan penyesuaian komposisi dalam fase gerak dan laju alir fase gerak untuk memperoleh resolusi ini.

Injek larutan standar (a). Lakukan penyesuaian sensitivitas sistem sehingga tinggi puncak utama adalah 50% dari skala-penuh.

Injek larutan uji dan hitung kolekalsiferol dalam IU/g dengan rumus:

$$\frac{m'}{m} \times \frac{S_D}{S'_D} \times 100$$

Keterangan:

m = jumlah zat uji (mg)

m' = jumlah kolekalsiferol dalam larutan standar (a) (mg)

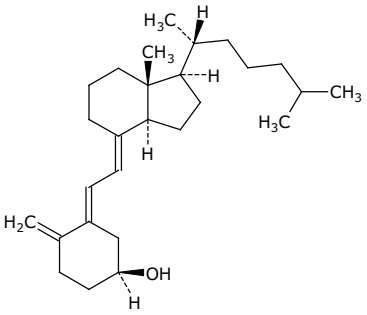
S_D = area kolekalsiferol larutan uji

S'_D = area kolekalsiferol larutan standar (a)

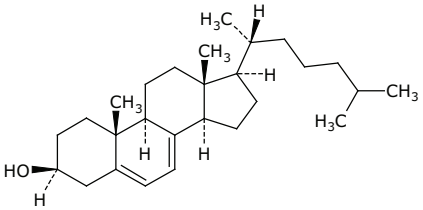
Penyimpanan

Kedap udara, dilindungi dari cahaya dan simpan pada suhu 2°—8°C.

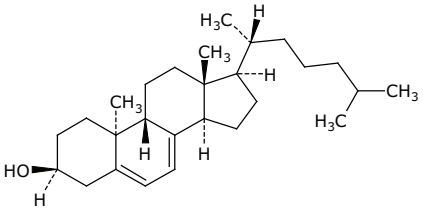
Ketidakmurnian



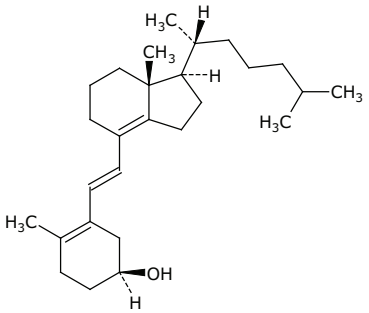
A. (5E,7E)-9,10-sekokolesta-5,7,10(19)-trien-3b-ol (trans-kolekalsiferol, trans-vitamin D3).



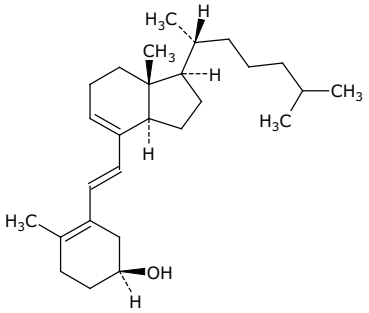
B. Kolesta-5,7-dien-3b-ol (7,8-didehidrokolesterol, provitamin D3).



C. 9b,10a-kolesta-5,7-dien-3b-ol (lumisterol 3).



D. (6E)-9,10-sekokolesta-5(10),6,8(14)-trien-3b-ol (iso-takisterol 3).



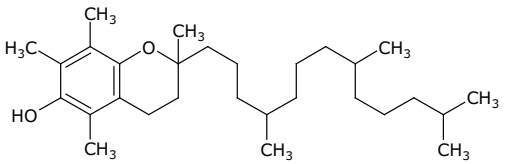
E. (6E)-9,10-sekokolesta-5(10),6,8-trien-3b-ol (takisterol 3).

Khasiat

Penanganan kekurangan vitamin D.

Vitamin E

α-Tocopherol



$C_{29}H_{50}O_2$ BM : 430,7 [59-02-9]

Definisi

All-rac-2,5,7,8-tetrametil-2-(4,8,12-trimetil tridesil)-3,4-dihidro-2H-1-benzopiran-6-ol.

Mengandung tidak kurang dari 96,0% dan tidak lebih dari 102,0%.

Karakteristik

Pemerian. Minyak kental, jernih, tidak berwarna atau coklat kekuningan.

Kelarutan. Praktis tidak larut dalam air, mudah larut dalam aseton, etanol anhidrat, metilen klorida dan minyak.

Identifikasi

Identifikasi pertama: A, B.
Identifikasi kedua: A, C.

A. Rotasi jenis –0,01° sampai +0,01°. Larutkan dan encerkan 2,5 g dalam etanol anhidrat sampai batas volume 25,0 ml.

B. Spektrum serapan inframerah sesuai dengan spektrum serapan standar α-tokoferol.

C. Lakukan dengan metode kromatografi lapis tipis, menggunakan:

Larutan uji. Larutkan 10 mg zat uji dalam 2 ml sikloheksan.

Larutan standar. Larutkan 10 mg standar α-tokoferol dalam 2 ml sikloheksan.

Lempeng. Silika gel F_{254} atau yang sesuai.

Fase gerak. Campur eter dan sikloheksan (20:80 v/v).

Totolkan secara terpisah 10 µl dari setiap larutan. Angkat lempeng dan keringkan di udara. Periksa dengan cahaya ultraviolet (254 nm). Bercak utama pada kromatogram yang diperoleh dengan larutan uji sesuai pada tempat dan ukuran terhadap bercak utama yang diperoleh dengan larutan standar.

Senyawa sejenis. Lakukan dengan metode kromatografi gas, menggunakan:

Larutan standar internal. Larutkan dan encerkan 1,0 g skualen dalam sikloheksan sampai batas volume 100,0 ml.

Larutan uji (a). Larutan dan encerkan 0,1 zat uji dalam larutan standar internal sampai volume 10,0 ml.

Larutan uji (b). Larutkan 0,1 g zat uji dalam 10 ml sikloheksan.

Larutan standar (a). Larutkan 0,1 standar α-tokoferol dalam 10,0 ml larutan standar internal.

Larutan standar (b). Larutkan dan encerkan10 mg zat uji dan 10 mg α-tokoferil asetat dalam sikloheksan sampai batas volume 100,0 ml.

Larutan standar (c). Larutkan dan encerkan 10 mg standar all-rac-α-tokoferol untuk identifikasi (ketidakmurnian A dan B) dalam sikloheksan sampai volume 1 ml.

Larutan standar (d). Encerkan 1,0 ml larutan uji (b) dengan sikloheksan sampai batas volume 100,0 ml. Encerkan 1,0 ml larutan dengan sikloheksan sampai volume 10,0 ml.

Kolom. Silika polidimetilsiloksan (0,25 µm), ukuran 30 m x 0,25 mm atau yang sesuai, suhu kolom 280°C, suhu injektor 290°C.

Gas pembawa. Helium.

Laju alir. 1 ml/menit.

Perbandingan pemisahan. 1:100.

Detektor. Flame Ionisation Detector (FID), suhu detektor 290°C.

Injek. 1 µl larutan uji (b) dan larutan standar (b), (c) dan (d).

Waktu uji. 2 kali waktu tambat all-rac-α-tokoferol.

Identifikasi ketidakmurnian. Gunakan kromatogram standar all-rac-α-tokoferol untuk identifikasi puncak dan pada kromatogram yang diperoleh dengan larutan standar (c) untuk indentifikasi puncak ketidakmurnian A dan B.

Waktu tambat relatif. Standar all-rac-α-tokoferol sekitar 13 menit, skualen sekitar 0,5, ketidakmurnian A sekitar 0,7, ketidakmurnian B sekitar 0,8, ketidakmurnian C dan D sekitar 1,05 (setelah puncak all-rac-α-tokoferol terelusi).

Kesesuaian sistem larutan standar (b). Resolusi tidak kurang dari 3,5 antara puncak all-rac-α-tokoferol dan α-tokoferil asetat.

Batas

Ketidakmurnian A. Tidak lebih dari 0,5%.

Jumlah ketidakmurnian C dan D. Tidak lebih dari 1,0%.

Ketidakmurnian lain. Untuk setiap ketidakmurnian, tidak lebih dari 0,25%.

Total. Tidak lebih dari 2,5%.

Abaikan batas. Area puncak utama pada kromatogram yang diperoleh larutan standar (d) (0,1%).

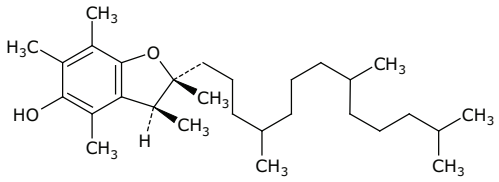
Penetapan kadar

Lakukan dengan metode kromatografi gas seperti dalam uji Senyawa Sejenis, menggunakan larutan uji (a) dan standar (a).

Penyimpanan

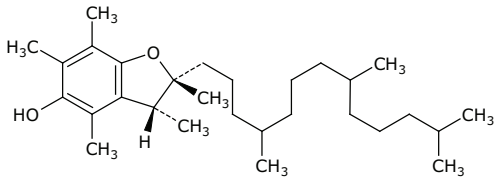
Dilindungi dari cahaya.

Ketidakmurnian



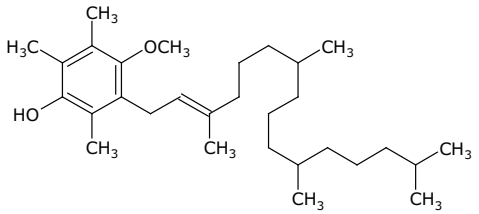
dan diastereoisomer

A. All-rac-trans-2,3,4,6,7-pentametil-2-(4,8,12-trimetiltridesil)-2,3-dihidrobenzofuran-5-ol.

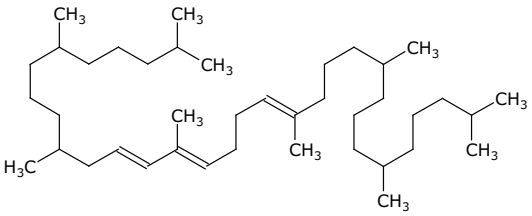


dan diastereoisomer

B. All-rac-cis-2,3,4,6,7-pentametil-2-(4,8,12-trimetiltridesil)-2,3-dihidrobenzofuran-5-ol.



C. 4-metoksi-2,3,6-trimetil-5-[(all-RS,E)-3,7,11,15-tetrametilheksadek-2-enil]fenol.



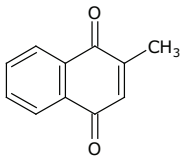
D. (All-RS,all-E)-2,6,10,14,19,23,27,31-oktametildotriakonta-12,14,18-triena.

Khasiat

Penanganan kekurangan vitamin E.

Vitamin K

Menadione



$C_{11}H_8O_2$ BM : 172,18 [58-27-5]

Definisi

Menadion mengandung tidak kurang dari 98,5% dan tidak lebih dari 101,0% dari 2-metilnaftalen-1,4-dion, dihitung dengan standar terhadap zat kering.

Karakteristik

Pemerian. Serbuk kristal kuning pucat.

Kelarutan. Praktis tidak larut dalam air, mudah larut dalam toluen, agak sukar larut dalam alkohol dan metanol, larut dalam benzen dan minyak nabati.

Identifikasi

Identifikasi pertama: A, B.
Identifikasi kedua: A, C dan D.

A. Suhu lebur 105°—108°C

B. Spektrum serapan inframerah sesuai dengan spektrum serapan standar menadion.

C. Larutkan 1 mg dalam 5 ml alkohol, tambah 2 ml amonia dan 0,2 ml etilsianoasetat. Terbentuk warna violet. Tambah 2 ml asam hidroklorida. Warna larutan hilang.

D. Larutkan 10 mg dalam 1 ml alkohol, tambah 1 ml asam hidroklorida dan panaskan di atas penangas air. Terbentuk warna merah.

Senyawa sejenis. Lakukan dengan metode kromatografi lapis tipis, menggunakan:

Lempeng. Silika gel GF_{254} atau yang sesuai.

Fase gerak. Campur 1 volume nitrometan, 2 volume aseton, 5 volume etilen klorida dan 90 volume sikloheksan.

Larutan uji. Larutkan dan encerkan 0,2 g dalam aseton sampai volume 10,0 ml.

Larutan standar. Encerkan larutan uji dengan aseton sampai batas volume 100,0 ml.

Totolkan 5 µl secara terpisah pada lempeng dari setiap larutan. Angkat lempeng dan keringkan dengan aliran udara panas. Ulangi proses pengembangan dan pengeringan 2 kali. Periksa dengan cahaya ultraviolet (254 nm). Bercak lain pada kromatogram yang diperoleh dengan larutan uji merupakan bagian dari bercak utama, tidak lebih kuat intensitasnya dibandingkan dengan bercak yang diperoleh dengan larutan standar (0,5%).

Susut pengeringan. Tidak lebih dari 0,5%. Pada pengeringan di atas fosfor pentoksida dengan tekanan 2—3 kPa selama 4 jam. Gunakan 1 g.

Abu sulfat. Tidak lebih dari 0,1%. Gunakan 1g.

Penetapan kadar

Larutkan 0,15 g dalam 15 ml asam asetat glasial, tambah 15 ml asam hidroklorida encer, dan 1 g serbuk seng. Biarkan selama 60 menit (lindungi dari cahaya) sambil di aduk. Saring, bilas 3 kali masing-masing dengan 10 ml air bebas karbondioksida dan tambah 0,1 ml feroin. Titrasi dengan amonium serium nitrat 0,1 M. Setiap ml amonium serium nitrat setara dengan 8,61 mg $C_{11}H_8O_2$.

Penyimpanan

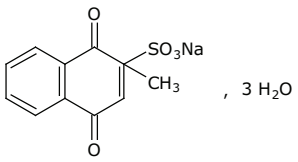
Dalam wadah tertutup baik, dilindungi dari cahaya.

Khasiat

Antihemoragi sumber vitamin K.

Vitamin K_3

Menadione Sodium Bisulphite



$C_{11}H_9NaO_5S$, $3H_2O$ BM : 330,28 [130-37-0]

Definisi

Vitamin K_3 adalah campuran yang terdiri dari menadion natrium bisulfit dan natrium bisulfit. Mengandung tidak kurang dari 63,0% dan tidak lebih dari 75,0% menadion natrium bisulfit, dan tidak kurang dari 30,0% dan tidak lebih dari 38,0% natrium bisulfit.

Karakteristik

Pemerian. Serbuk kristal putih, higroskopik.

Kelarutan. Mudah larut dalam air, sangat sukar larut dalam etanol (95%), kloroform dan eter, praktis tidak larut dalam benzen.

Identifikasi

A. Larutkan 100 mg dalam 10 ml air, tambah 3 ml larutan natrium karbonat monohidrat (1 dalam 10). Ekstrak endapan 2 kali masing-masing dengan 5 ml kloroform. Saring lapisan kloroform dan uapkan hasil saringan sampai kering. Larutkan residu dalam beberapa ml etanol (95%), uapkan sampai kering. Suhu lebur 104°—107°C.

B. Pada 50 mg endapan yang diperoleh pada identifikasi A. Tambah 5 ml air dan 75 mg natrium bisulfit, panaskan di atas penangas air, kocok sampai larut dan larutan hampir tidak berwarna. Encerkan dengan air sampai batas volume 50 ml dan aduk. Pada 2 ml, tambah 2 ml campuran etanol (95%) dan amonium hidroksida dengan volume yang sama, kocok. Tambah 3 tetes etil sianoasetat, terbentuk warna biru keunguan. Tambah 1 ml natrium hidroksida 33,3% b/v. Terbentuk warna kuning.

C. Pada 2 ml larutan 4% b/v, tambah beberapa tetes asam hidroklorida encer, hangatkan, tercium bau sulfurdioksida.

Natrium bisulfit. Larutkan dan encerkan 2 g dengan air sampai batas volume 100 ml. Pada 15 ml, tambah 25 ml iodium 0,1 M, sumbat, aduk, diamkan selama 5 menit. Tambah 1 ml asam hidroklorida, titrasi dengan natrium tiosulfat 0,1 M, menggunakan larutan kanji sebagai indikator. Lakukan titrasi blanko. Setiap ml iodium 1 M setara dengan 5,203 mg $NaHSO_3$.

Selenium. Tidak lebih dari 3 ppm.

Air. 9%—13%.

Penetapan kadar

Lakukan dengan metode spektrofotometer, menggunakan:

Larutan standar. Larutkan dan encerkan 50 mg standar menadion dengan kloroform sampai batas volume 250 ml, aduk. Pada 2 ml, encerkan dengan etanol absolut sampai kosentrasi 4 g/ml.

Larutan uji. Larutkan dan encerkan 1 g dengan air sampai batas volume 200 ml. Pada 20 ml, tambah 40 ml kloroform dan 5 ml larutan natrium karbonat monohidrat (1 dalam 10), kocok selama 30 detik, biarkan terpisah. Saring fase kloroform melalui kapas. Bilas penyaring dengan 40 ml kloroform. Campur bilasan ke dalam ekstrak hasil saringan. Ekstrak fase air 2 kali, masing-masing dengan 20 ml kloroform, saring, bilas penyaring dengan 20 ml kloroform. Campur hasil saringan dan cairan bilasan ke dalam ekstrak. Encerkan dengan kloroform sampai batas volume 200 ml, aduk. Pada 2 ml, encerkan dengan etanol (95%) sampai batas volume 100 ml, aduk.

Ukur serapan pada panjang gelombang 250 nm terhadap blanko 1 volume kloroform dalam 50 volume etanol absolut.

Hitung jumlah dalam mg $C_{11}H_9NaO_5S.3H_2O$, dengan rumus:

$$\left(\frac{330,08}{172,18}\right) \times 100 \left(C \times \left(\frac{A_S}{A_{Std}}\right)\right)$$

C = kadar menadion bisulfit (mg/ml)

A_S = serapan larutan uji

A_{Std} = serapan larutan standar

Penyimpanan
Dilindung dari cahaya.

Khasiat
Antihemoragi, sumber vitamin K.

Mineral Serbuk Oral

Definisi
Mineral serbuk oral mengandung dua atau lebih mineral dilengkapi dengan satu atau lebih unsur-unsur berikut dalam ionisasi: kalsium, kromium, tembaga, fluorin, iodium, besi, magnesium, mangan, molibdenum, fosfor, kalium, selenium, dan seng serta dapat mengandung zat lain yang tertera dalam etiket dengan jumlah yang akurat.

Serbuk oral memenuhi persyaratan yang dinyatakan untuk sediaan serbuk oral dan persyaratan berikut:

Mengandung tidak kurang dari 80,0% untuk kalsium (Ca), tembaga (Cu), besi (Fe), magnesium (Mg), mangan (Mn), fosfor (P), kalium (K), dan seng (Zn); kromium (Cr), fluorin (F), iodium (I), molibdenum (Mo), dan selenium (Se), dari jumlah yang tertera pada etiket.

Identifikasi
Lakukan dengan cara seperti yang tertera pada penetapan kadar.

Penetapan kadar
Besi
Lakukan dengan metode spektrofotometer serapan atom, menggunakan:

Larutan stok standar besi. Pada 100 mg standar besi larutkan dalam 25 ml asam hidroklorida 6 M, encerkan dengan air sampai batas volume 1000 ml dan aduk.

Larutan standar. Encerkan 2,0; 4,0; 5,0; 6,0 dan 8,0 ml larutan stok standar besi dengan air sampai konsentrasi 2,0; 4,0; 5,0; 6,0 dan 8,0 µg/ml.

Larutan uji. Lakukan seperti dalam pengujian kalsium, kecuali untuk persiapan larutan uji mengandung 5 µg/ml dan hilangkan penggunaan larutan lantanum klorida.

Hitung kadar (mg/ml) dengan rumus:

$$0{,}001\,CD$$

Keterangan:
D = faktor pelarut yang digunakan untuk menyiapkan larutan uji.

Fluorida
Lakukan penetapan kadar dengan salah satu metode berikut:

1. Lakukan dengan metode volt-meter, menggunakan:

   Larutan natrium asetat 3 M. Larutkan 408 g natrium asetat dalam 600 ml air labu -1000 ml. Biarkan larutan sampai ekuilibrium tercapai pada suhu ruang, encerkan dengan air sampai volume 1000 ml dan aduk. Atur pH 7,0 dengan asam asetat 7.

   Larutan natrium sitrat. Larutkan 222 g natrium sitrat dalam 250 ml air, tambahkan 28 ml asam perklorat dan encerkan dengan air sampai batas volume 1000 ml dan aduk.

   Larutan stok standar fluorida. Pindahkan 1,105 g standar natrium fluoride (sebelumnya dikeringkan pada suhu 100°C selama 4 jam dan dinginkan dalam desikator), ke dalam labu - 1000 ml. Larutkan dan encerkan dengan air sampai konsentrasi 500 µg/ml.

   Larutan stok intermediate (1). Pipet 20 ml larutan stok standar fluorida ke dalam labu -100 ml, encerkan dengan air sampai konsentrasi 100 µg/ml.

   Larutan stok intermediate (2). Pipet 20 ml larutan stok standar fluorida ke dalam labu -100 ml, encerkan dengan air sampai konsentrasi 10 µg/ml.

   Larutan standar. Pada lima labu – 100 ml yang terpisah, pindahkan 3,0; 5,0 dan 10,0 m larutan stok intermediate-2 serta 5,0 dan 10,0 ml larutan stok intermediate-1. Untuk setiap labu, tambah10 ml asam hidroklorida 1 M, 25 ml larutan natrium asetat 3 M dan 25 ml larutan natrium sitrat. Encerkan isi setiap labu dengan air sampai konsentrasi 0,3; 0,5; 1,0; 5,0 dan 10,0 µg/ml.

   Larutan uji. Pindahkan sediaan setara dengan 200 µg fluorida, ke dalam labu -100 ml. Larutkan dalam 10 ml asam hidroklorida 1 M, 25 ml larutan natrium asetat 3 M, dan 25 ml larutan natrium sitrat, encerkan dengan air sampai bats volume 100 ml dan aduk.

   Prosedur. Pada 50 ml larutan standar dan larutan uji pada gelas piala plastik terpisah.

   Ukur potential (lihat pH), dalam mV, larutan standar dan larutan uji, dengan pH meter mampu reprodusibilitas minimum ±0,2 mV dan lengkapi dengan electrode spesifik untuk ion fluorida serta elektroda standar kalomel. [ketika pengukuran dilakukan, benamkan elektroda dalam larutan yang diaduk dengan magnetic stirrer selama 1—2 menit], dan catat potensial. Bilas dan keringkan elektroda antara pengukuran secara hati-hati untuk menghindari kerusakkan kristal elektroda ion-spesifik]. Buat kurva respon standar dalam µg/ml dengan potensial dalam mV. Hitung konsentrasi, C (µg/ml), dari fluorida dalam larutan uji. Hitung kadar dari fluorida (mg) pada sediaan menggunakan rumus:

   $$0{,}1\,C$$

2. Lakukan dengan metode kromatografi cair, menggunakan:

   Dapar pH 10. Tambahkan 214 ml natrium hidroksida 0,1 M ke dalam 1000 ml natrium bikarbonat 0,05 M.

   Fase gerak. Campuran air, alkohol dan asam sulfat 0,1 M(175:20:5). Jika perlu, buat penyesuaian (lihat kesesuaian sistem kromatografi).

Larutan stok standar. Larutkan dan encerkan standar natrium fluorida dalam air sampai konsentrasi fluorida 100 µg/ml.

Larutan standar. [Kondisikan kolom ekstraksi fasa-padat (*solid phase extraction*) dengan tekanan tidak lebih dari 5 mm air raksa: bilas kolom dengan metanol kemudian dengan dapar pH 10. Jangan biarkan puncak kolom kering] Pindahkan 10 ml larutan stok standar ke dalam labu-100 ml. Tambah 75 ml air, atur pH 10,4 ±0,1 dengan natrium hidroksida 0,1 M. Encerkan dengan air sampai batas volume 100 mldan aduk. Saring, buang 15 ml hasil saringan pertama. Pindahkan 25 ml hasil saringan ke dalam labu-50 ml, tambah 15 m air atur pH 10,0 dengan natrium hidroksida 0,1 M. Encerkan dengan dapar pH 10 sampai volume 50 ml dan aduk. Elusikan sebagian larutan melalui kolom ekstraksi fasa-padat 3 ml berisi oktadesilsilil yang dihubungkan melalui satu adaptor ke kolom ekstraksi fasa-padat kedua berisi penukar ion sulfonil propil. Buang 3 ml eluat pertama, dan kumpulkan sisa eluat vial untuk injeksi ke kromatografi.

Larutan uji. Pindahkan sediaan setara dengan 1 mg fluorida ke labu pisah-100 ml, tambah 15 ml air dan aduk. Bilas sisi botol dengan 15 ml air dan biarkan selama 10 menit. Encerkan dengan air sekitar 85 ml, atur pH 10,4 ±0,1 dengan natrium hidroksida 1 M, encerkan dengan air sampai batas volume 100 ml dan aduk. Lakukan seperti dalam larutan standar, dimulai dengan ".....saring buang 15 ml hasil saringan pertama."

Kolom pelindung. Resin penukar ion dari stiren divinil benzen sulfonat, ukuran 3 cm x 4,6 mm atau yang sesuai.

Kolom analitik. Resin penukar ion dari stiren divinil benzen sulfonat, ukuran 30 cm x 7,8 mm.

Laju alir. 0,5 ml/menit.

Detektor. Kondukktivitas.

Injek larutan standar, simpangan baku relatif tidak lebih dari 2%.

Injek 100 µl larutan standar dan larutan uji ke dalam kromatograf dan ukur area puncak. Hitung kadar (mg) dengan rumus:

$$0{,}2\ C\left(\frac{A_S}{A_{Std}}\right)$$

Keterangan:

C = konsentrasi fluorin dalam larutan standar (µg/ml)

A_S = area puncak larutan uji.

A_{Std} = area puncak larutan standar.

Fosfor

Lakukan dengan metode spektrofotometri, menggunakan:

Larutan asam sulfat. Tambahkan 37,5 ml asam sulfat ke dalam 100 ml air dan aduk.

Larutan standar amonium molibdat. Larutkan standar 12,5 g amonium molibdat dalam 150 ml air. Tambah 100 ml larutan asam sulfat dan aduk.

Larutan hidrokuinon. Larutkan 0,5 g hidroquinon dalam 100 ml air dan tambahkan satu tetes asam sulfat.

Larutan natrium bisulfit. Larutkan 20 g natrium bisulfit dalam 100 ml air.

Larutan stok standar fosfor. Larutkan 4,395 g kalium fosfat monobasa (sebelumnya ikeringkan pada suhu 105°C selama 2 jam dan simpan dalam desikator) dalam air, tambah 6 ml asam sulfat sebagai pengawet, encerkan dengan air sampai konsentrasi 1000 µg/ml.

Larutan standar. Encerkan stok standar dalam air sampai konsentrasi konsentrasi 20 µg/ml.

Larutan uji. Pada sediaan setara 100 mg fosfor, tambah 25 ml asam nitrat, panaskan diatas plat panas selama 30 menit. Tambah 15 ml asam hidroklorida, dan lanjutkan pemanasan sampai larutan jernih. Dinginkan dan pindahkan isi ke dalam labu- 500 ml dengan bantuan air. Encerkan dengan air sampai batas volume 500 ml dan aduk. Encerkan 10 ml larutan dengan air sampai batas volume 100-ml dan aduk.

Hitung kadar (µg) dari fosfor pada tablet menggunakan rumus:

$$5\ C\left(\frac{A_S}{A_{Std}}\right)$$

Keterangan:

C = konsentrasi molibdenum dalam larutan standar (µg/ml)

A_S = area puncak larutan uji.

A_{Std} = area puncak larutan standar.

Iodium

Lakukan penetapan kadar dengan metode titrasi, menggunakan:

Air brom. Pada 20 ml brom dalam botol, tambah 100 ml air. Sumbat botol dan kocok. Biarkan selama 30 menit, dan gunakan supernatan.

Prosedur. Pindahkan sediaan setara 3 mg iodid, ke dalam krusibel nikel. Tambah 5 g natrium karbonat, 5 ml larutan natrium hidroksida (50% b/v) dan 10 ml alkohol, Panaskan krusibel di atas penangas air untuk menguapkan alkohol, kemudian kering kan crucible pada suhu 100°C selama 30 menit. Pindahkan krusibel dengan isinya ke dalam tungku perapian dan panaskan dengan suhu 500°C selama 15 menit. [Pemanasan di atas suhu 500°C mungkin diperlukan untuk memastikan perubahan menjadi karbondioksida sempurna dari semua bahan organik]. Dinginkan krusibel, tambahkan 25 ml air, tutup krusibel dengan gelas arlojidan didihkan dengan pelahan-lahan selama 10 menit. Saring dan bilas krusibel dengan air mendidih, kumpulkan hasil-saringan dan air bilasan dalam gelas piala. Tambahkan asam fosfat sampai larutan netral terhadap metil jingga, kemudian tambahkan 1 ml asam fosfat. Tambahkan air brom berlebih dan didihkan larutan sampai tidak berwarna. Tambahkan beberapa kristal asam salisilat, dan dinginkan larutan sampai

suhu 20°C. Tambah 1 ml asam fosfat dan 0,5 g kalium iodida, Titrasi iodium bebas menggunakan natrium tiosulfat 0,005 M, dan larutan kanji sebagai indikator sampai tidak berwarna. Hitung kadar (µg), iodid pada tablet menggunakan rumus:

$$\frac{105.8VN}{0{,}005}$$

Keterangan:

V = volume (ml), dari natrium tiosulfat;

M = molaritas natrium tiosulfat.

Kalium

Lakukan dengan metode spektrofotometer serapan atom, menggunakan:

Larutan stok standar kalium. Larutkan dan encerkan 190,7 mg kalium klorida (sebelumnya dikeringkan pada suhu 105°C selama 2 jam) dengan air sampai konsentrasi 100 µg/ml.

Larutan standar. Encerkan larutan stok standar kalium dengan asam hidroklorida 0,125 M sampai konsentrasi 10 µg/ml. Pindahkan masing-masing 5,0; 10,0; 15,0; 20,0 dan 25,0 ml larutan standar pada labu-100 ml yang terpisah. Encerkan dengan asam hidroklorida 0,125 M sampai konsentrasi 0,5; 1,0; 1,5; 2,0 dan 2,5 µg/ml.

Larutan uji. Lakukan seperti dalam pengujian kalsium, kecuali untuk persiapan larutan uji mengandung 1 µg/ml dan hilangkan penggunaan larutan lantanum klorida.

Hitung kadar (mg/ml) dengan rumus:

$$0{,}001\,CD$$

Keterangan:

D = faktor pelarut yang digunakan untuk menyiapkan larutan uji.

Kalsium

Lakukan dengan metode spektrofotometer serapan atom, menggunakan:

Larutan lantanum klorida. Larutkan 26,7 g lantanum klorida heptahidrat dalam asam hidroklorida 0,125 M sampai volume 100 ml.

Larutan stok standar kalsium. Pada 1,001 g kalsium karbonat (sebelumnya dikeringkan pada suhu 300°C selama 3 jam dan dinginkan dalam desikator selama 2 jam), larutkan dalam 25 m asam hidroklorida 1 M. Didihkan untuk menghilangkan karbon dioksida, encerkan dalam air sampai konsentrasi kalsium 400 µg/ml.

Larutan standar. Encerkan larutan stok standar kalsium dengan asam hidroklorida 0,125 M sampai konsentrasi kalsium 100 µg/ml. Pindahkan masing-masing 1,0; 1,5; 2,0; 2,5 dan 3,0 ml larutan standar. Tambah 1 ml larutan lantanum klorida, encerkan dengan air sampai konsentrasi kalsium 1,0; 1,5; 2,0; 2,5 dan 3,0 µg/ml.

Larutan uji. Pindahkan sediaan setara dengan 5 tablet ke dalam krusibel porselin. Panaskan pada 550°C selama 6—12 jam dan dinginkan. Tambah 60 ml asam hidroklorida dan didihkan di atas penangas air selama 30 menit sambil di bilas permukaan bagian dalam krusibel dengan asam hidroklorida 6 M. Dinginkan, dan pindahkan ke dalam labu 100 ml. Bilas krisibel dengan sedikit asam hidroklorida 6 M dan masukkan hasil bilasan ke dalam labu. Encerkan dengan air sampai batas volume 100 ml, aduk, dan saring, buang 5 ml hasil saringan pertama. Encerkan larutan dengan asam hidroklorida 0,125 M sampai konsentrasi 2 µg/ml, tambah 1 ml larutan lantanum klorida setiap 100 ml voluma akhir.

Hitung kadar (mg/ml) dengan rumus:

$$0{,}001\,CD$$

Keterangan:

D = faktor pelarut yang digunakan untuk menyiapkan larutan uji.

Kromium

Lakukan dengan metode spektrofotometer serapan atom, menggunakan:

Larutan stok standar kromium. Larutkan dan encerkan 2,829 g kalium dikromat (sebelumnya dikeringkan pada suhu 120°C selama 4 jam), larutkan dan encerkan dengan air sampai konsentrasi kromium 1000 µg/ml. Simpan dalam botol politilen.

Larutan standar. Pada 10 ml larutan stok standar kromium, tambah 50 ml asam hidroklorida 6 M, encerkan dengan air sampai konsentrasi 10 µg/ml. Pindahkan 10 ml dan 20 ml larutan standar ke dalam labu 100 ml terpisah, dan pindahkan 15 ml dan 20 ml larutan standar ke dalam labu 50 ml terpisah. Encerkan empat labu terbut dengan asam hidroklorida 0,125 M sampai konsentrasi 1,0; 2,0; 3,0 dan 4,0 µg/ml.

Larutan uji. Lakukan seperti dalam pengujian kalsium, kecuali untuk persiapan larutan uji mengandung 1 µg/ml dan hilangkan penggunaan larutan lantanum klorida.

Hitung kadar (mg/ml) dengan rumus:

$$CD$$

Keterangan:

D = faktor pelarut yang digunakan untuk menyiapkan larutan uji.

Magnesium

Lakukan dengan metode spektrofotometer serapan atom, menggunakan:

Larutan lantanum klorida. Siapkan seperti dalam pengujian kalsium.

Larutan stok standar magnesium. Larutkan 1 g magnesium dalam 50 ml asam hidroklorida 6 M, encerkan dengan air sampai konsentrasi 1000 µg/ml.

Larutan standar. Encerkan stok standar magnesium dengan asam hidroklorida 0,125 M sampai konsentrasi 20 µg/ml. Pindahkan 1,0; 1,5; 2,0; 2,5 dan 3,0 ml larutan standar kedalam labu -100 ml yang terpisah. Tambah

1 ml larutan lantanum klorida dan encerkan dengan asam hidroklorida 0,125 M sampai konsentrasi 0,2; 0,3; 0,4; 0,5 dan 0,6 µg/ml.

Larutan uji. Lakukan seperti dalam pengujian kalsium, kecuali untuk persiapan larutan uji mengandung 0,4 µg/ml.

Hitung kadar (mg/ml) dengan rumus:

$$0{,}001\,CD$$

Keterangan:

D = faktor pelarut yang digunakan untuk menyiapkan larutan uji.

Mangan

Lakukan dengan metode spektrofotometer serapan atom, menggunakan:

Larutan stok standar mangan. Larutkan 1 g mangan dalam 20 ml asam nitrat, encerkan dengan asam hidroklorida 6 M sampai konsentrasi 1000 µg/ml.

Larutan standar. Encerkan 10 ml larutan stok standar mangan dengan asam hidroklorida 0,125 M sampai konsentrasi 50 µg/ml. Pindahkan 1,0; 1,5; 2,0; 3,0 dan 4,0 ml larutan standar ke dalam labu terpisah dan encerkankan dengan asam hidroklorida 0,125 M sampai konsentrasi 0,5; 0,75; 1,0; 1,5 dan 2,0 µg/ml.

Larutan uji. Lakukan seperti dalam pengujian kalsium, kecuali untuk persiapan larutan uji mengandung 1 µg/ml dan hilangkan penggunaan larutan lantanum klorida.

Hitung kadar (mg/ml) dengan rumus:

$$0{,}001\,CD$$

Keterangan:

D = faktor pelarut yang digunakan untuk menyiapkan larutan uji.

Molibdenum

Lakukan penetapan kadar dengan salah satu metode berikut:

1. Lakukan dengan metode spektrofotometer serapan atom menggunakan:

   Larutan pengencer. Larutkan 40 g dari amonium klorida dalam 2000 ml air.

   Larutan stok standar molibdenum: Larutkan 1 g molibdenum dalam 50 ml asam nitrat. Encerkan dengan air sampai konsentrasi 1000 µg/ml.

   Larutan standar. Encerkan 10 ml larutan stok standar molibdenum dengan air sampai konsentrasi 100 µg/ml. Pindahkan 2,0; 10,0 dan 25,0 ml larutan kedalam labu terpisah, tambah 5 ml asam perklorat. Didihkan selama 15 menit, dinginkan pada suhu ruang, encerkan dengan larutan pengencer sampai konsentrasi 5,0; 10,0 dan 25,0 µg/ml.

   Larutan uji. Larutkan sediaan setara 1000 µg molibdenum dalam 12 ml asam nitrat. Secara hati-hati aduk botol dan sonikasi selama 10 menit atau sampai larut. Didihkan larutan selama 15 menit dan dinginkan pada suhu ruang. Secara hati-hati tambahkan 8 ml asam perklorat, panaskan sampai asam perklorat tampak menguap, aduk botol untuk mengusir uap. Ulangi pemanasan dan aduk. Dinginkan pada suhu ruang. Pindahkan isi botol ke dalam labu -100 ml dengan bantuan larutan pengencer, encerkan dengan larutan pengencer sampai batas volume 100,0 ml dan aduk.

   Hitung kadar (mg/ml) dengan rumus:

   $$0{,}001\,CD$$

   Keterangan:

   D = faktor pelarut yang digunakan untuk menyiapkan larutan uji.

2. Lakukan dengan metode spektrofotometer, menggunakan:

   Larutan natrium fluorida. Larutkan 10 g natrium fluorida dalam 200 ml air, aduk dan saring. Simpan dalam tabung polietilen.

   Larutan besi sulfat. Larutkan dan encerkan 498 mg besi sulfat dalam air sampai batas volume 100 ml.

   Larutan kalium tiosianat. Larutkan dan encerkan 20 g kalium tiosianat dalam airsampai bats volume 100 ml.

   Larutan timah (II) klorida 20%. Pada 40 g timah (II) klorida tambahkan 20 ml asam hidroklorida 6,5 M. Panaskan sampai larut. Dinginkan dan encerkan dengan air sampai batas volume 100 ml dan aduk.

   Larutan timah (II) klorida encer. Encerkan 4 ml larutan timah (II) klorida 20% dengan air sampai batas volume 100 ml. Larutan harus segar.

   Larutan standar. Larutkan dan encerkan 92 mg amonium molibdat dengan air sampai batas volume 500 ml, aduk. Encerkan 20 ml dengan air sampai konsentrasi 20 µg/ml.

   Prosedur. Pindahkan sediaan setara 40 µg molibdenum, ke dalam gelas piala -200 ml (I). Pindahkan 2 ml larutan standar kedalam gelas piala- 200 ml (II). Tambah20 ml asam nitrat. Tutup dengan gelas arloji, dan didihkan secara pelan-pelan di atas plat panas selama 45 menit. Dinginkan pada suhu ruang, tambahkan 6 ml asam perklorat, tutup dengan gelas arloji dan lanjutkan pemanasan sampai larut sempurna yang ditunjukkan saat cairan tidak berwarna atau kekuningan. Jika diperlukan, tambahkan asam nitrat dan asam perklorat ke dalam gelas (I). Uapkan sampai kering. Bilas sisi gelas dan gelas arloji dengan air, dan tambahkan lebih banyak air sampai volume 50 ml. Didihkan selama beberapa menit dan dinginkan pada suhu ruang. Tambah 2 tetes metil jingga ke dalam gelas piala, dan netralkan dengan amonium hidroksida. Tambah 8,2 ml asam hidroklorida. Pindahkan isi gelas piala pada labu-100 ml yang terpisah. Bilas gelas dengan air, pindahkan hasil bilasan ke dalam masing-masing labu, encerkan dengan air sampai batas volume 100 ml dan aduk.

Pindahkan 50 ml setiap larutan dari gelas piala (I) dan (II) ke dalam labu pisah. Tambah 1 ml larutan natrium fluorida, 0,5 ml larutan besi sulfat, 4,0 ml larutan kalium tiosianat, 1,5 ml larutan timah (II) klorida 20% dan 15 ml amil alkohol dan aduk selama 1 menit. Biarkan sampai lapisan terpisah dan buang lapisan yang mengandung air. Tambahkan 25 ml timah (II) klorida encer ke dalam dan aduk selama 15 detik. Biarkan lapisan terpisah dan buang lapisan yang mengandung air.

Pindahkan fase organik ke dalam tabung sentrifus yang terpisah dan sentrifus 2000 rpm selama 10 menit.

Ukur serapan pada panjang gelombang 465 nm, gunakan amil alkohol sebagai blanko.

Hitung kadar (µg) dari molibdenum (Mo) pada tablet menggunakan rumus:

$$2\,C\left(\frac{A_S}{A_{Std}}\right)$$

Keterangan:

C = konsentrasi molibdenum dalam larutan standar (µg/ml)

A_S = area puncak larutan uji.

A_{Std} = area puncak larutan standar.

Selenium

Lakukan penetapan kadar dengan salah satu metode berikut:

1. Lakukan dengan metode spektrofotometer serapan atom menggunakan:

   Larutan pengencer. Siapkan seperti dalam pengujian molibdenum, metode 1.

   Larutan stok standar selenium. [Perhatian: selenium adalah beracun; tangani dengan hati-hati.] Larutkan 1 g selenium dalam volume minimum asam nitrat. Uapkan hingga kering, tambah 2 m air dan uapkan hingga kering. Ulangi proses 3 kali. Larutkan residu dalam asam hidroklorida 3 M, pindahkan ke dalam labu 1000 ml, encerkan dengan asam hidroklorida 3 M sampai konsentrasi 1000 µg/ml.

   Larutan standar. Encerkan 10 ml larutan stok standar selenium dengan air konsentrasi 100 µg/ml. Pindahkan 5,0; 10,0 dan 25,0 ml larutan standar pada labu-100 ml yang terpisah dan tambah 5 ml asam perklorat. Didihkan larutan selama 15 menit, dinginkan pada suhu ruang, encerkan dengan air sampai konsentrasi 5,0; 10,0 dan 25,0 µg/ml.

   Larutan uji. Pada sediaan, setara dengan 1000 µg selenium, tambah 12 ml asam nitrat. Secara hati-hati aduk botol dan sonikasi selama 10 menit atau sampai larut. Didihkan larutan selama 15 menit dan dinginkan pada suhu ruang. Secara hati-hati tambahkan 8 ml asam perklorat, panaskan botol sampai terlihat asap dan aduk. Ulangi pemanasan dan aduk sampai larutan jernih. Dinginkan pada suhu ruang. Pindahkan ke dalam labu- 50 ml dengan bantuan larutan pengencer dan encerkan dengan larutan pengencer sampai volue 50 ml dan aduk.

   Hitung kadar (mg/ml) dengan rumus:

   $$0{,}001\,CD$$

   Keterangan:

   D = faktor pelarut yang digunakan untuk menyiapkan larutan uji.

2. Lakukan dengan metode spektrofotometer, menggunakan:

   Asam hidroklorida. Encerkan 50 ml asam hidroklorida dengan air sampai batas volume 500 ml dan aduk.

   Larutan amonium hidroksida 50%. Encerkan 250 ml amonium hidroksida dengan air sampai batas volume 500 ml dan aduk.

   Pereaksi-1. Larutkan 4,5 g dinatrium edetat dalam 400 ml air, tambah 12,5 g hidroksilamin hidroklorida, encerkan dengan air sampai bats volume 500 ml dan aduk.

   Pereaksi-2. Pada 200 mg 2,3-diaminonaftalen tambah 200 ml asam hidroklorida 0,1 M. Ekstraksi 3 kali, masing-masing 40 ml sikloheksan dan buang lapisan sikloheksan. Saring larutan ke dalam botol coklat dan tutup larutan dengan lapisan 1-cm sikloheksan. Larutan ini stabil selama 1 minggu jika disimpan dalam lemari pendingin.

   Larutan stok standar. [Perhatian-selenium adalah beracun; tangani dengan hati-hati]. Larutkan 1 g selenium dalam volume minimum asam nitrat. Uapkan hingga kering, tambahkan 2 ml air, dan uapkan hingga kering. Ulangi prose ini tiga kali. Larutkan residu dalam asam hidroklorida 3 M, pindahkan ke dalam labu-1000 ml, encerkan dengan asam hidroklorida 3 M sampai konsentrasi 1000 µg/ml. Encerkan larutan dengan asam hidroklorida 0,125 M sampai konsentrasi 2,0 µg/ml.

   Larutan uji. Pada sediaan setara 20 µg selenium, tambah 10 ml asam nitrat, dan hangatkan di atas plat panas. Lanjutkan pemanasan sampai reaksi awal asam nitrat telah surut, kemudian tambahkan 3 ml asam perklorat. [Perhatian-hati-hati pada tahap karena reaksi asam perklorat bias kuat]. Lanjutkan pemanasan di atas plat panas sampai muncul uap. Tambah 0,5 ml asam nitrat dan panaskan kembali, tambah kembali sejumlah asam nitrat, larutan menjadi gelap. Panaskan selama 10 menit setelah muncul uap atau sampai larutan tidak berwarna. Dinginkan botol tambah 2,5 ml larutan asam hidroklorida dan panaskan diatas plat panas untuk mengeluarkan sisa asam nitrat. Panaskan campuran selama 3 menit setelah mulai mendidih. Dinginkan pada suhu ruang, dan encerkan dengan air sampai volume 20 ml.

   Prosedur. Pada 10 ml larutan stok standar, tambah 1 ml asam perklorat dan 1 ml asam hidroklorida dan encerkan dengan air sampai volume 20 ml (larutan standar). Siapkan blanko dengan 1 ml

asam perklorat dan 1 ml larutan asam hidroklorida dan encerkan dengan air sampai volume 20 ml. Perlakukan larutan uji, larutan standar dan blanko sebagai berikut: Tambahkan 5 ml pereaksi-1, dan aduk, atur pH 1,1 ± 0,1 dengan amonium hidroksida 50%. Tambah 5 ml pereaksi-2 dan aduk dengan. Tempatkan larutan diatas penangas air pada suhu 50°C, dan ekuilibrasi selama 30 menit (lindungi dari cahaya). Dinginkan pada suhu ruang, dan pindahkan kedalam labu pan pada panjang gelombang pisah. Tambah 10 ml sikloheksan ke dalam setiap labu dan ekstrak selama 1 menit. Buang lapisan yang mengandung air. Sentrifus fase sikloheksan pada 1000 rpm selama 1 menit untuk sisa air.

Ukur serapan pada panjang gelombang 380 nm. Hitung kadar (µg) dari selenium (Se) pada sediaan menggunakan rumus:

$$CD\left(\frac{A_S}{A_{Std}}\right)$$

Keterangan:

C = konsentrasi selenium dalam larutan stok standar (µg/ml)

D = faktor pelarut yang digunakan untuk menyiapkan larutan uji

A_S = area puncak larutan uji.

A_{Std} = area puncak larutan standar.

Seng

Lakukan dengan metode spektrofotometer serapan atom, menggunakan:

Larutan stok standar seng. Pada 311 mg standar seng oksida tambah 80 ml asam hidroklorida 5 M, hangatkan jika diperlukan sampai larut. Dinginkan dan encerkan dengan air sampai konsentrasi 1000 µg/ml.

Larutan standar. Encerkan larutan stok standar seng dengan asam hidroklorida 0,125 M sampai konsentrasi 50 µg/ml. Pindahkan 1,0; 2,0; 3,0; 4,0 dan 5,0 ml ke dalam labu – 100 ml terpisah. Encerkan dengan asam hidroklorida 0,125 M sampai konsentrasi 0,5; 1,0; 1,5; 2,0 dan 2,5 µg/ml.

Larutan uji. Lakukan seperti dalam pengujian kalsium, kecuali untuk persiapan larutan uji mengandung 2 µg/ml dan hilangkan penggunaan larutan lantanum klorida.

Hitung kadar (mg/ml) dengan rumus:

$$0{,}001\,CD$$

Keterangan:

D = faktor pelarut yang digunakan untuk menyiapkan larutan uji.

Tembaga

Lakukan penetapan kadar menggunakan metode spektrofotometer serapan atom, menggunakan:

Larutan stok standar tembaga. Larutkan 1 g kertas perak dalam volume kecil asam nitrat (50% v/v), dan encerkan dengan larutan asam nitrat (1% v/v) sampai batas volume 1000 ml (1000 µg/ml).

Larutan standar. pada 10 ml larutan stok standar tembaga encerkan dengan asam hidroklorida 0,125 M sampai konsentrasi 100 µg/ml . Pada labu – 200 ml terpisah, pindahkan 1,0; 2,0; 4,0; 6,0 dan 8,0 ml larutan standar, encerkan dengan air sampai konsentrasi 0,5; 1,0; 2,0; 3,0 dan 4,0 µg/ml.

Larutan uji. Lakukan seperti dalam pengujian kalsium, kecuali untuk persiapan larutan uji mengandung 2 µg/ml dan hilangkan penggunaan larutan lantanum klorida.

Hitung kadar (mg/ml) dengan rumus:

$$0{,}001\,CD$$

Keterangan:

D = faktor pelarut yang digunakan untuk menyiapkan larutan uji.

Penyimpanan

Disimpan dalam wadah tertutup rapat dan terlindung dari cahaya.

Penandaan

Harus tertera: 1) Komposisi. 2) Jenis sediaan. 3) Indikasi. 4) Waktu kadaluwarsa. 5) Kondisi penyimpanan.

Vitamin Larut Air Kapsul

Definisi

Vitamin larut air dalam sediaan kapsul adalah mengandung dua atau lebih vitamin larut air yaitu: Asam askorbat atau setara natrium askorbat atau kalsium askorbat, biotin, sianokobalamin, asam folat, niasin atau niasinamida, dekspantenol atau pantenol, asam pantotenat (sebagai kalsium pantotenat atau rasemik kalsium pantotenat), piridoksin hidroklorida, riboflavin, dan tiamin hidroklorida atau tiamin mononitrat dan dapat mengandung zat lain yang tertera pada label dengan jumlah yang akurat.

Kapsul memenuhi persyaratan yang dinyatakan untuk sediaan kapsul dan persyaratan berikut:

Mengandung tidak kurang 80,0% dari jumlah yang tertera dalam etiket untuk asam askorbat ($C_6H_8O_6$), biotin ($C_{10}H_{16}N_2O_3S$), sianokobalamin ($C_{63}H_{88}CoN_{14}O_{14}P$), asam folat ($C_{19}H_{19}N_7O_6$), dekspantenol ($C_9H_{19}NO_4$) atau pantenol ($C_9H_{19}NO_4$), kalsium pantotenat ($C_{18}H_{32}CaN_2O_{10}$), niasin ($C_6H_5NO_2$) atau niasinamida ($C_6H_6N_2O$), piridoksin hidroklorida ($C_8H_{11}NO_3{\cdot}HCl$), riboflavin ($C_{17}H_{20}N_4O_6$), dan tiamin ($C_{12}H_{17}ClN_4OS$) sebagai tiamin hidroklorida atau tiamin mononitrat.

Identifikasi

Lakukan cara seperti yang tertera pada penetapan kadar.

Waktu hancur dan disolusi. Memenuhi persyaratan untuk waktu hancur.

Keseragaman berat. Memenuhi persyaratan.

Catatan. Dalam pengujian berikut, dimana lebih dari satu metode pengujian digunakan untuk zat aktif tunggal, persyaratan dipenuhi dengan salah satu metode yang telah ditentukan.

Penetapan kadar

Asam askorbat, kalsium askorbat dan natrium askorbat

Lakukan penetapan kadar seperti yang tertera pada metode 1 (vitamin larut lemak, air dan mineral tablet).

Asam folat

Penetapan kadar dilakukan dengan salah satu metode berikut:

1. Lakukan penetapan kadar seperti yang tertera pada penetapan kadar asam folat, metode 1 (vitamin larut lemak, air dan mineral tablet), menggunakan larutan uji: lakukan seperti dalam penetapan kadar biotin. Metode 1, dimulai dengan pada sediaan setara 0,4 mg asam folat, tambah 25 ml larutan standar, sumbat, aduk selama 10 menit, dan sentrifus. Saring supernatan dan gunakan hasil saringannya.
2. Lakukan penetapan kadar seperti yang tertera pada penetapan kadar asam folat metode 2 (vitamin larut lemak, air dan mineral tablet), menggunakan larutan uji: lakukan seperti dalam penetapan kadar biotin, Metode 2 dimulai dengan pada sediaan setara 0,3 mg asam folat, tambah 10 ml campuran metanol dan asam asetat glasial (9:1), 30 ml campuran metanol dan etilen glikol (1:1). Sumbat dan kocok selama 15 menit di dalam penangas air pada suhu 60°C, dan dinginkan. Saring dan buang beberapa ml hasil saringan pertama.

Biotin

Penetapan kadar dilakukan dengan salah satu metode berikut:

1. Lakukan penetapan kadar seperti yang tertera pada penetapan kadar biotin, metode 1 (vitamin larut lemak, air dan mineral tablet), menggunakan larutan uji: lakukan seperti dalam penetapan kadar biotin, metode 2 dimulai pada sediaan setara dengan 1 mg biotin, tambah 3 ml dimetilsulfoksida dan aduk. Panaskan dalam penangas air pada suhu 60°—70°C selama 5 menit. Kemudian sonikasi selama 5 menit, larutkan dengan air sampai batas volume 200 ml, aduk dan saring.
2. Lakukan penetapan kadar seperti yang tertera pada penetapan kadar biotin, metode 2 (vitamin larut lemak, air dan mineral tablet), menggunakan larutan uji: pada *s*ediaan setara 100 µg dari biotin, tambah 3 ml alkohol 50%, dan aduk sampai homogen. Panaskan dalam penangas air pada suhu 60°—70°C selama 5 menit. Sonikasi selama 5 menit, encerkan dalam alkohol 50% sampai batas volume 200 ml, aduk dan saring. Encerkan dengan air sampai konsentrasi 0,1 mg/ml.

Dekspantenol atau pantenol

Lakukan dengan metode mikrobiologi, menggunakan: *(Catatan. Ikuti prosedur yang dapat diterapkan dalam menentukan komponen dekstrorotatori rasemik pantenol dalam sediaan pantenol).*

Larutan stok standar. Larutkan dan encerkan standar dekspantenol dengan air sampai konsentrasi 800 µg/ml. Simpan di dalam lemari pendingin, terlindung dari cahaya dan gunakan tidak lebih dari 30 hari.

Larutan standar. Pada saat penetapan kadar, encerkan larutan stok standar dengan air sampai konsentrasi 1,2 µg/ml.

Larutan uji. Larutkan sediaan setara 1,2 mg dekspantenol atau 2,4 mg pantenol dalam 100 ml air. Larutkan dengan air sampai konsentrasi 1,2 µg/ml dekspantenol atau 2,4 µg/ml pantenol.

Larutan asam kasein hidrolisat. Aduk 100 g vitamin bebas kasein dengan 500 ml asam hidroklorida 6 M, dan lakukan refluks selama 8-12 jam. Hilangkan asam hidroklorida dari larutan campuran dengan cara penyulingan, sampai terbentuk pasta. Larutkan kembali pasta dengan 500 ml air, atur pH 3,5 ± 0,1 dengan natrium hidroksida 1 M, dan encerkan dengan air sampai batas volume 1000 ml. Tambahkan 20 g arang aktif, aduk selama 1 jam, dan saring. Ulangi perlakuan dengan arang aktif. Simpan dalam toluen di lemari pendingin pada suhu tidak kurang dari 10°C. Jika terbentuk endapan selama penyimpanan, saring larutan.

Larutan sistin-triptofan. Suspensikan 4 g L-sistin dan 1 g L-triptofan (atau 2 g D,L-triptofan) dalam 700 ml air, panaskan sampai suhu 75°C, dan teteskan asam hidroklorida sampai larut. Dinginkan dan encerkan dengan air sampai batas volume 1000 ml. Simpan botol dalam toluen pada suhu tidak kurang dari 10°C.

Larutan urasil-adenin-guanin. Larutkan 200 mg adenin sulfat, guanin hidroklorida, dan urasil dengan pemanasan, dalam 10 ml asam hidroklorida 4 M, dinginkan, tambahkan air sampai batas volume 200 ml, dan aduk. Simpan botol dalam toluen pada suhu tidak kurang dari 10°C.

Larutan polisorbat 80. Larutkan 25 g polisorbat 80 dalam alkohol sampai 250 ml, dan aduk.

Larutan riboflavin-tiamin hidroklorida-biotin. Larutan riboflavin, tiamin hidroklorida, dan biotin dalam asam asetat 0,02 N yang mengandung 20 µg riboflavin, 10 µg tiamin hidroklorida, dan 0,04 µg biotin µg/ml. Simpan botol dalam toluen pada suhu tidak kurang dari 10°C, terlindung dari cahaya.

Larutan asam p-aminobenzoat-niasin-piridoksin hidroklorida. Larutan p-aminobenzoat, niasin dan piridoksin hidroklorida dalam alkohol murni 25% yang mengandung 10 µg asam p-aminobenzoat, 50 µg niasin, dan 40 µg piridoksin hidroklorida µg/ml. Simpan botol dalam toluen pada suhu tidak kurang dari 10°C.

Larutan garam 1. Larutkan 25 g kalium fosfat monobasik dan 25 g kalium fosfat dibasik dalam air sampai batas volume 500 ml. Tambahkan 5 tetes asam hidroklorida, dan aduk. Simpan botol dalam toluen

pada suhu tidak kurang dari 10°C.

Larutan garam 2. Larutkan 10 g magnesium sulfat, 0,5 g natrium klorida, 0,5 g besi sulfat, dan 0,5 g mangan sulfat dalam air sampai batas volume 500 ml. Tambahkan 5 tetes asam hidroklorida, aduk. Simpan botol dalam toluen pada suhu tidak kurang dari 10°C.

Larutan piridoksal-kalsium pantotenat. Larutkan 40 mg piridoksal hidroklorida dan 375 µg kalsium pantotenat dalam alkohol 10% sampai batas volume 200 ml, aduk. Simpan botol dalam toluen pada suhu tidak kurang dari 10°C, dan gunakan tidak lebih dari 30 hari.

Larutan polisorbat 40-asam oleat. Larutkan 25 g polisorbat 40 dan 0,25 g asam oleat ke dalam alkohol 20% sampai batas volume 500 ml, dan aduk. Simpan botol dalam toluen pada suhu tidak kurang dari 10°C.

Stok kultur *pediococcus acidilactici* ATCC No. 8042. Tambah 6,0 g pepton, 4,0 g kasein digest, 3,0 g sari ragi, 1,5 g sari daging, 1,0 g glukosa, dan 15,0 g agar dalam 800 ml air dengan pemanasan. Atur pH 6,5—6,6 dengan natrium hidroksida 0,1 N atau asam hidroklorida 0,1 N, encerkan dengan air sampai batas volume 1000 ml, aduk. Pindahkan 10 ml larutan dalam tabung, sumbat tabung, dan sterilisasi dengan otoklaf pada suhu 121°C selama 15 menit. Dinginkan dengan posisi miring, dan simpan dalam lemari pendingin. Siapkan stok kultur *pediococcus acidilactic* di atas medium. Inkubasi pada suhu 35°C selama 20—24 jam, dan simpan di dalam lemari pendingin. Lakukan pemeliharaan stok kultur kedalam kutur segar pada agar miring setiap bulan.

Pembuatan medium pantotenat (modifikasi)

Bahan	Jumlah
Larutan asam kasein hidrolisat	25 ml
Larutan sistin tritofan	25 ml
Larutan polisorbat 80	0,25 ml
Glukosa anhidrat	10 g
Natrium asetat anhidrat	5 g
Larutan adenin-guanin-urasil	5 ml
Larutan riboflavin-tiamin hidroklorida-biotin	5 ml
Asam p-aminobenzoat-niasin-piridoksin hidroklorida	5 ml
Larutan garam 1	5 ml
Larutan garam 2	5 ml
Larutan piridoksal-kalsium pantotenat	5 ml
Larutan polisorbat 40-asam oleat	5 ml
Natrium hidroksida 1 M	pH 6,8
Encerkan dengan air sampai batas 250 ml	

Inokulum. Inokulasikan stok kultur agar miring dalam tiga tabung yang mengandung medium pantotenat (modifikasi) dan inkubasikan pada suhu 35°C selama 20—24 jam. Sentrifus suspensi dari ketiga tabung. Suspensikan kembali dalam medium pantotenat (modifikasi) dan encerkan sampai batas volume 1 dalam 50, setara dengan nilai transmisi cahaya 80% pada panjang gelombang 530 nm. Pindahkan 1,2 ml larutan stok dalam ampul, segel, bekukan dalam nitrogen cair, dan simpan dalam lemari pendingin.

Pada penetapan kadar, biarkan ampul mencapai suhu ruangan, kocok, dan encerkan 1 ml kultur dengan garam fisiologis sampai batas volume 150 ml. *(Catatan: Pengenceran ini mungkin saja berubah untuk memperoleh hasil penetapan kadar yang diinginkan)*

Prosedur. Pada delapan tabung, tambah air masing-masing 5,0; 4,5; 4,0; 3,5; 3,0; 2,0; 1,0 dan 0,0 ml. Pada tabung yang sama, tambah larutan standar masing-masing 0,0 ; 0,5; 1,0; 1,5; 2,0; 3,0; 4,0 dan 5,0 ml. Pada lima tabung lain, tambah air masing-masing 4,0; 3,5; 3,0; 2,0 and 1,0 ml. Pada tabung yang sama, tambah larutan standar masing-masing 1,0; 1,5; 2,0; 3,0; 4,0 ml.

Pada setiap tabung, tambah 5,0 ml medium pantotenat, aduk dan sumbat. Sterilisasi dengan otoklaf pada suhu 121°C selama 5 menit. Dinginkan sampai suhu ruang pada penangas air. Inokulasikan 0,5 ml inokulum ke dalam setiap tabung. Inkubasikan pada suhu 37°C selama 16 jam. Akhiri pertumbuhan dengan pemanasan pada suhu tidak kurang dari 80°C. Dinginkan, dan periksa kadar bakteri menggunakan spektrofotometer yang sesuai dengan panjang gelombang 530 nm.

Penghitungan. Penghitungan kadar ditetapkan dengan interpolasi pada kurva respon dosis pada kertas grafik aritmatika dengan cara menetapkan respon rata-rata, yang menghubungkan transmisi dengan kosentrasi standar.

Kalsium pantotenat

Penetapan kadar dilakukan dengan salah satu metode berikut:

1. Lakukan penetapan kadar seperti yang tertera pada penetapan kadar kalsium pantotenat, metode 1 (vitamin larut lemak, air dan mineral tablet), menggunakan larutan uji: Lakukan seperti dalam penetapan kadar biotin, metode 2 dimulai dengan pada sediaan setara dengan 15 mg kalsium pantotenat, tambah 25 ml larutan standar internal, aduk selama 10 menit, sentrifus, saring, dan gunakan hasil saringan.
2. Lakukan penetapan kadar seperti yang tertera pada penetapan kadar kalsium pantotenat, metode 2 (vitamin larut lemak, air dan mineral tablet), menggunakan:

   Larutan uji. Lakukan seperti dalam penetapan kadar biotin, metode 2 dimulai dengan pada sediaan setara 50 mg kalsium pantotenat, tambah 10 ml asam asetat 0,2 M dan 100 ml natrium asetat (1 dalam 60), encerkan dengan air sampai batas volume 1000 ml, dan saring. Encerkan sampai konsentrasi setara dengan larutan standar.

   Larutan uji. Lakukan seperti dalam penetapan kadar biotin, metode 2 dimulai dengan pada sediaan setara dengan 10 mg kalsium pantotenat, tambah 10 ml metanol, dan kocok. Larutkan dengan air sampai batas volume 250 ml, aduk, dan saring.

Niasin atau niasinamida, piridoksin hidroklorida, riboflavin, dan tiamin

Niasin

Penetapan kadar dilakukan dengan salah satu metode berikut:

1. Lakukan penetapan kadar seperti yang tertera pada penetapan kadar niasin, metode 1 (vitamin larut lemak, air dan mineral tablet), menggunakan larutan uji: Lakukan seperti dalam penetapan kadar biotin, metode 2 dimulai dengan pada sediaan setara dengan 10 mg niasinamid, tambah masing-masing 2,5 mg piridoksin hidroklorida, riboflavin, dan tiamin hidroklorida, tambah 25 ml pelarut dan aduk selama 30 detik. Rendam tabung sentrifus dalam penangas air pada suhu 65°—70°C, panaskan selama 5 menit, aduk selama 30 detik. Ulangi kembali proses di atas. Dinginkan pada suhu ruang, dan gunakan hasil saringan. (Catatan: Gunakan hasil saringan dalam 3 jam setelah penyaringan).
2. Lakukan penetapan kadar seperti yang tertera pada penetapan kadar niasin, metode 2 (vitamin larut lemak, air dan mineral tablet), menggunakan larutan uji: Pada sediaan setara dengan 2 mg riboflavin atau setara dengan 2 mg piridoksin atau setara dengan 20 mg niasin atau niasinamid. Tambah 100 ml larutan pengekstrak, aduk selama 20 menit. Rendam botol dalam penangas air pada suhu 70°—75°C selama 20 menit. Aduk selama 30 detik, dinginkan pada suhu ruang, saring, dan gunakan hasil saringan.
3. Lakukan penetapan kadar seperti yang tertera pada penetapan kadar niasin, metode 3 (vitamin larut lemak, air dan mineral tablet), menggunakan larutan uji: Lakukan seperti penetapan kadar niasin, metode 2. Pada sediaan setara 7,5 mg niasin atau niasinamida, 1,2 mg piridoksin hidrokorida, 0,4 mg riboflavin, dan 1,2 mg tiamin hidroklorida, tambah 10 ml campuran metanol dan asam asetat glasial (9:1), 30,0 ml campuran metanol dan etilen glikol (1:1). Sumbat, kocok selama 15 menit sambil dipanaskan pada suhu 60°C, dinginkan dan saring, kemudian buang beberapa ml hasil saringan.

Niasinamid

Penetapan kadar dilakukan dengan salah satu metode berikut

1. Lihat metode 1 untuk niasin.
2. Lakukan penetapan kadar seperti yang tertera pada penetapan kadar niasinamid, metode 2 (vitamin larut lemak, air dan mineral tablet), menggunakan larutan uji: Lakukan seperti pada penetapan kadar niasin, metode 2.
3. Lihat metode 3 untuk niasin.

Piridoksin hidroklorida

Penetapan kadar dilakukan dengan salah satu metode berikut:

1. Lihat metode 1 untuk niasin.
2. Lakukan penetapan kadar seperti yang tertera pada penetapan kadar niasinamid, metode 2 (vitamin larut lemak, air dan mineral tablet), menggunakan larutan uji: Lakukan seperti pada penetapan kadar niasin, metode 2.
3. Lihat metode 3 untuk niasin.

Riboflavin

Penetapan kadar dilakukan dengan salah satu metode berikut:

1. Lihat metode 1 untuk niasin.
2. Lakukan penetapan kadar seperti yang tertera pada penetapan kadar niasinamid, metode 2 (vitamin larut lemak, air dan mineral tablet), menggunakan larutan uji: Lakukan seperti pada penetapan kadar niasin, metode 2.
3. Lihat metode 3 untuk niasin.

Sianokobalamin

Penetapan kadar dilakukan dengan salah satu metode berikut:

1. Lakukan penetapan kadar seperti yang tertera pada penetapan kadar sianokobalaim, metode 1 (vitamin larut lemak, air dan mineral tablet) menggunakan sediaan setara dengan 100 µg sianokobalamin.
2. Lakukan penetapan kadar seperti yang tertera pada penetapan kadar sianokobalamin, metode 2 (vitamin larut lemak, air dan mineral tablet).

Tiamin

Penetapan kadar dilakukan dengan salah satu metode berikut:

1. Lihat metode 1 untuk niasin.
2. Lakukan penetapan kadar seperti yang tertera pada penetapan kadar tiamin metode 2 (vitamin larut lemak, air dan mineral tablet), menggunakan larutan uji: Lakukan seperti dalam penetapan kadar niasin, metode 2, pada sediaan setara dengan 2 mg tiamin. Tambah 100,0 ml asam hidroklorida 0,2 M, aduk selama 15 menit, panaskan selama 30 menit sampai mendidih. Dinginkan pada suhu ruang, saring dan gunakan hasil saringan yang jernih.
3. Lihat metode 3 untuk niasin.

Penyimpanan

Disimpan dalam wadah, tertutup rapat dan terlindung dari cahaya.

Penandaan

Harus tertera: 1) Komposisi. 2) Jenis sediaan. 3) Indikasi. 4) Waktu kadaluwarsa. 5) Kondisi penyimpanan.

Vitamin Larut Air dan Lemak Larutan Oral

Definisi

Vitamin larut air, minyak dan mineral dalam sediaan larutan oral mengandung dua atau lebih vitamin larut lemak yaitu: vitamin A, vitamin D sebagai ergokalsiferol (vitamin D_2) atau kolekalsiferol (vitamin D_3), vitamin E, fitonadion (vitamin K_1), β-karotin; dan satu atau lebih vitamin yang dapat larut dalam air yaitu: asam askorbat atau setara dengan kalsium askorbat atau natrium askorbat, biotin, sianokobalamin,

asam folat, niasin atau niasinamid, asam pantotenik (sebagai kalsium pantotenat atau rasemik kalsium pantotenat), piridoksin hidroklorida, riboflavin, dan tiamin hidroklorida atau tiamin mononitrat dan dapat mengandung zat lain yang tertera dalam etiket dengan jumlah yang akurat.

Larutan oral memenuhi persyaratan yang dinyatakan untuk sediaan larutan oral dan persyaratan berikut:

Mengandung tidak kurang dari 80,0% dari jumlah yang tertera pada etiket untuk vitamin A ($C_{20}H_{30}O$) sebagai retinol atau ester retinol dalam bentuk retinil asetat ($C_{22}H_{32}O_2$) atau retinil palmitat ($C_{36}H_{60}O_2$), vitamin D sebagai kolekalsiferol ($C_{27}H_{44}O$) atau ergokalsiferol ($C_{28}H_{44}O$), vitamin E sebagai α-tokoferol ($C_{29}H_{50}O_2$) atau α-tokoferil asetat ($C_{31}H_{52}O_3$) atau α-tokoferil suksinat ($C_{33}H_{54}O_5$), fitonadion ($C_{31}H_{46}O_2$), dan β-karotin ($C_{40}H_{56}$); tidak kurang 90% dari jumlah yang tertera dalam etiket untuk asam askorbat ($C_6H_8O_6$) atau garamnya sebagai kalsium askorbat ($C_{12}H_{14}CaO_{12}\cdot 2H_2O$) atau natrium askorbat ($C_6H_7NaO_6$), biotin ($C_{10}H_{16}N_2O_3S$), sianokobalamin ($C_{63}H_{88}CoN_{14}O_{14}P$), asam folat ($C_{19}H_{19}N_7O_6$), niasin ($C_6H_5NO_2$), atau niasinamid ($C_6H_6N_2O$), kalsium pantotenat ($C_{18}H_{32}CaN_2O_{10}$), piridoksin hidroklorida ($C_8H_{11}NO_3\cdot HCl$), riboflavin ($C_{17}H_{20}N_4O_6$), dan tiamin ($C_{12}H_{17}ClN_4OS$) sebagai tiamin hidroklorida atau tiamin mononitrat.

Identifikasi

Lakukan dengan cara seperti yang tertera pada penetapan kadar.

Kandungan alkohol. Ditemukannya sejumlah C_2H_5OH tidak kurang dari 90% dan tidak lebih dari 120% dari jumlah yang tertera pada etiket.

Catatan. Dalam penetapan kadar berikut, dimana lebih dari satu metode penetapan kadar digunakan untuk zat aktif tunggal, persyaratan dipenuhi dengan salah satu metode yang telah ditentukan.

Penetapan kadar

Vitamin A

Lakukan dengan metode kromatografi cair menggunakan:

Pelarut. Campuran tetrahidrofuran dan asetonitril (1:1).

Fase gerak. Campuran metanol, asetonitril dan n–heksan (46,5 : 46,5 : 7,0).

Larutan standar. Larutkan dan encerkan standar vitamin A (retinil asetat) dalam pelarut sampai konsentrasi 0,33 mg/ml.

Larutan kesesuaian sistem. Larutkan sediaan retinil palmitat dalam n-heksan sampai konsentrasi 15 µg/ml. Campur dengan volume yang sama dengan larutan standar (masing-masing mengandung 7,5 µg retinil asetat/ml dan 7,5 µg retinil palmitat/ml).

Larutan uji. Pindahkan sediaan setara dengan 3,3 mg vitamin A dalam labu pisah - 500 ml yang mengandung 10 ml air dan 20 ml alkohol anhidrat. Tambah 150 ml heksan, sumbat dan aduk selama 1 menit. Tambah 150 ml heksan, sumbat dan aduk, diamkan sampai larutan terpisah dan buang lapisan air. Saring lapisan heksan melalui natrium sulfat anhidrat dan masukkan ke dalam labu-500 ml. Uapkan sampai kering menggunakan rotavapor pada suhu 65°C. Tambah segera 10 ml pelarut, aduk sampai residu larut dan saring.

Kolom. Oktadesilsilil, ukuran 4,6 mm x 25 cm atau yang sesuai, suhu 40°C.

Laju alir. 1,5 ml/menit.

Detektor. Spektrofotometer pada panjang gelombang 265 nm.

Kesesuaian sistem. Resolusi antara retinil asetat dan retinil palmitat tidak kurang dari 10; dan simpangan baku relatif tidak lebih dari 5,0%.

Injek 20 µl larutan standar dan larutan uji. Untuk produk mengandung vitamin A asetat atau vitamin A palmitat, Hitung kadar (mg), dari vitamin A sebagai retinol dengan rumus:

$$10\left(\frac{0{,}872\ C}{V}\right)\left(\frac{A_S}{A_{Std}}\right)$$

Keterangan:

0,872 = faktor konversi untuk retinil asetat dari standar vitamin A

C = konsentrasi standar vitamin A (mg/ml)

V = volume sediaan larutan uji dalam ml

A_S = area larutan uji

A_{Std} = area larutan standar.

Vitamin D (kolekalsiferol atau ergokalsiferol)

(Catatan: Gunakan standar vitamin D yang sesuai dengan sediaan).

Lakukan dengan metode kromatografi cair menggunakan:

Pelarut dan fase gerak. Lakukan seperti dalam penetapan kadar vitamin A.

Larutan standar. Larutkan standar kolekalsiferol atau ergokalsiferol dalam n-heksan sampai konsentrasi 5 µg/ml.

Larutan kesesuaian sistem. Panaskan larutan standar pada suhu 60°C selama 1 jam untuk mendapatkan isomer vitamin D (kolekalsiferol atau ergokalsiferol) sebagai prekursor.

Larutan uji. Pindahkan sediaan setara dengan 50 µg kolekalsiferol atau ergokalsiferol ke dalam labu pisah-500 ml yang mengandung 10 ml air dan 20 ml alkohol anhidrat. Tambah 150 ml heksan, sumbat dan aduk selama 1 menit. Tambah 150 ml heksan sumbat dan aduk, diamkan sampai larutan terpisah. Buang lapisan air, dan saring lapisan heksan melalui natrium sulfat anhidrat dan masukkan ke dalam labu 500 ml. Uapkan sampai kering menggunakan rotavapor pada suhu 65°C. Tambah segera 10 ml pelarut, aduk sampai residu larut, dan saring.

Kolom. Oktadesilsilil, ukuran 4,6 mm x 25 cm atau yang sesuai, suhu 40°C.

Laju alir. 1,5 ml/menit.

Detektor. Spektrofotometer pada panjang gelombang 265 nm.

Kesesuaian sistem. Resolusi antara vitamin D yang terbentuk dan prekursor tidak kurang dari 10; dan simpangan baku relatif untuk tidak lebih dari 3%.

Injek 20 µl larutan standar dan larutan uji.

Hitung kadar (µg) dari kolekalsiferol atau ergokalsiferol dengan rumus:

$$1{,}09\left(\frac{10\,C}{V}\right)\left(\frac{A_S}{A_{Std}}\right)$$

Keterangan:

1,09 = faktor konversi untuk previtamin D dari standar vitamin D

C = konsentrasi standar vitamin D (µg/ml)

V = volume sediaan larutan uji (ml)

A_S = area larutan uji

A_{Std} = area larutan standar.

Vitamin E

Lakukan dengan metode kromatografi cair, menggunakan:

Pelarut. Campur asetonitril dan etil asetat (1:1).

Larutan kalium hidroksida. Larutkan dan encerkan 90 g kalium hidroksida dengan air sampai batas volume 100 ml. Aduk sampai larut, dinginkan.

Fase gerak. Campur metanol, asetonitril, dan n-heksan (46,5:46,5:7,0).

Larutan standar. Larutkan standar α-tokoferol dengan pelarut sampai konsentrasi 0,3 mg/ml.

Larutan kesesuaian sistem. Larutkan standar ergokalsiferol dalam metanol sampai konsentrasi 0,65 mg/ml. Pindahkan 1 ml larutan ke dalam labu yang mengandung 100 mg α-tokoferil asetat. Larutkan dengan 30 ml metanol dan aduk. Simpan dalam lemari pendingin.

Larutan uji. Pada sediaan setara dengan 1,5 mg α-tokoferol, tambah 25 ml alkohol anhidrat. Refluks kondensor dalam penangas air pada suhu 60 -700 C selama 1 menit. Tambah dengan hati-hati 3 ml kalium hidroksida melalui kondensor, lanjutkan refluks selama 30 menit. Keluarkan labu dari penangas air, bilas kondensor dengan 15 ml air. Dinginkan dan pindahkan dengan bantuan sedikit air dalam labu pisah 250 ml. Bilas labu dengan 50 ml n-heksan. Aduk dengan kuat selama 1 menit dan biarkan lapisan terpisah. Alirkan lapisan air ke dalam labu kocok kedua, ulangi proses ekstraki dengan 50 ml n-heksan. Buang lapisan air dan campurkan lapisan heksan. Bilas fase heksan dengan 25 ml air, biarkan terpisah dan buang lapisan air. Tambah 3 tetes asam asetat glasial dan ulangi proses pembilasan dua kali atau lebih. Saring fase heksan melalui natrium sulfat anhidrat dan masukan ke dalam labu-250 ml. Bilas corong dan natrium sulfat dengan n-heksan. Uapkan ekstrak heksan dengan rotavapor pada suhu 50°C sampai kering. Tambah 5 ml pelarut dan aduk sampai residu larut.

Kolom. Oktadesilsilil, ukuran 4,6 mm x 25 cm atau yang sesuai, suhu 40°C.

Laju alir. 3 ml/menit.

Detektor. Spektrofotometer pada panjang gelombang 291 nm.

Kesesuian sistem. Waktu tambat relatif 0,5 untuk ergokalsiferol dan 1,0 untuk α-tokoferil asetat; resolusi antara ergokalsiferol dan α-tokoferil asetat tidak kurang dari 12.

Injek 20 µl larutan standar dan larutan uji.

Hitung kadar (µg) dengan rumus:

$$5\left(\frac{C}{V}\right)\left(\frac{A_S}{A_{Std}}\right)$$

Keterangan:

C = konsentrasi standar α-tokoferol (mg/ml)

V = volume sediaan larutan uji (ml)

A_S = area larutan uji

A_{Std} = area larutan standar.

Vitamin K (fitonadion)

Lakukan seperti yang tertera pada penetapan kadar fitonadion (vitamin larut air, lemak dan mineral tablet).

β-Karoten

Lakukan seperti yang tertera pada penetapan kadar β-karoten (vitamin larut air, lemak dan mineral tablet).

Asam askorbat, kalsium askorbat dan natrium askorbat

Lakukan dengan metode titrasi dengan cara:

Pada sediaan setara dengan 80 mg asam askorbat, tambah 50 ml air, 100 ml asam sulfat 0,1 M dan 15,0 ml iodium 0,1 M. Aduk selama 30 detik, tambah 5 ml kanji, dan segera titrasi dengan natrium tiosulfat 0,1 M sampai warna hilang. Setiap ml iodium 0,1 M setara dengan 8,806 mg $C_6H_8O_6$ atau setara dengan 10,66 mg $C_{12}H_{14}CaO_{12}.2H_2O$ atau setara dengan 9,905 mg $C_6H_7NaO_6$.

Biotin

Lakukan penetapan kadar dengan salah satu metode berikut:

1. Lakukan seperti yang tertera pada penetapan kadar biotin, metode 2 (vitamin larut lemak, air dan mineral tablet), menggunakan larutan uji: Larutkan dan encerkan sediaan sampai konsentrasi 0,1 µg/ml.
2. Lakukan seperti yang tertera pada penetapan kadar biotin, metode 3 (vitamin larut lemak, air dan mineral tablet), menggunakan larutan uji : Larutkan dan encerkan sediaan sampai konsentrasi 0,6 µg/ml. Atur pH 6,0—7,0 dengan natrium hidroksida 0,1 M.

Vitamin B_{12} (sianokobalamin)

Lakukan seperti yang tertera pada penetapan kadar sianokobalamin, metode 2 (vitamin larut lemak, air dan mineral tablet), menggunakan larutan uji: Pada sediaan setara dengan 1,0 µg sianokobalamin, tambah 25 ml pelarut segar (setiap 100 ml mengandung 1,29

dinatrium fosfat 1,1 g asam sitrat anhidrat dan 1 g natrium metabisulfit). Masukkan kedalam otoklaf pada suhu 121°C selama 10 menit, jika diperlukan saring atau sentrifus. Encerkan larutan dengan air sampai konsentrasi setara dengan larutan standar.

Asam folat

Lakukan seperti yang tertera pada penetapan kadar asam folat, metode 2 (vitamin larut lemak, air dan mineral tablet).

Kalsium pantotenat

Lakukan penetapan kadar dengan salah satu metode berikut:

1. Lakukan penetapan kadar kalsium pantotenat dengan prosedur berikut:

   Asam fosfat encer. Encerkan 11,8 ml asam fosfat dengan air sampai batas volume 100 ml dan aduk.

   Fase gerak. Campur 30 ml metanol dengan 970 ml natrium fosfat 0,2 M. Atur pH 3,2 ± 0,1 dengan asam fosfat encer dan saring.

   Larutan standar. Larutkan dan encerkan standar kalsium pantotenat dengan fase gerak sampai konsentrasi 80 µg/ml.

   Larutan kesesuaian sistem. Larutkan dan encerkan standar rasemik pantenol dengan fase gerak sampai konsentrasi 80 µg/ml. Encerkan 5,0 ml larutan dengan larutan standar sampai volume 10 ml dan aduk.

   Larutan uji. Larutkan dan encerkan sediaan dengan fase gerak sampai konsentrasi 80 µg/ml.

   Kolom. Oktadesilsilil, ukuran 10 cm x 4,6 mm atau yang sesuai.

   Laju alir. 1 ml/menit.

   Detektor. Spektrofotometer pada panjang gelombang 210 nm.

   Injek larutan kesesuaian sistem. Resolusi antara pantenol dengan kalsium pantotenat tidak kurang 1,5 dan puncak ikutan tidak lebih dari 2. Simpangan baku relatif dari area puncak standar tidak lebih dari 2%.

   Injek. 20 µl larutan standar dan larutan uji.

   Hitung kadar kalsium pantotenat ($C_{18}H_{32}CaN_2O_{10}$) dalam mg pada sediaan dengan rumus:

$$C\left(\frac{L}{D}\right)\left(\frac{A_S}{A_{Std}}\right)$$

   Keterangan:

   C = konsentrasi standar kalsium pantotenat (mg/ml)
   L = jumlah sediaan (mg/ml)
   D = konsentrasi sediaan larutan uji (mg/ml)
   A_S = area larutan uji
   A_{Std} = area larutan standar.

2. Lakukan seperti yang tertera pada penetapan kadar kalsium pantotenat, metode 2 (vitamin larut lemak, air dan mineral tablet), menggunakan larutan uji: Pada sediaan setara dengan 50 mg kalsium pantotenat, tambah 10 ml asam asetat 0,2 M dan 100 ml natrium asetat (1 dalam 60). Encerkan dengan air sampai batas volume 1000 ml dan jika diperlukan saring. Encerkan sampai konsentrasi setara dengan standar.

Dekspantenol atau pantenol

Lakukan penetapan kadar dengan salah satu metode berikut:

1. Lakukan seperti dalam penetapan kadar kalsium pantotenat, metode 1, menggunakan:

   Asam fosfat encer, fase gerak dan larutan kesesuaian sistem.

   Larutan standar. Larutkan dan encerkan standar dekspantenol atau rasemik pantenol dengan fase gerak sampai konsentrasi 80 µg/ml.

   Larutan uji. Larutkan dan encerkan sediaan dengan fase gerak sampai konsentrasi 80 µg/ml (dekspantenol).

   Injek. 20 µl larutan standar dan larutan uji.

   Hitung kadar dekspantenol ($C_9H_{19}NO_4$) atau pantenol ($C_9H_{19}NO_4$) (mg/ml) sediaan dengan rumus:

$$C\left(\frac{L}{D}\right)\left(\frac{A_S}{A_{Std}}\right)$$

   Keterangan:

   C = konsentrasi standar pantotenol (mg/ml)
   L = jumlah sediaan (mg/ml)
   D = konsentrasi sediaan larutan uji (mg/ml)
   A_S = area larutan uji
   A_{Std} = area larutan standar.

2. Lakukan seperti yang tertera pada penetapan kadar dekspantenol atau pantenol, metode 2 (vitamin larut air kapsul), menggunakan larutan uji: Larutkan dan encerkan sediaan setara dengan 1,2 mg dekspantenol atau 2,4 mg pantenol dengan air sampai konsentrasi 1,2 µg dekspantenol atau 2,4 µg pantenol.

Niasin atau niasinamid

Lakukan dengan metode kromatografi cair, menggunakan:

Pelarut. Larutkan dan encerkan 25 g dinatrium edetat dengan air sampai batas volume 1000 ml dan aduk.

Fase gerak. Campur 0,4 ml trietilamin, 15,0 ml asam asetat glasial, dan 350 ml metanol. Encerkan dengan natrium 1-heksansulfonat 0,008 M sampai batas volume 2000 ml dan saring.

Larutan standar. Larutkan dan encerkan standar niasin atau niasinamid dengan pelarut sampai konsentrasi 0,10 mg/ml.

Larutan uji. Larutkan dan encerkan sediaan dalam pelarut sampai konsentrasi 0,1 mg/ml.

Kolom. Oktadesilsilil, ukuran 25 cm x 4,6 mm atau yang sesuai.

Laju alir. 2 ml/menit.

Detektor. Spektrofotometer pada panjang gelombang 270 nm.

Injek larutan kesesuaian sistem. Resolusi antara pantenol dengan kalsium pantotenat tidak kurang 1,5 dan puncak ikutan tidak lebih dari 2. Simpangan baku relatif dari area puncak standar tidak lebih dari 2%.

Injek. 20 µl larutan standar dan larutan uji.

Hitung kadar niasin ($C_6H_5NO_2$) atau niasinamid ($C_6H_6N_2O$) (mg/ml) sediaan dengan rumus:

$$C\left(\frac{L}{D}\right)\left(\frac{A_S}{A_{Std}}\right)$$

Keterangan:

C = konsentrasi standar niasin (mg/ml)
L = jumlah sediaan (mg/ml)
D = konsentrasi sediaan larutan uji (mg/ml)
A_S = area larutan uji
A_{Std} = area larutan standar.

Piridoksin hidroklorida

Lakukan dengan metode kromatografi cair, menggunakan:

Lakukan seperti dalam penetapan kadar niasin atau niasinamid, menggunakan: Pelarut, fase gerak dan sistem kromatografi.

Larutan standar. Larutkan dan encerkan standar piridoksin hidroklorida dengan pelarut sampai konsentrasi 0,024 mg/ml.

Larutan uji. Larutkan dan encerkan sediaan dengan pelarut sampai konsentrasi 0,024 mg/ml.

Injek. 20 µl larutan standar dan larutan uji.

Hitung kadar piridoksin hidroklorida ($C_8H_{11}NO_3{\cdot}HCl$) (mg/ml) sediaan dengan rumus:

$$C\left(\frac{L}{D}\right)\left(\frac{A_S}{A_{Std}}\right)$$

Keterangan:

C = konsentrasi standar niasin (mg/ml)
L = jumlah sediaan (mg/ml)
D = konsentrasi sediaan larutan uji (mg/ml)
A_S = area larutan uji
A_{Std} = area larutan standar.

Riboflavin atau 5-riboflavin natrium fosfat

Lakukan penetapan kadar dengan salah satu metode berikut:

1. Lakukan dengan metode kromatografi cair, menggunakan:

   Lakukan seperti dalam penetapan kadar niasin atau niasinamid, menggunakan: Pelarut, fase gerak dan sistem kromatografi.

   Larutan standar. Larutkan dan encerkan standar riboflavin dengan pelarut sampai konsentrasi 8 µg/ml, jika perlu dengan pemanasan.

   Larutan uji. Larutkan dan encerkan sediaan dengan pelarut sampai konsentrasi 8 µg/ml.

   Injek. 5 µl larutan standar dan larutan uji.

   Waktu tambat relatif untuk 5-riboflavin fosfat sekitar 0,18 dan riboflavin 1,0.

   Hitung kadar riboflavin ($C_{17}H_{20}N_4O_6$) (mg/ml) sediaan dengan rumus:

   $$1{,}493\ C\left(\frac{L}{D}\right)\left(\frac{A_S}{A_{Std}}\right)$$

   Keterangan:

   1,493 = faktor konversi untuk riboflavin-5'-fosfat terhadap riboflavin
   C = konsentrasi standar niasin (mg/ml)
   L = jumlah sediaan (mg/ml)
   D = konsentrasi sediaan larutan uji (mg/ml)
   A_S = area larutan uji
   A_{Std} = area larutan standar.

2. Lakukan dengan metode fluorometri, menggunakan:

   Blanko. Pada 1 ml asam hidroklorida 1 M dan 2 ml natrium asetat 2,5 M encerkan dengan air sampai batas volume 100 ml dan aduk.

   Larutan stok standar. Pada sediaan setara dengan 16 mg standar riboflavin, tambah 1 ml asam hidroklorida 1 M dan 2 ml natrium asetat 2,5 M, encerkan dengan air sampai batas volume 100 ml dan aduk.

   Larutan standar. Pada 5 ml larutan stok standar riboflavin, tambah 5 ml asam hidroklorida 1 M dan 10 ml natrium asetat 2,5 M, encerkan dengan air sampai batas volume 500 ml dan aduk.

   Larutan uji. Pada sediaan setara dengan 0,8 mg riboflavin, encerkan dengan air sampai batas volume 100 ml dan aduk. Pada 10 ml larutan, tambah 5 ml asam hidroklorida 1 M dan 10 ml natrium asetat 2,5 M, encerkan dengan air sampai batas volume 500 ml dan aduk.

   Detektor. Spektrofluorometer pada panjang gelombang Em 530 nm dan Ex 440 nm.

   Hitung kadar riboflavin ($C_{17}H_{20}N_4O_6$) (mg/ml) sediaan, dengan rumus:

   $$C\left(\frac{L}{D}\right)\left(\frac{A_S}{A_{Std}}\right)$$

   Keterangan:

   C = konsentrasi standar niasin (mg/ml)
   L = jumlah sediaan (mg/ml)
   D = konsentrasi sediaan larutan uji (mg/ml)
   A_S = area larutan uji
   A_{Std} = area larutan standar.

Tiamin

Lakukan penetapan kadar dengan salah satu metode berikut:

1. Lakukan dengan metode kromatografi cair, menggunakan:

Lakukan seperti dalam penetapan kadar niasin, menggunakan: Pelarut, fase gerak dan sistem kromatografi.

Larutan standar. Larutkan dan encerkan standar tiamin hidroklorida dengan pelarut sampai konsentrasi 0,024 mg/ml.

Larutan uji. Larutkan dan encerkan sediaan dengan pelarut sampai konsentrasi 0,024 mg/ml.

Injek. 5 µl larutan standar dan larutan uji.

Hitung kadar tiamin hidroklorida ($C_{12}H_{17}CIN_4OS{\cdot}HCI$) (mg/ml) sediaan dengan rumus:

$$C\left(\frac{L}{D}\right)\left(\frac{A_S}{A_{Std}}\right)$$

Keterangan:

C = konsentrasi standar niasin (mg/ml)
L = jumlah sediaan (mg/ml)
D = konsentrasi sediaan larutan uji (mg/ml)
A_S = area larutan uji
A_{Std} = area larutan standar.

Penyimpanan

Disimpan dalam wadah tertutup rapat dan terlindung dari cahaya.

Penandaan

Harus tertera: 1) Komposisi. 2) Jenis sediaan. 3) Indikasi. 4) Waktu kadaluwarsa. 5) Kondisi penyimpanan.

Vitamin Larut Air dan Mineral

Vitamin Larut Air dan Mineral Kapsul

Definisi

Vitamin larut air dan mineral kapsul adalah mengandung dua atau lebih vitamin larut air yaitu: asam askorbat atau setara dengan kalsium askorbat atau natrium askorbat, biotin, sianokobalamin, asam folat, dekspantenol atau pantenol, asam pantotenik (sebagai kalsium pantotenat atau rasemik kalsium pantotenat), piridoksin hidroklorida, riboflavin, dan tiamin hidroklorida atau tiamin mononitrat; dan satu atau lebih mineral dilengkapi dengan satu atau lebih unsur-unsur berikut dalam ionisasi: kalsium, kromium, tembaga, fluorin, iodium, besi, magnesium, mangan, molibdenum, fosfor, kalium, selenium, dan seng. Dapat mengandung zat lain yang tertera dalam label dengan jumlah yang akurat.

Kapsul memenuhi persyaratan yang dinyatakan untuk sediaan kapsul dan persyaratan berikut.

Mengandung tidak kurang 80,0% dari jumlah yang tertera dalam etiket untuk asam askorbat ($C_6H_8O_6$) atau garamnya sebagai kalsium askorbat ($C_{12}H_{14}CaO_{12}{\cdot}2H_2O$) atau natrium askorbat ($C_6H_7NaO_6$), biotin ($C_{10}H_{16}N_2O_3S$), sianokobalamin ($C_{63}H_{88}CoN_{14}O_{14}P$), asam folat ($C_{19}H_{19}N_7O_6$), dekspantenol ($C_9H_{19}NO_4$) atau pantenol ($C_9H_{19}NO_4$), kalsium pantotenat ($C_{18}H_{32}CaN_2O_{10}$), niasin ($C_6H_5NO_2$) atau niasinamid ($C_6H_6N_2O$), piridoksin hidroklorida ($C_8H_{11}NO_3{\cdot}HCI$), riboflavin ($C_{17}H_{20}N_4O_6$), dan tiamin ($C_{12}H_{17}CIN_4OS$) sebagai tiamin hidroklorida atau tiamin mononitrat; tidak kurang 80,0% dari jumlah yang tertera dalam etiket untuk kalsium (Ca), tembaga (Cu), besi (Fe), magnesium (Mg), mangan (Mn), fosfor (P), kalium (K), dan seng (Zn); kromium (Cr), fluorin (F), iodium (I), molibdenum (Mo), dan selenium (Se).

Identifikasi

Lakukan cara yang tertera pada penetapan kadar

Waktu hancur dan disolusi. Memenuhi persyaratan untuk waktu hancur.

Keseragaman berat. Memenuhi persyaratan.

Catatan. Dalam pengujian berikut, dimana lebih dari satu metode pengujian digunakan untuk zat aktif tunggal, persyaratan dipenuhi dengan salah satu metode yang telah ditentukan.

Penetapan kadar

Asam askorbat, kalsium askorbat dan natrium askorbat

Lakukan seperti yang tertera pada penetapan kadar asam askorbat, kalsium askorbat, narium askorbat, metode 1 (vitamin larut lemak, air dan mineral tablet).

Biotin

Penetapan kadar dilakukan dengan salah satu metode berikut:

1. Lakukan seperti yang tertera pada penetapan kadar biotin, metode 1 (vitamin larut lemak, air dan mineral tablet), menggunakan larutan uji: Lakukan seperti dalam penetapan kadar biotin, Metode 2 dimulai dengan pada sediaan setara dengan 1 mg biotin. Tambah 3 ml dimetilsulfoksida dan aduk. Panaskan dalam penangas air pada suhu 60°—70°C selama 5 menit. Kemudian sonikasi selama 5 menit, larutkan dengan air sampai batas volume 200 ml, aduk dan saring.
2. Lakukan seperti yang tertera pada penetapan kadar biotin, metode 2 (vitamin larut lemak, air dan mineral tablet), menggunakan larutan uji: Pada sediaan setara dengan 100 µg biotin, tambah 3 ml alkohol 50%, dan aduk. Panaskan dalam penangas air pada suhu 60°—70°C selama 5 menit. Sonikasi selama 5 menit, encerkan dalam alkohol 50% sampai batas volume 200 ml, aduk dan saring. Encerkan dengan air sampai konsentrasi 0,1 mg/ml.

Sianokobalamin

Penetapan kadar dilakukan dengan salah satu metode berikut:

1. Lakukan seperti yang tertera pada penetapan kadar sianokobalamin, metode 1 (vitamin larut lemak, air dan mineral tablet) menggunakan sediaan setara dengan 100 µg sianokobalamin.

2. Lakukan seperti yang tertera pada penetapan kadar sianokobalamin, metode 2 (vitamin larut lemak, air dan mineral tablet).

Asam Folat

Penetapan kadar dilakukan dengan salah satu metode berikut:

1. Lakukan seperti yang tertera pada penetapan kadar asam folat, metode 1 (vitamin larut lemak, air dan mineral tablet), menggunakan larutan uji: Lakukan seperti dalam penetapan kadar biotin. Metode 1, dimulai dengan pada sediaan setara dengan 0,4 mg asam folat, tambah 25 ml larutan standar, sumbat, aduk selama 10 menit, dan sentrifus. Saring supernatan dan gunakan hasil saringannya.
2. Lakukan penetapan kadar seperti yang tertera pada metode 2 (vitamin larut lemak, air dan mineral tablet), menggunakan larutan uji: Lakukan seperti dalam penetapan kadar biotin, metode 2 dimulai dengan pada sediaan setara dengan 0,3 mg asam folat. Tambah 10 ml campuran metanol dan asam asetat glasial (9:1) dan 30 ml campuran metanol dan etilen glikol (1:1). Sumbat dan kocok selama 15 menit di dalam penangas air pada suhu 60°C, dan dinginkan. Saring dan buang beberapa ml hasil saringan pertama.

Dekspantenol atau pantenol

Lakukan seperti dalam penetapan kadar dekspantenol atau pantenol (vitamin larut air kapsul).

Kalsium pantotenat

Penetapan kadar dilakukan dengan salah satu metode berikut:

1. Lakukan seperti yang tertera pada penetapan kadar kalsium pantotenat, metode 1 (vitamin larut lemak, air dan mineral tablet), menggunakan larutan uji: lakukan seperti dalam penetapan kadar biotin, metode 2 dimulai dengan pada sediaan setara 15 mg kalsium pantotenat. Tambah 25 ml larutan standar internal, aduk selama 10 menit, sentrifus, saring, dan gunakan hasil saringan.
2. Lakukan seperti yang tertera pada penetapan kadar kalsium pantotenat, metode 2 (vitamin larut lemak, air dan mineral tablet), menggunakan larutan uji: lakukan seperti dalam penetapan kadar biotin, metode 2 dimulai dengan pada sediaan setara dengan 50 mg kalsium pantotenat. Tambah 10 ml asam asetat 0,2 M dan 100 ml natrium asetat (1 dalam 60), encerkan dengan air sampai batas volume 1000 ml, dan saring. Encerkan dengan air sampai konsentrasi setara dengan larutan standar.
3. Lakukan seperti dalam penetapan kadar kalsium pantotenat, metode 3 (vitamin larut lemak, air dan mineral tablet), menggunakan larutan uji: Lakukan seperti dalam penetapan kadar asam askorbat, metode 1, dimulai dari pindahkan sediaan setara dengan 10 mg kalsium pantotenat, ke dalam labu ukur 250-ml, tambah 10 ml metanol, dan aduk. Larutkan dengan air sampai batas volume 250 ml, aduk, dan saring.

Niasin atau niasinamid, piridoksin hidroklorida, riboflavin, dan tiamin

Niasin

Penetapan kadar dilakukan dengan salah satu metode berikut:

1. Lakukan seperti penetapan kadar niasin atau niasinamid, piridoksin hidroklorida, riboflavin, dan tiamin, metode 1 (vitamin larut lemak, air dan mineral tablet), menggunakan larutan uji: Pada sediaan setara dengan 10 mg niasinamid dan masing-masing 2,5 mg piridoksin hidroklorida, riboflavin, dan tiamin hidroklorida, tambah 25 ml larutan pengencer dan aduk selama 30 detik. Panaskan selama 5 menit pada suhu 65°—70°C dan aduk selama 30 detik. Panaskan kembali selama 5 menit, dan aduk selama 30 detik. Saring, dinginkan pada suhu ruang, dan gunakan hasil saringan. (gunakan hasil saringan sebelum 3 jam).
2. Lakukan seperti dalam penetapan kadar niasin, metode 2 (vitamin larut lemak, air dan mineral tablet), menggunakan larutan uji: Pada sediaan setara dengan 2 mg riboflavin atau setara dengan 2 mg piridoksin atau setara dengan 20 mg niasin atau niasinamid. Tambah 100 ml larutan pengekstrak, dan aduk selama 20 menit. Panaskan selama 20 menit pada suhu 70°—75°C. Aduk selama 30 detik, dinginkan pada suhu ruang dan saring. Gunakan hasil saringan.
3. Lakukan seperti dalam penetapan kadar niasin atau niasinamid, piridoksin hidroklorida, riboflavin, dan tiamin, metode 3 (vitamin larut lemak, air dan mineral tablet), menggunakan larutan uji: Lakukan seperti dalam penetapan kadar asam askorbat, metode 1, dimulai dengan pada sediaan setara dengan 7,5 mg niasin atau niasinamid, 1,2 mg piridoksin hidroklorida, 0,4 mg riboflavin, dan 1,2 mg tiamin hidroklorida. Tambah 10 ml larutan metanol dan asam asetat glasial (9:1), 30 ml larutan metanol dan etilen glikol (1:1). Sumbat, kocok selama 15 menit sambil dipanaskan pada suhu 60°C, dan dinginkan. Saring, kemudian buang beberapa ml hasil saringan.

Niasinamid

Penetapan kadar dilakukan dengan salah satu metode berikut:

1. Lihat metode 1 untuk niasin.
2. Lakukan seperti dalam penetapan kadar niasinamid, metode 2 (vitamin larut lemak, air dan mineral tablet), menggunakan larutan uji: lakukan seperti dalam larutan uji untuk niasin, metode 2.
3. Lihat metode 3 untuk niasin.

Piridoksin hidroklorida

Penetapan kadar dilakukan dengan salah satu metode berikut:

1. Lihat metode 1 untuk niasin.
2. Lakukan seperti dalam penetapan kadar niasinamid, metode 2 (vitamin larut lemak, air dan mineral

tablet), menggunakan larutan uji: lakukan seperti dalam larutan uji untuk niasin, metode 2.

3. Lihat metode 3 untuk niasin.

Riboflavin

Penetapan kadar dilakukan dengan salah satu metode berikut:

1. Lihat metode 1 untuk niasin.
2. Lakukan seperti dalam penetapan kadar niasinamid, metode 2 (vitamin larut lemak, air dan mineral tablet), menggunakan larutan uji: lakukan seperti dalam larutan uji untuk niasin, Metode 2.
3. Lihat metode 3 untuk niasin.

Tiamin

Penetapan kadar dilakukan dengan salah satu metode berikut:

1. Lihat metode 1 untuk niasin.
2. Lakukan seperti dalam penetapan kadar niasinamid, metode 2 (vitamin larut lemak, air dan mineral tablet), menggunakan larutan uji: lakukan seperti dalam penetapan kadar asam askorbat, Metode 1, dimulai dengan pada sediaan setara dengan 2 mg tiamin. Tambahkan 100 ml asam hidroklorida 0,2 M, kocok selama 15 menit, dan panaskan selama 30 menit. Dinginkan sampai pada suhu ruangan, saring, dan gunakan hasil saringan.
3. Lihat metode 3 untuk niasin.

Kalsium, kromium, tembaga, fluorin, iodium, besi, magnesium, mangan, molibdenum, fosfor, kalium, selenium, seng

Lakukan dengan metode seperti yang tertera pada vitamin larut lemak, air dan mineral tablet.

Penyimpanan

Disimpan dalam wadah tertutup rapat dan terlindung dari cahaya.

Penandaan

Harus tertera: 1) Komposisi. 2) Jenis sedian. 3) Indikasi. 4) Waktu kadaluwarsa. 5) Kondisi penyimpanan.

Vitamin Larut Air dan Mineral Larutan Oral

Definisi

Vitamin larut air dalam sediaan larutan oral mengandung dua atau lebih vitamin larut air yaitu: sianokobalamin, niasin atau niasinamid, dekspantenol atau pantenol, asam pantotenat (sebagai kalsium pantotenat atau rasemik kalsium pantotenat), piridoksin hidroklorida, riboflavin atau natrium riboflavin-5'-fosfat, dan tiamin hidroklorida atau tiamin mononitrat; dan satu atau lebih mineral dilengkapi dengan satu atau lebih unsur-unsur berikut dalam ionisasi: iodium, besi, magnesium, mangan, dan seng.

Larutan oral memenuhi persyaratan yang dinyatakan untuk sediaan larutan oral dan persyaratan berikut:

Mengandung tidak kurang 80,0% dari jumlah yang tertera pada sianokobalamin ($C_{63}H_{88}CoN_{14}O_{14}P$), tiamin ($C_{12}H_{17}CIN_4OS$) sebagai tiamin hidroklorida atau tiamin mononitrat; kalsium pantotenat ($C_{18}H_{32}CaN_2O_{10}$), dekspantenol ($C_9H_{19}NO_4$) atau pantenol ($C_9H_{19}NO_4$), niasin ($C_6H_5NO_2$) atau niasinamid ($C_6H_6N_2O$), piridoksin hidroklorida ($C_8H_{11}NO_3$·HCI), dan riboflavin ($C_{17}H_{20}N_4O_6$) atau natrium riboflavin-5'-fosfat ($C_{17}H_{20}N_4NaO_9P$), iodium (I), besi (Fe), magnesium (Mg), mangan (Mn), dan seng (Zn).

Identifikasi

Lakukan seperti pada penetapan kadar.

Alkohol. Tidak kurang dari 90,0% dan tidak lebih dari 120,0% dari jumlah yang tertera.

Penetapan kadar

Vitamin B_1 (tiamin)

Lakukan penetapan kadar dengan salah satu metode berikut:

1. Lakukan seperti yang tertera dalam penetapan kadar niasin atau niasinamid (vitamin larut lemak, air dan mineral larutan oral), menggunakan: Pelarut, fase gerak, dan sistem kromatografik.
2. Lakukan seperti yang tertera dalam penetapan kadar tiamin (vitamin larut lemak, air dan mineral larutan oral), menggunakan larutan standar, larutan uji, dan prosedur.

Vitamin B_2 (riboflavin atau riboflavin-5'-natrium fosfat)

Lakukan penetapan kadar dengan salah satu metode berikut:

1. Lakukan seperti yang tertera dalam penetapan kadar piridoksin hidroklorida (vitamin larut lemak, air dan mineral larutan oral), menggunakan pelarut, fase gerak, dan sistem kromatografik.
2. Lakukan seperti yang tertera dalam penetapan kadar riboflavin atau riboflavin-5 -natrium fosfat, metode 1 (vitamin larut lemak, air dan mineral larutan oral), menggunakan larutan standar, larutan uji, dan prosedur.
3. Lakukan seperti yang tertera dalam penetapan kadar riboflavin atau riboflavin-5 -natrium fosfat, metode 2 (vitamin larut lemak, air dan mineral larutan oral).

Vitamin B_3 (niasin atau niasinamid)

Lakukan seperti yang tertera dalam penetapan kadar niasin atau niasinamid (vitamin larut lemak, air dan mineral larutan oral).

Vitamin B_6 (piridoksin hidroklorida)

Lakukan penetapan kadar dengan salah satu metode berikut:

1. Lakukan seperti yang tertera dalam penetapan kadar niasin atau niasinamid (vitamin larut lemak, air dan mineral larutan oral), menggunakan pelarut, fase gerak, dan sistem kromatografik.

2. Lakukan seperti yang tertera dalam penetapan kadar piridoksin hidroklorida (vitamin larut lemak, air dan mineral larutan oral), menggunakan larutan standar, larutan uji, dan prosedur.

Vitamin B_{12} (sianokobalamin)

Lakukan seperti yang tertera dalam penetapan kadar sianokobalamin, metode 2 (vitamin larut lemak, air dan mineral tablet), menggunakan:

Larutan pengekstrak. Pada setiap 100 ml mengandung 1,29 g natrium fosfat dibasa, 1,1 g asam sitrat anhidrat, dan 1,0 g dari natrium metabisulfit.

Larutan uji. Pada sediaan setara dengan 1,0 µg sianokobalamin, tambah 25 ml larutan pengekstrak. Masukkan kedalam otoklaf pada suhu 121°C selama 10 menit. Biarkan sampai tercampur, saring atau jika diperlukan, sentrifus. Encerkan larutan dengan air sampai konsentrasi mengandung vitamin B_{12} setara dengan larutan standar.

Kalsium pantotenat

Lakukan penetapan kadar dengan salah satu metode berikut:

1. Lakukan seperti yang tertera dalam penetapan kadar kalsium pantotenat, metode 1 (vitamin larut lemak, air dan mineral larutan oral).
2. Lakukan seperti yang tertera dalam penetapan kadar kalsium pantotenat, metode 2 (vitamin larut lemak dan air dengan mineral tablet), menggunakan larutan uji: Pada sediaan setara dengan 50 mg kalsium pantotenat, tambah 10 ml asam asetat 0,2 m dan 100 ml larutan natrium asetat (1 dari 60), encerkan dengan air sampai batas volume 1000 ml, dan saring. Encerkan larutan dengan air sampai konsentrasi setara dengan larutan standar.

Dekspantenol atau pantenol

Lakukan penetapan kadar dengan salah satu metode berikut:

1. Lakukan seperti yang tertera dalam penetapan kadar kalsium pantotenat, metode 1 (vitamin larut lemak, air dan mineral larutan oral), menggunakan asam fosfat encer, fase gerak, dan sistem kromatografi.
2. Lakukan seperti yang tertera dalam penetapan kadar dekspantenol atau pantenol, metode 1 (vitamin larut lemak, air dan mineral larutan oral), menggunakan larutan standar, larutan kesesuaian sistem, larutan uji, dan prosedur.
3. Lakukan seperti yang tertera dalam penetapan kadar dekspantenol atau pantenol (vitamin larut air kapsul), menggunakan larutan uji: Pada sediaan setara dengan 1,2 mg dekspantenol atau 2,4 mg pantenol, encerkan dengan air sampai batas volume 100 ml dan aduk. Encerkan dengan air sampai konsentrasi 1,2 µg/ml dekspantenol atau 2,4 µg/ml pantenol.

Kalsium, kromium, tembaga, fluorin, iodium, besi, magnesium, mangan, molibdenum, fosfor, kalium, selenium dan seng

Lakukan dengan metode seperti yang tertera pada vitamin larut lemak, air dan mineral larutan oral.

Penyimpanan

Disimpan dalam wadah tertutup rapat dan terlindung dari cahaya.

Penandaan

Harus tertera: 1) Komposisi. 2) Jenis sediaan. 3) Indikasi. 4) Waktu kadaluwarsa. 5) Kondisi penyimpanan.

Vitamin Larut Air dan Mineral Tablet

Definisi

Vitamin larut air dan mineral tablet adalah mengandung dua atau lebih vitamin larut air yaitu: asam askorbat atau setara dengan natrium askorbat atau kalsium askorbat, biotin, sianokobalamin, asam folat, niasin atau niasinamid, dekspantenol atau pantenol, asam pantotenat (sebagai kalsium pantotenat atau rasemik kalsium pantotenat), piridoksin hidroklorida, riboflavin, dan tiamin hidroklorida atau tiamin mononitrat; dan satu atau lebih mineral dilengkapi dengan satu atau lebih unsur-unsur berikut: kalsium, kromium, tembaga, fluorin, iodium, besi, magnesium, mangan, molibdenum, fosfor, kalium, selenium, dan seng. Dapat mengandung zat lain yang tertera di etiket dengan jumlah yang akurat.

Tablet memenuhi persyaratan yang dinyatakan untuk sediaan tablet dan persyaratan berikut:

Mengandung tidak kurang 80,0% dari jumlah yang tertera pada etiket untuk asam askorbat ($C_6H_8O_6$) atau garamnya sebagai kalsium askorbat ($C_{12}H_{14}CaO_{12}\cdot 2H_2O$) atau natrium askorbat ($C_6H_7NaO_6$), biotin ($C_{10}H_{16}N_2O_3S$), sianokobalamin ($C_{63}H_{88}CoN_{14}O_{14}P$), asam folat ($C_{19}H_{19}N_7O_6$), kalsium pantotenat ($C_{18}H_{32}CaN_2O_{10}$), niasin ($C_6H_5NO_2$) atau niasinamid ($C_6H_6N_2O$), piridoksin hidroklorida ($C_8H_{11}NO_3\cdot HCl$), riboflavin ($C_{17}H_{20}N_4O_6$), dan tiamin ($C_{12}H_{17}ClN_4OS$) sebagai tiamin hidroklorida atau tiamin mononitrat; sama atau tidak kurang dari 80,0% dari jumlah yang tertera pada etiket untuk kalsium (Ca), tembaga (Cu), besi (Fe), magnesium (Mg), mangan (Mn), fosfor (P), kalium (K), dan seng (Zn); kromium (Cr), fluorin (F), iodium (I), molibdenum (Mo), dan selenium (Se).

Identifikasi

Lakukan dengan cara seperti yang tertera pada penetapan kadar.

Waktu hancur dan disolusi. Memenuhi persyaratan untuk uji waktu hancur.

Keseragaman bobot. Memenuhi persyaratan uji keseragaman.

Penetapan kadar

Vitamin B_1 (tiamin)

Penetapan kadar dilakukan dengan salah satu metode berikut:

1. Lihat metode 1 untuk niasin
2. Lakukan seperti dalam penetapan kadar tiamin, metode 2 (vitamin larut lemak, air dan mineral tablet) kecuali kaplet menggunakan larutan uji: lakukan seperti larutan uji pada penetapan kadar niasin, metode 2.
3. Lihat metode 3 untuk niasin.

Vitamin B_2 (riboflavin atau riboflavin-5′-natrium fosfat)

Penetapan kadar dilakukan dengan salah satu metode berikut:

1. Lihat metode 1 untuk niasin
2. Lakukan seperti dalam penetapan kadar riboflavin, metode 2 (vitamin larut lemak, air dan mineral tablet) kecuali kaplet menggunakan larutan uji : lakukan seperti larutan uji pada penetapan kadar niasin, metode 2.
3. Lihat metode 3 untuk niasin

Vitamin B_3 (niasin)

Penetapan kadar dilakukan dengan salah satu metode berikut:

1. Lakukan seperti dalam penetapan kadar niasin atau niasinamid, piridoksin hidroklorida, riboflavin, dan tiamin, metode 1 (vitamin larut lemak, air dan mineral tablet).
2. Lakukan seperti dalam penetapan kadar niasin, metode 2 (vitamin larut lemak, air dan mineral tablet).
3. Lakukan seperti dalam penetapan kadar niasin atau niasinamid, piridoksin hidroklorida, riboflavin, dan tiamin, metode 3 (vitamin larut lemak, air dan mineral tablet).

Vitamin B_3 (niasinamid)

Penetapan kadar dilakukan dengan salah satu metode berikut:

1. Lihat metode 1 untuk niasin.
2. Lakukan seperti dalam penetapan kadar niasinamid, metode 2 (vitamin larut lemak, air dan mineral tablet).
3. Lihat metode 3 untuk niasin.

Vitamin B_6 (piridoksin hidroklorida)

Penetapan kadar dilakukan dengan salah satu metode berikut:

1. Lihat metode 1 untuk niasin.
2. Lakukan seperti dalam penetapan kadar piridoksin hidroklorida, metode 2 (vitamin larut lemak, air dan mineral tablet).
3. Lihat metode 3 untuk niasin.

Vitamin B_{12} (sianokobalamin)

Penetapan kadar dilakukan dengan salah satu metode berikut:

1. Lakukan seperti dalam penetapan kadar sianokobalamin, metode 1 (vitamin larut lemak, air dan mineral tablet).
2. Lakukan seperti dalam penetapan kadar sianokobalamin, metode 2 (vitamin larut lemak, air dan mineral tablet).

Vitamin H (biotin)

Penetapan kadar dilakukan dengan salah satu metode berikut:

1. Lakukan seperti dalam penetapan kadar biotin, metode 1 (vitamin larut lemak, air dan mineral tablet).
2. Lakukan seperti dalam penetapan kadar biotin, metode 2 (vitamin larut lemak, air dan mineral tablet).
3. Lakukan seperti dalam penetapan kadar biotin, metode 3 (vitamin larut lemak, air dan mineral tablet).

Asam askorbat, kalsium askorbat dan natrium askorbat

Lakukan seperti dalam penetapan kadar asam askorbat, metode 1 (vitamin larut lemak, air dan mineral tablet).

Asam folat

Penetapan kadar dilakukan dengan salah satu metode berikut:

1. Lakukan seperti dalam penetapan kadar asam folat, metode 1 (vitamin larut lemak, air dan mineral tablet).
2. Lakukan seperti dalam penetapan kadar asam folat, metode 2 (vitamin larut lemak, air dan mineral tablet).

Kalsium pantotenat

Penetapan kadar dilakukan dengan salah satu metode berikut:

1. Lakukan seperti dalam penetapan kadar kalsium pantotenat, metode 1 (vitamin larut lemak, air dan mineral tablet).
2. Lakukan seperti dalam penetapan kadar kalsium pantotenat, metode 2 (vitamin larut lemak, air dan mineral tablet).
3. Lakukan seperti dalam penetapan kadar kalsium pantotenat, metode 3 (vitamin larut lemak, air dan mineral tablet).

Kalsium, kromium, tembaga, fluorin, iodium, besi, magnesium, mangan, molibdenum, fosfor, kalium, selenium dan seng

Lakukan dengan metode seperti yang tertera pada vitamin larut lemak, air dan mineral tablet.

Penyimpanan

Disimpan dalam wadah, tertutup rapat dan terlindung dari cahaya.

Penandaan

Harus tertera: 1) Komposisi. 2) Jenis sediaan. 3) Indikasi. 4) Waktu kadaluwarsa. 5) Kondisi penyimpanan.

Vitamin Larut Air, Lemak dan Mineral

Vitamin Larut Air, Lemak dan Mineral Larutan Oral

Definisi

Vitamin larut air, minyak dan mineral dalam sediaan larutan oral mengandung dua atau lebih vitamin larut lemak yaitu: Vitamin A, vitamin D sebagai ergokalsiferol (vitamin D_2) atau kolekalsiferol (vitamin D_3), vitamin E, fitonadion (vitamin K_1), β-karotin; dan satu atau lebih vitamin yang dapat larut dalam air yaitu: asam askorbat atau setara dengan kalsium askorbat atau natrium askorbat, biotin, sianokobalamin, asam folat, niasin atau niasinamid, asam pantotenik (sebagai kalsium pantotenat atau rasemik kalsium pantotenat), piridoksin hidroklorida, riboflavin, dan tiamin hidroklorida atau tiamin mononitrat dan dapat mengandung zat lain yang tertera dalam etiket dengan jumlah yang akurat.

Larutan oral memenuhi persyaratan yang dinyatakan untuk sediaan larutan oral dan persyaratan berikut:

Mengandung tidak kurang 80,0% dari jumlah yang tertera pada etiket untuk vitamin A ($C_{20}H_{30}O$) sebagai retinol atau ester retinol dalam bentuk retinil asetat ($C_{22}H_{32}O_2$) atau retinil palmitat ($C_{36}H_{60}O_2$), vitamin D sebagai kolekalsiferol ($C_{27}H_{44}O$) atau ergokalsiferol ($C_{28}H_{44}O$), vitamin E sebagai α-tokoferol ($C_{29}H_{50}O_2$) atau α-tokoferil asetat ($C_{31}H_{52}O_3$) atau α-tokoferil suksinat ($C_{33}H_{54}O_5$), fitonadion ($C_{31}H_{46}O_2$), dan β-karotin ($C_{40}H_{56}$); tidak kurang 90% dari jumlah yang tertera dalam etiket untuk asam askorbat ($C_6H_8O_6$) atau garamnya sebagai kalsium askorbat ($C_{12}H_{14}CaO_{12}\cdot 2H_2O$) atau natrium askorbat ($C_6H_7NaO_6$), biotin ($C_{10}H_{16}N_2O_3S$), sianokobalamin ($C_{63}H_{88}CoN_{14}O_{14}P$), asam folat ($C_{19}H_{19}N_7O_6$), niasin ($C_6H_5NO_2$), atau niasinamid ($C_6H_6N_2O$), kalsium pantotenat ($C_{18}H_{32}CaN_2O_{10}$), piridoksin hidroklorida ($C_8H_{11}NO_3\cdot HCl$), riboflavin ($C_{17}H_{20}N_4O_6$), dan tiamin ($C_{12}H_{17}ClN_4OS$) sebagai tiamin hidroklorida atau tiamin mononitrat, untuk kalsium (Ca), tembaga (Cu), besi (Fe), magnesium (Mg), mangan (Mn), fosfor (P), kalium (K), dan seng (Zn); kromium (Cr), fluorin (F), iodium (I), molibdenum (Mo), dan selenium, dari jumlah yang tertera pada etiket.

Identifikasi

Lakukan dengan cara seperti yang tertera pada penetapan kadar.

Alkohol. Tidak kurang dari 90% dan tidak lebih dari 120% dari jumlah yang tertera pada etiket.

Catatan. Dalam penetapan kadar berikut, dimana lebih dari satu metode penetapan kadar digunakan untuk zat aktif tunggal, persyaratan dipenuhi dengan salah satu metode yang telah ditentukan.

Penetapan kadar

Vitamin A

Lakukan dengan metode kromatografi cair, menggunakan:

Pelarut. Campuran dari tetrahidrofuran dan asetonitril (1:1).

Fase gerak. Campuran dari metanol, asetonitril, dan n-heksan (46,5 : 46,5 : 7,0). Larutan standar: larutkan dan encerkan standar vitamin A (retinil asetat) dalam pelarut sampai konsentrasi 0,33 mg/ml.

Larutan kesesuaian sistem. Larutkan sediaan retinil palmitat dalam n-heksan sampai konsentrasi 15 µg/ml. Campur dengan volume yang sama dengan larutan standar (masing-masing mengandung 7,5 µg retinil asetat/ml dan 7,5 µg retinil palmitat/ml).

Larutan uji. Pindahkan sediaan setara 3,3 mg vitamin A kedalam labu pisah - 500 ml yang mengandung 10 ml air dan 20 ml alkohol anhidrat. Tambah 150 ml heksan sumbat dan aduk selama 1 menit. Tambah 150 ml heksan, sumbat dan aduk, diamkan sampai larutan terpisah dan buang lapisan air. Saring lapisan heksan melalui natrium sulfat anhidrat dan masukkan ke dalam labu-500 ml. Uapkan sampai kering menggunakan rotavapor pada suhu 65°C. Tambahkan segera 10 ml pelarut, aduk hingga residu larutdan saring.

Kolom. Oktadesilsilil, ukuran 4,6 mm x 25 cm atau yang sesuai, suhu 40°C.

Laju alir. 1,5 ml/menit.

Detektor. Spektrofotometer pada panjang gelombang 265 nm.

Kesesuaian sistem. Resolusi atara retinil asetat dan retinil palmitat tidak kurang dari 10; dan simpangan baku relatif tidak lebih dari 5,0%.

Injek 20 µL larutan standar dan larutan dan ukur area puncak untuk retinil asetat yang diperoleh dari larutan standar serta area puncak untuk retinil asetat atau retinil palmitat dalam kromatogram larutan uji.

Untuk produk mengandung vitamin A asetat atau vitamin A palmitat, Hitung kadar (mg), dari vitamin A sebagai retinol dengan rumus:

$$10\left(\frac{0{,}872\ C}{V}\right)\left(\frac{A_S}{A_{Std}}\right)$$

Keterangan:

0,872 = faktor konversi untuk retinil asetat dari standar vitamin A

C = konsentrasi standar vitamin A (mg/ml)

V = volume sediaan larutan uji (ml)

A_S = area larutan uji

A_{Std} = area larutan standar.

Vitamin D (kolekalsiferol atau ergokalsiferol)

(Catatan: Gunakan standar vitamin D yang sesuai dengan sediaan).

Lakukan dengan metode kromatografi cair, menggunakan:

Pelarut dan fase gerak. sama seperti untuk penetapan kadar vitamin A.

Larutan standar. Larutkan standar kolekalsiferol atau ergokalsiferol dalam n-heksan sampai konsentrasi 5 µg/ml.

Larutan kesesuaian sistem. Panaskan sejumlah larutan standar dengan suhu 60° selama 1 jam untuk mendapatkan isomer vitamin D (kolekalsiferol atau ergokalsiferol) sebagai prekursor.

Larutan uji. Pindahkan sediaan setara dengan 50 µg kolekalsiferol atau ergokalsiferol ke dalam labu pisah-500 ml yang mengandung 10 ml air dan 20 ml alkohol anhidrat. Tambah150 ml heksan, sumbat dan aduk selama 1 menit. Tambah 150 ml heksan sumbat dan aduk, diamkan sampai larutan terpisah. Buang lapisan air, dan saring lapisan heksan melalui natrium sulfat anhidrat dan masukkan ke dalam labu 500 ml. Uapkan sampai kering menggunakan rotavapor pada suhu 65°C. Tambahkan segera 10 ml pelarut, aduk sampai residu larut, dan saring.

Kolom. Oktadesilsilil, ukuran 4,6 mm x 25 cm atau yang sesuai, suhu 40°C.

Laju alir. 1,5 ml/menit.

Detektor. Spektrofotometer pada panjang gelombang 265 nm.

Kesesuaian sistem. Resolusi antara vitamin D yang terbentuk dan prekursor tidak kurang dari 10. dan simpangan baku relatif untuk tidak lebih dari 3%.

Injek 20 µl larutan standar dan larutan uji ke dalam kromatograf dan ukur tinggi puncak vitamin D. Hitung kadar (µg) dari kolekalsiferol atau ergokalsiferol dengan rumus:

$$1{,}09\left(\frac{10\,C}{V}\right)\left(\frac{A_S}{A_{Std}}\right)$$

Keterangan:

1,09 = faktor konversi untuk previtamin D dari standar vitamin D

C = konsentrasi standar vitamin D (µg/ml)

V = volume sediaan larutan uji (ml)

A_S = area larutan uji

A_{Std} = area larutan standar.

Vitamin E

Lakukan dengan metode kromatografi cair, menggunakan:

Pelarut. Campuran dari asetonitril dan etil asetat (1:1).

Larutan kalium hidroksida. Larutkan dan encerkan 90 g kalium hidroksida dengan air sampai batas volume 100 ml. Aduk sampai larut, dinginkan.

Fase gerak. Campuran dari metanol, asetonitril, dan n-heksan (46,5:46,5:7,0).

Larutan standar. Larutkan standar α-tokoferol dengan pelarut dan encerkan sampai diperoleh konsentrasi 0,3 mg/ml.

Larutan kesesuaian sistem. Larutkan standar ergokalsiferol dalam metanol sampai konsentrasi 0,65 mg/ml. Pindahkan 1 ml larutan ke dalam labu yang mengandung 100 mg α-tokoferil asetat. Larutkan dengan 30 ml metanol dan aduk. Simpan dalam lemari pendingin.

Larutan uji. Pada sediaan setara dengan 1,5 mg α-tokoferol, tambah 25 ml alkohol anhidrat. Refluks kondensor dalam penangas air pada suhu 60°—70°C selama 1 menit. Dengan hati-hati tambahkan 3 ml kalium hidroksida melalui kondensor, lanjutkan refluks selama 30 menit. Keluarkan labu dari penangas air, bilas kondensor dengan 15 ml air. Dinginkan dan pindahkan dengan bantuan sedikit air dalam labu pisah 250 ml. Bilas labu dengan 50 ml n-heksan. Aduk dengan kuat selama 1 menit dan biarkan lapisan terpisah. Alirkan lapisan air ke dalam labu kocok kedua, ulangi proses ekstraki dengan 50 ml n-heksan. Buang lapisan air dan campurkan lapisan heksan. Bilas fase heksan dengan 25 ml air, biarkan terpisah dan buang lapisan air. Tambahkan 3 tetes asam asetat glasial dan ulangi proses pencucian dua kali atau lebih. Saring fase heksan melalui natrium sulfat anhidrat dan masukan ke dalam labu-250 ml. Bilas corong dan natrium sulfat dengan n-heksan. Uapkan ekstrak heksan sampai kering dengan rotavapor pada suhu 50°C. Segera tambahkan 5 ml pelarut dan aduk sampai residu larut.

Kolom. Oktadesilsilil, ukuran 4,6 mm x 25 cm atau yang sesuai, suhu 40°C.

Laju alir. 3 ml/menit.

Detektor. Spektrofotometer pada panjang gelombang 291 nm.

Kesesuian sistem. Waktu tambat relatif 0,5 untuk ergokalsiferol dan 1,0 untuk α-tokoferil asetat; resolusi antara ergokalsiferol dan α-tokoferil asetat tidak kurang dari 12.

Injeks 20 µl larutan standar dan larutan uji dan ukur tinggi puncak vitamin E. Hitung kadar (µg) dengan rumus:

$$5\left(\frac{C}{V}\right)\left(\frac{A_S}{A_{Std}}\right)$$

Keterangan:

C = konsentrasi standar α-tokoferol (mg/ml)

V = volume sediaan larutan uji (ml)

A_S = area larutan uji

A_{Std} = area larutan standar.

Vitamin K (fitonadion)

Lakukan penetapan kadar dengan cara yang tertera pada penetapan kadar dalam vitamin larut air, lemak dan mineral tablet.

β-Karoten

Lakukan penetapan kadar dengan cara yang tertera pada penetapan kadar dalam vitramin larut air, lemak dan mineral tablet.

Asam askorbat, kalsium askorbat dan natrium askorbat

Pada sediaan setara dengan 80 mg asam askorbat tambahkan 50 ml air, 100 ml asam sulfat 0,1 M dan 15,0

ml iodium 0,1 M. Aduk selama 30 detik, tambahkan 5 ml kanji, dan segera titrasi dengan natrium tiosulfat 0,1 M sampai warna hilang. Setiap ml iodium 0,1 M setara dengan 8,806 mg $C_6H_8O_6$ atau setara dengan 10,66 mg $C_{12}H_{14}CaO_{12}.2H_2O$ atau setara dengan 9,905 mg $C_6H_7NaO_6$.

Biotin

Lakukan penetapan kadar dengan salah satu metode berikut:

1. Lakukan penetapan kadar seperti yang tertera pada metode 2 dalam vitamin larut lemak, air dan mineral tablet, menggunakan larutan uji: Larutkan dan encerkan sediaan sampai konsentrasi 0,1 µg/ml.
2. Lakukan penetapan kadar seperti yang tertera pada metode 3 dalam vitamin larut lemak, air dan mineral tablet, menggunakan larutan uji: Larutkan dan encerkan sediaan sampai diperoleh konsentrasi 0,6 µg/ml. Atur pH 6,0—7,0 dengan natrium hidroksida 0,1 M.

Vitamin B_{12} (sianokobalamin)

Lakukan penetapan kadar seperti yang tertera pada metode 2 dalam vitamin larut lemak, air dan mineral tablet, menggunakan larutan uji: Sediaan setara dengan 1,0 µg sianokobalamin dalam bejana yang mengandung 25 ml pelarut segar (setiap 100 ml mengandung 1,29 g dinatrium fosfat, 1,1 g asam sitrat anhidrat dan 1 g natrium metabisulfit).

Masukkan kedalam otoklaf pada suhu 121°C selama 10 menit, jika diperlukan saring atau sentrifus. Encerkan larutan dengan air sampai diperoleh konsentrasi akhir sama dengan larutan standar.

Asam folat

Lakukan penetapan kadar seperti yang tertera pada metode 2 dalam vitamin larut lemak, air dan mineral tablet.

Kalsium pantotenat

Lakukan penetapan kadar dengan salah satu metode berikut:

1. Lakukan penetapan kadar kalsium pantotenat dengan prosedur berikut:

   Asam fosfat encer. Encerkan 11,8 ml asam fosfat dengan air sampai batas volume 100 ml dan aduk.

   Fase gerak. Campur 30 ml metanol dengan 970 ml natrium fosfat 0,2 M. Atur pH 3,2 ± 0,1 dengan asam fosfat encer, saring

   Larutan standar. Larutkan dan encerkan standar kalsium pantotenat dengan fase gerak sampai konsentrasi 80 µg/ml.

   Kesesuaian sistem. Larutkan dan encerkan standar rasemik pantenol dengan fase gerak sampai konsentrasi 80 µg/ml. Pindahkan 5,0 ml larutan ini dan encerkan dengan larutan standar sampai batas volume 10 ml, aduk.

   Larutan uji. Larutkan dan encerkan sediaan dengan fase gerak sampai konsentrasi 80 µg/ml.

   Kolom. Oktadesilsilsilil, ukuran 4,6 mm x 10 cm atau yang sesuai.

   Laju alir. 1 ml/menit.

   Detektor. Spektrofotometer pada panjang gelombang 210 nm.

   Injek larutan kesesuaian sistem. Resolusi antara pantenol dengan kalsium pantotenat tidak kurang 1,5 dan puncak ikutan tidak lebih dari 2. Simpangan baku relatif dari area puncak standar tidak lebih dari 2%.

   Injek. 20 µl larutan standar dan larutan uji.

   Hitung kadar kalsium pantotenat (mg/ml) menggunakan rumus:

$$C\left(\frac{L}{D}\right)\left(\frac{A_S}{A_{Std}}\right)$$

   Keterangan:

   C = konsentrasi standar kalsium pantotenat (mg/ml)

   L = jumlah sediaan (mg/ml)

   D = konsentrasi sediaan larutan uji (mg/ml)

   A_S = area larutan uji

   A_{Std} = area larutan standar.

2. Lakukan penetapan kadar seperti yang tertera pada metode 2 dalam vitamin larut lemak, air dan mineral tablet, menggunakan larutan uji: Pindahkan sediaan setara dengan 50 mg kalsium pantotenat ke dalam labu 1000 ml yang mengandung 500 ml air. Tambahkan 10 ml asam asetat 0,2 M dan 100 ml natrium asetat (1 dalam 60). Encerkan dengan air sampai batas volume 1000 ml, saring. Jika diperlukan encerkan sampai diperoleh konsentrasi sama dengan standar.

Dekspantenol atau pantenol

Lakukan penetapan kadar dengan salah satu metode berikut:

1. Lakukan seperti dalam penetapan kadar kalsium pantotenat metode 1.

   Asam fosfat encer, fase gerak dan kesesuaian sistem. Lihat penetapan kalsium pantotenat.

   Larutan standar. Larutkan dan encerkan standar dekspantenol atau rasemik pantenol dengan fase gerak sampai konsentrasi 80 µg/ml.

   Kesesuaian sistem. Larutkan dan encerkan standar kalsium pantotenat dengan fase gerak sampai konsentrasi 80 µg/ml. Pindahkan 5,0 ml larutan ini dan encerkan dengan larutan standar sampai batas volume 10 ml, aduk.

   Larutan uji. Larutkan dan encerkan sediaan dengan fase gerak sampai konsentrasi 80 µg/ml (dekspantenol).

   Injek 20 µL larutan standar dan larutan uji. Hitung kadar dekspantenol (mg/ml) sediaan menggunakan rumus:

$$C\left(\frac{L}{D}\right)\left(\frac{A_S}{A_{Std}}\right)$$

Keterangan:
C = konsentrasi standar pantotenol (mg/ml)
L = jumlah sediaan (mg/ml)
D = konsentrasi sediaan larutan uji (mg/ml)
A_S = area larutan uji
A_{Std} = area larutan standar.

2. Lakukan penetapan kadar seperti yang tertera pada metode 2 dalam (vitamin larut air kapsul), menggunakan larutan uji: Pindahkan sediaan setara dengan 1,2 mg dekspantenol atau 2,4 mg pantenol kedalam labu, larutkan dan encerkan dengan air sampai diperoleh konsentrasi 1,2 µg dekspantenol atau 2,4 µg pantenol.

Niasin atau niasinamid

Lakukan dengan metode kromatografi cair, menggunakan:

Pelarut. Larutkan dan encerkan 25 g dinatrium edetat dengan air sampai batas volume 1000 ml, aduk.

Fase gerak. Campur 0,4 ml trietilamin, 15,0 ml asam asetat glasial, dan 350 ml metanol. Encerkan dengan natrium 1-heksansulfonat 0,008 M sampai batas volume 2000 ml, dan saring.

Larutan standar. Larutkan dan encerkan standar niasin atau niasinamid dengan pelarut sampai diperoleh konsentrasi 0,10 mg/ml.

Larutan uji. Larutkan dan encerkan sediaan dalam pelarut sampai konsentrasi 0,1 mg/ml.

Kolom. Oktadesilsilil, ukuran 4,6 mm x 25 cm atau yang sesuai.

Laju alir. 2 ml/menit.

Detektor. Spektrofotometer pada panjang gelombang 270 nm.

Injek larutan kesesuaian sistem. Resolusi antara pantenol dengan kalsium pantotenat tidak kurang 1,5 dan puncak ikutan tidak lebih dari 2. Simpangan baku relatif dari area puncak standar tidak lebih dari 2%.

Injek. 20 µl larutan standar dan larutan uji.

Hitung kadar niasin atau niasinamid (mg/ml) sediaan menggunakan rumus:

$$C\left(\frac{L}{D}\right)\left(\frac{A_S}{A_{Std}}\right)$$

Keterangan:
C = konsentrasi standar niasin (mg/ml)
L = jumlah sediaan (mg/ml)
D = konsentrasi sediaan larutan uji (mg/ml)
A_S = area larutan uji
A_{Std} = area larutan standar.

Piridoksin hidroklorida

Lakukan dengan metode kromatografi cair, menggunakan:

Pelarut, fase gerak dan sistem kromatografi. Seperti dalam penetapan kadar niasin atau niasinamid.

Larutan standar. Larutkan dan encerkan standar piridoksin hidroklorida dengan pelarut sampai konsentrasi 0,024 mg/ml.

Larutan uji. Larutkan dan encerkan sediaan dengan pelarut sampai konsentrasi piridoksin hidroklorida 0,024 mg/ml.

Injek. 20 µl larutan standar dan larutan uji.

Hitung kadar piridoksin hidroklorida (mg/ml) sediaan menggunakan rumus:

$$C\left(\frac{L}{D}\right)\left(\frac{A_S}{A_{Std}}\right)$$

Keterangan:
C = konsentrasi standar niasin (mg/ml)
L = jumlah sediaan (mg/ml)
D = konsentrasi sediaan larutan uji (mg/ml)
A_S = area larutan uji
A_{Std} = area larutan standar.

Riboflavin atau 5-riboflavin natrium fosfat

Lakukan penetapan kadar dengan salah satu metode berikut:

1. Lakukan dengan metode kromatografi cair, menggunakan:

   Pelarut, fase gerak dan sistem kromatograf. Seperti penetapan kadar niasin atau niasinamid.

   Larutan standar. Larutkan dan encerkan standar riboflavin dengan pelarut sampai konsentrasi 8 µg/ml, bila perlu dengan pemanasan.

   Larutan uji. Larutkan dan encerkan sediaan dengan pelarut sampai konsentrasi riboflavin 8 µg/ml.

   Injek. 5 µl larutan standar dan larutan uji.

   Waktu tambat relatif untuk 5-riboflavin fosfat sekitar 0,18 dan riboflavin 1,0. Hitung kadar riboflavin (mg/ml) menggunakan rumus:

$$1{,}493\,C\left(\frac{L}{D}\right)\left(\frac{A_S}{A_{Std}}\right)$$

   Keterangan:
   1,493 = faktor konversi untuk riboflavin-5'-fosfat terhadap riboflavin
   C = konsentrasi standar niasin (mg/ml)
   L = jumlah sediaan (mg/ml)
   D = konsentrasi sediaan larutan uji (mg/ml)
   A_S = area larutan uji
   A_{Std} = area larutan standar.

2. Lakukan dengan metode fluorometri, menggunakan:

   Blanko. Pada 1 ml asam hidroklorida 1 M dan 2 ml natrium asetat 2,5 M encerkan dengan air sampai batas volume 100 ml, aduk.

   Larutan stok standar. Pada sediaan setara dengan 16 mg standar riboflavin, tambah 1 ml asam

hidroklorida 1 M dan 2 ml natrium asetat 2,5 M encerkan dengan air sampai batas volume 100 ml, aduk.

Larutan standar. Pada 5 ml larutan stok standar riboflavin tambah 5 ml asam hidroklorida 1 M dan 10 ml natrium asetat 2,5 M, encerkan dengan air sampai batas volume 500 ml, dan aduk.

Larutan uji. Pindahkan sediaan setara dengan 0,8 mg riboflavin dan encerkan dengan air sampai batas volume 100 ml, dan aduk. Pindahkan 10 ml larutan, tambahkan 5 ml asam hidroklorida 1 M dan 10 ml natrium asetat 2,5 M, encerkan dengan air sampai batas volume 500 ml, dan aduk.

Spektrofluorometer pada Em 530 nm dan Ex 440 nm. Hitung kadar riboflavin (mg/ml), dengan rumus:

$$C\left(\frac{L}{D}\right)\left(\frac{A_S}{A_{Std}}\right)$$

Keterangan:

C = konsentrasi standar niasin (mg/ml)
L = jumlah sediaan (mg/ml)
D = konsentrasi sediaan larutan uji (mg/ml)
A_S = area larutan uji
A_{Std} = area larutan standar.

Tiamin

Lakukan dengan metode kromatografi cair, menggunakan:

Pelarut, fase gerak dan sistem kromatografi. Lihat penetapan niasin.

Larutan standar. Larutkan dan encerkan standar tiamin hidroklorida dengan pelarut sampai konsentrasi 0,024 mg/ml.

Larutan uji. Larutkan dan encerkan sediaan dengan pelarut sampai konsentrasi tiamin hidroklorida 0,024 mg/ml.

Injek. 5 µl larutan standar dan larutan uji.

Hitung kadar tiamin hidroklorida (mg/ml) sediaan menggunakan rumus:

$$C\left(\frac{L}{D}\right)\left(\frac{A_S}{A_{Std}}\right)$$

Keterangan:

C = konsentrasi standar niasin (mg/ml)
L = jumlah sediaan (mg/ml)
D = konsentrasi sediaan larutan uji (mg/ml)
A_S = area larutan uji
A_{Std} = area larutan standar.

Kalsium, kromium, tembaga, fluorin, iodium, besi, magnesium, mangan, molibdenum, fosfor, kalium, selenium dan seng

Lakukan dengan metode seperti yang tertera pada vitamin larut lemak, air dan mineral tablet.

Penyimpanan

Disimpan dalam wadah tertutup rapat dan terlindung dari cahaya.

Penandaan

Harus tertera: 1) Komposisi. 2) Jenis sediaan. 3) Indikasi. 4) Waktu kadaluwarsa. 5) Kondisi penyimpanan.

Vitamin Larut Air, Lemak dan Mineral Kapsul

Definisi

Vitamin larut air, lemak dan mineral dalam sediaan kapsul mengandung dua atau lebih vitamin larut lemak yaitu: Vitamin A, vitamin D sebagai ergokalsiferol (vitamin D_2) atau kolekalsiferol (vitamin D_3), vitamin E, fitonadion (vitamin K_1), β-karotin; dan satu atau lebih vitamin yang dapat larut dalam air yaitu: asam askorbat atau setara dengan kalsium askorbat atau natrium askorbat, biotin, sianokobalamin, asam folat, niasin atau niasinamid, asam pantotenik (sebagai kalsium pantotenat atau rasemik kalsium pantotenat), piridoksin hidroklorida, riboflavin, dan tiamin hidroklorida atau tiamin mononitrat; dan satu atau lebih mineral dilengkapi dengan satu atau lebih unsur-unsur berikut dalam ionisasi: kalsium, kromium, tembaga, fluorin, iodium, besi, magnesium, mangan, molibdenum, fosfor, kalium, selenium, dan seng serta dapat mengandung zat lain yang tertera dalam etiket dengan jumlah yang akurat.

Kapsul memenuhi persyaratan yang dinyatakan untuk sediaan kapsul dan persyaratan berikut:

Mengandung tidak kurang dari 80,0% dari jumlah yang tertera pada etiket untuk vitamin A ($C_{20}H_{30}O$) sebagai retinol atau ester retinol dalam bentuk retinil asetat ($C_{22}H_{32}O_2$) atau retinil palmitat ($C_{36}H_{60}O_2$), vitamin D sebagai kolekalsiferol ($C_{27}H_{44}O$) atau ergokalsiferol ($C_{28}H_{44}O$), vitamin E sebagai α-tokoferol ($C_{29}H_{50}O_2$) atau α-tokoferil asetat ($C_{31}H_{52}O_3$) atau α-tokoferil suksinat ($C_{33}H_{54}O_5$), fitonadion ($C_{31}H_{46}O_2$), dan β-karotin ($C_{40}H_{56}$); tidak kurang 80,0% dari jumlah yang tertera dalam etiket untuk asam askorbat ($C_6H_8O_6$) atau garamnya sebagai kalsium askorbat ($C_{12}H_{14}CaO_{12}\cdot 2H_2O$) atau natrium askorbat ($C_6H_7NaO_6$), biotin ($ClOH_{16}N_2O_3S$), sianokobalamin ($C_{63}H_{88}CoN_{14}O_{14}P$), asam folat ($C_{19}H_{19}N_7O_6$), niasin ($C_6H_5NO_2$), atau niasinamid ($C_6H_6N_2O$), kalsium pantotenat ($C_{18}H_{32}CaN_2O_{10}$), piridoksin hidroklorida ($C_8H_{11}NO_3\cdot HCl$), riboflavin ($C_{17}H_{20}N_4O_6$), dan tiamin ($C_{12}H_{17}ClN_4OS$) sebagai tiamin hidroklorida atau tiamin mononitrat; kalsium (Ca), tembaga (Cu), besi (Fe), magnesium (Mg), mangan (Mn), fosfor (P), kalium (K), dan seng (Zn); kromium (Cr), fluorin (F), iodium (I), molibdenum (Mo), dan selenium (Se).

Identifikasi

Lakukan dengan cara seperti yang tertera pada penetapan kadar.

Keseragaman bobot dan isi. Memenuhi persyaratan uji keseragaman bobot dan isi.

Penetapan kadar

Vitamin A (retinol)

Lakukan dengan salah satu metode dibawah beriku:

1. Lakukan dengan kromatografi cair, menggunakan:

   Asam sulfat – metanol 3 M. Tambah dengan hati-hati 9 ml asam sulfat ke dalam 80 ml metanol dalam labu -100 ml. Dinginkan, dan encerkan dengan metanol sampai batas volume 100 ml dan aduk.

   Natrium askorbat-pirogallol. Pada 10 g natrium askorbat dan 5 g pirogallol, tambah air sampai larut. Tambah 1,7 ml asam sulfat, encerkan dengan air sampai batas volume 100 ml.

   Lesitin. Larutkan dan encerkan 0,5 g lesitin dengan 2,2,4-trimetilpentan sampai batas volume 100 ml dan aduk.

   Fase gerak. Campuran n-heksan dan etil asetat (99,7:0,3).

   Larutan standar. Larutkan dan encerkan standar vitamin A (retinil asetat) dalam 2,2,4-trimetilpentan sampai konsentrasi 15 µg/ml.

   Larutan kesesuaian sistem. Larutkan sediaan retinil palmitat dalam 2,2,4-trimetilpentan sampai konsentrasi 15 µg/ml. Campur larutan dengan larutan standar sampai masing-masing konsentrasi 7,5 µg retinil asetat/ml dan 7,5 µg retinil palmitat/ml.

   Larutan uji. Pada sediaan setara dengan 30 µg kolekalkiferol atau ergokalkiferol atau setara dengan 90 mg vitamin E (sebagai α-tokoferol, α-tokoferil asetat, atau α-tokoferil hemisuksinat) atau setara dengan 2,5 mg retinil asetat atau retinil palmitat. Tambah 0,5 g natrium bikarbonat, 1,5 ml lesitin, dan 12,5 ml 2,2,4-trimetilpentan, aduk. Tambah 6 ml larutan natrium askorbat-pirogallol, aduk, dan biarkan larutan sampai gas keluar. Lanjutkan pengadukan sampai evolusi gas habis, aduk kembali selama 12 menit. Tambahkan 6 ml dimetilsulfoksid, aduk sampai terbentuk suspensi, dan aduk selama 12 menit. Tambahkan 6 ml larutan asam sulfat-metanol 3 M, campur sampai terbentuk suspensi, dan aduk selama 12 menit. Tambahkan 12,5 ml 2,2,4-trimetilpentan, aduk sampai terbentuk suspensi, dan kocok selama 10 menit. Sentrifus selama 10 menit untuk memecahkan emulsi dan supernatan menjadi jernih. [supernatan untuk penetapan kadar vitamin A, D dan E]. Jika diperlukan, larutkan supernatan dengan 2,2,4-trimetilpentan sampai diperoleh konsentrasi setara dengan larutan standar.

   Detektor. Spektrofotometer pada panjang gelombang 325-nm.

   Kolom. Polimer vinil, 5 µm, ukuran 25 cm x 4,6 mm, atau yang sesuai.

   Laju alir. 1,5 m per menit.

   Kesesuaian sistem. Resolusi, antara retinil asetat dan retinil palmitat tidak kurang dari 8,0; dan simpangan baku relatif tidak lebih dari 3%.

   Injek 40 µL larutan standar dan larutan uji dan ukur area puncak untuk retinil asetat yang diperoleh dari larutan standar dan area puncak untuk retinil asetat atau retinil palmitat yang diperoleh dari larutan uji. Hitung kadar (mg) dari vitamin A, sebagai retinol dengan rumus:

$$26{,}5\ ECD\left(\frac{A_S}{A_{Std}}\right)$$

   Keterangan:

   E = faktor konversi untuk retinil asetat dari vitamin A

   0,872 = faktor

   C = konsentrasi vitamin A standar (mg/ml)

   D = faktor pelarut (ml), digunakan untuk persiapan larutan uji dari supernatant

   A_S = area puncak all-trans retinil ester diperoleh dari larutan uji

   A_{Std} = area puncak all-trans retinil ester diperoleh dari standar.

2. Lakukan dengan kromatografi cair menggunakan:

   Larutan pengekstrak. Campur n-heksan dan metilen klorida (3:1).

   Kalium hidroksida. Larutkan 80 g kalium hidroksida dalam 100 ml air, aduk, dan dinginkan.

   Larutan pengencer. Larutkan 1 g pirogallol dalam alkohol sampai batas volume volume 100,0 ml dan aduk.

   Fase gerak. Campuran n-heksan dan isopropil-alkohol (92 : 8). Jika diperlukan lakukan penyesuaian (lihat kesesuaian sistem kromatografi).

   Larutan stok standar. Larutkan sediaan vitamin A dalam larutan pengencer sampai konsentrasi 30 µg/ml. Larutan disimpan dalam lemari pendingin selama 1 minggu.

   Larutan standar. Encerkan larutan stok standar dengan larutan pengencer sampai konsentrasi 1 µg/ml vitamin A. Pada 10 ml larutan, tambah 5 m air, 5 ml larutan pengencer dan 3 ml larutan kalium hidroksida. Aduk selama 15 menit di atas penangas air dengan suhu 6°±5°C, dan dinginkan dalam suhu ruang. Tambah 7 ml air dan 25 ml larutan pengekstrak. Aduk selama 60 detik. Bilas labu dengan 60 ml air, biarkan selama 10 menit sampai lapisan terpisah. Larutan standar mengandung 0,34 µg/ml retinol.

   Larutan uji. Pada sediaan setara dengan 1,5 mg retinil asetat, tambah 5 ml air, 15 ml larutan pengencer dan 3 ml larutan kalium hidroksida. Aduk selama 15 menit di atas penangas air dengan suhu 6° ± 5°C dan dinginkan pada suhu ruang. Tambah 7 ml air dan 25 ml larutan pengekstrak. Aduk selama 60 detik atau lebih. Bilas labu dengan 60 ml air, dan biarkan selama 10 menit sampai lapisan terpisah (jangan dikocok, saat emulsi terbentuk). Encerkan sebagian lapisan organik dengan larutan pengekstrak sampai konsentrasi 0,34 µg/ml (retinol).

   Kolom. Silika gel, 5 µm, ukuran 8,0 cm x 6,2 mm, atau yang sesuai dengan suhu 40°C.

   Laju alir. 4 ml/menit.

   Detektor. Spektrofotometer pada panjang gelombang 335 nm.

   Injek 50 µl larutan standar dan larutan uji ke dalam

kromatograf. Hitung kadar (mg), dari vitamin A, sebagai retinol dengan rumus:

$$0{,}872\ CD\left(\frac{A_S}{A_{Std}}\right)$$

Keterangan:

0,872 = faktor konversi untuk retinil asetat, dari standar vitamin A

C = konsentrasi vitamin A standar (mg/ml)

D = faktor pelarut (ml), digunakan untuk larutan uji

A_S = jumlah area puncak all-trans retinol dan 13-cis retinol yang dari larutan uji

A_{Std} = area puncak all-trans retinil asetat yang diperoleh dari larutan standar.

Vitamin D (kolekalsiferol atau ergokalsiferol)

Lakukan penetapan kadar dengan salah satu metode berikut:

1. Lakukan dengan metode kromatografi cair, menggunakan:

   Fase gerak. Campuran n-heksan dan isopropil-alkohol (99 : 1). Jika diperlukan buat penyesuaian (lihat kesesuaian sistem kromatografi).

   Larutan standar. Larutkan standar kolekalsiferol atau ergokalsiferol dalam n-heksan sampai konsentrasi 2 µg/ml.

   Larutan kesesuaian sistem. Panaskan larutan standar dengan suhu 60° selama 1 jam untuk mendapatkan isomer vitamin D (kolekalsiferol atau ergokalsiferol) sebagai prekursor.

   Larutan uji. Uapkan 20 ml larutan, yang diperoleh pada penetapan kadar vitamin A (metode 1) sampai konsentrasi 2 µg/ml (kolekalsiferol atau ergokalsiferol).

   Kolom. Aminopropilsilil 10 µm, ukuran 15 cm x 4,6 mm.

   Laju alir. 1 ml/menit.

   Detektor. Spektrofotometer pada panjang gelombang 265 nm.

   Kesesuaian sistem. Resolusi antara vitamin D yang terbentuk dan prekursor tidak kurang dari 10; dan simpangan baku relatif tidak lebih dari 3%.

   Injek. 100 µl larutan standar dan larutan uji.

   Hitung kadar (µg) dari kolekalsiferol atau ergokalsiferol dengan rumus:

$$1{,}09\ CD\left(\frac{A_S}{A_{Std}}\right)$$

   Keterangan:

   1,09 = faktor koreksi untuk menghitung jumlah previtamin D yang ada dalam sediaan

   C = konsentrasi kolekalkiferol dan ergokalkiferol pada larutan standar (µg/ml)

   D = faktor pelarut (ml) untuk larutan uji

   A_S = area puncak larutan uji

   A_{Std} = area puncak larutan standar.

2. Lakukan dengan metode kromatografi cair, menggunakan:

   Asam sulfat–metanol 3 M. Tambah dengan hati-hati 9 ml asam sulfat dalam 80 ml metanol. Dinginkan, dan encerkan dengan metanol sampai batas volume 100 ml dan aduk.

   Natrium askorbat-pirogallol. Pada 10 g natrium askorbat dan 5 g pirogallol, tambah air sampai larut. Tambah 1,7 ml asam sulfat, encerkan dengan air sampai batas volume 100 ml.

   Lesitin. Larutkan dan encerkan 0,5 g lesitin dengan 2,2,4-trimetilpentan sampai batas volume 100 ml dan aduk.

   Fase gerak. Campur n-heksan dan butanol (98,75: 1,25). Jika diperlukan buat penyesuaian (lihat kesesuaian sistem (kromatografi)).

   Larutan standar. Larutkan dan encerkan standar kolekalsiferol atau standar ergokalsiferol dalam 2,2,4-trimetilpentan sampai konsentrasi 1 µg/ml.

   Larutan kesesuaian sistem. Panaskan larutan standar pada suhu 60° selama 1 jam untuk mendapatkan isomer vitamin D (kolekalsiferol atau ergokalsiferol) sebagai prekursor.

   Kolom. Polimer vinil gel, 5-µm, ukuran 25 cm x 4,6 mm, atau yang sesuai.

   Laju alir. 1 ml/menit.

   Kesesuaian sistem. Resolusi antara vitamin D yang terbentuk dan prekursor tidak kurang dari 10; dan simpangan baku relatif tidak lebih dari 3%.

   Injek. 100 µl larutan standar dan larutan uji.

   Hitung kadar (µg) dari kolekalsiferol atau ergokalsiferol dengan rumus:

$$26{,}5\ C\left(\frac{A_S}{A_{Std}}\right)$$

   Keterangan:

   C = konsentrasi kolekalsiferol atau ergokalsiferol larutan standar (µg/ml)

   A_S = area puncak larutan uji

   A_{Std} = area puncak larutan standar.

3. Lakukan dengan kromatografi cair, menggunakan:

   Asam asetat encer. Encerkan 10 ml asam asetat glasial dengan air sampai batas volume 100,0 ml.

   Larutan fenolftalein. Fenolftalein (1 g per 100 ml alkohol).

   Larutan kalium hidroksida-alkohol. Larutkan 14 g kalium hidroksida dalam campuran 31 ml alkohol anhidrat dan 5 ml air. Larutan harus segar.

   Larutan pengekstrak. Campuran metilen klorida dan isopropil alkohol (99,8:0,2).

   Fase gerak. Cambur asetonitril dan metanol (91:9). Jika diperlukan, buat penyesuaian (lihat kesesuaian sistem kromatografi).

   Larutan stok standar. Larutkan kolekalsiferol atau ergokalsiferol dalam alkohol anhidrat sampai

konsentrasi 0,2 mg/ml. Simpan dalam lemari pendingin.

Larutan standar. [Kondisikan kolom ekstraksi fasa-padat dengan cara bilas kolom dengan 4 ml campuran metilen klorida dan isopropil alkohol (80 : 20), kemudian dengan 5 ml larutan pengekstrak. Jangan biarkan kolom kering]. Encerkan larutan stok standar dengan alkohol anhidrat sampai konsentrasi 5 µg/ml. Pada 2 ml larutan, tambah 15 ml air dan 15 ml larutan kalium hidroksida-alkohol, sumbat, aduk selama 30 menit dalam penangas air 60°C. Dinginkan pada suhu ruang dan pindahkan ke dalam labu pisah-250 ml. Tambah 15 ml air, aduk dan pindahkan larutan ke dalam labu pisah kedua, tambah 60 ml n-heksan dan aduk selama 15 menit. Buang lapisan air. Pada fase heksan, tambah 1 tetes fenolftalein, 15 ml air, dan asam asetat encer perlahan-lahan sampai netral. Biarkan selama 10 menit sampai lapisan terpisah dan buang lapisan air. Saring fase heksan dengan natrium sulfat anhidrat ke dalam botol 100 ml. Bilas penyaring dengan n-heksan dan campur hasil bilasan dalam botol yang sama. Uapkan fase heksan dengan rotavapor pada suhu 50°C sampai kering. Larutkan residu dengan 2 ml larutan pengekstrak dan alirkan ke dalam kolom silika ekstraksi fasa-padat (*solid phase extraction silica*). Elusi kolom dengan 10 ml larutan pengekstrak dan buang 1 ml eluat pertama, kemudian tampung eluat berikutnya. Hangatkan di atas penangas air pada suhu 42°C dan uapkan dengan aliran nitrogen. Larutkan residu dengan 2 ml asetonitril.

Larutan uji. Pada sediaan setara dengan 10 µg kolekalsiferol atau ergokalsiferol, lakukan dengan cara yang sama seperti larutan standar, dimulai dengan *".....menambahkan 15 ml air dan 15 ml larutan kalium hidroksida-alkohol ....."*.

Kolom. Oktadesilsilil 5 µm, ukuran 25 cm x 4,6 mm atau yang sesuai, suhu kolom 27°C.

Laju alir. 0,7 ml/menit.

Detektor. Spektrofotometer pada panjang gelombang 265 nm.

Kesesuaian sistem. Resolusi antara vitamin D yang terbentuk dan prekursor tidak kurang dari 10. dan simpangan baku relatif untuk tidak lebih dari 4%.

Injek 15 µl larutan standar dan larutan uji. Hitung kadar (µg) dari kolekalsiferol atau ergokalsiferol dengan rumus:

$$1{,}09\ (2C)\left(\frac{A_S}{A_{Std}}\right)$$

Keterangan:

1,09 = faktor-koreksi untuk menghitung jumlah previtamin D

C = konsentrasi larutan standar (µg/ml)

A_S = area puncak larutan uji

A_{Std} = area puncak larutan standar.

Vitamin E (α-tokoferol, α-tokoferil asetat, atau α-tokoferil suksinat)

Lakukan penetapan kadar dengan salah satu metode berikut:

1. Lakukan dengan metode kromatografi cair, menggunakan:

   Fase gerak. Encerkan 10 ml asam fosfat dengan air sampai batas volume 1000 ml (larutan A). Campur metanol dan larutan A (95:5). Jika diperlukan buat penyesuaian (lihat kesesuaian sistem kromatografi).

   Larutan standar. Larutkan sediaan α-tokoferol, α-tokoferil asetat, atau α-tokoferil suksinat dalam metanol sampai kosenstrasi 2 mg/ml.

   Larutan kesesuaian sistem. Larutkan standar ergokalsiferol dalam metanol sampai konsentrasi 0,65 mg/ml. Pindahkan 1 ml larutan ke dalam labu yang mengandung 100 mg α-tokoferil asetat. Larutkan dengan 30 ml metanol dan aduk. Simpan dalam lemari pendingin.

   Larutan uji. Uapkan 20 ml larutan (yang diperoleh pada penetapan vitamin A, metode 1) pada suhu ruang dengan vakum sampai kering. Larutkan dan encerkan residu dengan metanol sampai konsentrasi 2 mg/ml.

   Kolom. Oktedesilsilil 5 µm, 10 cm x 8 mm.

   Laju alir. 2 ml/menit.

   Detektor. Spektrofotometer pada panjang gelombang 254 nm.

   Kesesuian sistem. Waktu tambat relatif 0,5 untuk ergokalsiferol dan 1,0 untuk α-tokoferil asetat; resolusi antara ergokalsiferol dan α-tokoferil asetat tidak kurang dari 12; dan faktor tailing antara 0,8 dan 1,2. Simpangan baku relatif tidak lebih dari 3%.

   Injeks 100 µl larutan standar dan larutan uji. Hitung kadar (µg) dengan rumus:

   $$CD\left(\frac{A_S}{A_{Std}}\right)$$

   Keterangan:

   C = konsentrasi standar (mg/ml)

   D = faktor pelarut (ml) untuk larutan uji

   A_S = area puncak larutan uji

   A_{Std} = area puncak larutan standar.

2. Lakukan dengan metode kromatografi cair, menggunakan:

   Fase gerak. Campur 240 ml metanol, 10 ml air, 0,5 ml asam fosfat 50%, encerkan dengan asetonitril sampai batas volume 1000 ml, aduk dan saring. Jika diperlukan buat penyesuaian (lihat kesesuaian sistem kromatografi).

   Larutan kesesuaian sistem. Larutkan dan encerkan sediaan α-tokoferol, α-tokoferil asetat, dan α-tokoferil suksinat dalam metanol sampai konsentrasi 2 mg/ml.

   Larutan standar. Larutan dan encerkan standar α-tokoferol, α-tokoferil asetat, atau α-tokoferil suk-

sinat dalam metanol sampai konsentrasi 2 mg/ml.

Larutan uji. Lakukan seperti dalam penetapan vitamin A, metoda 2. Pindahkan supernatant 2,2,4-trimetilpentan ke dalam labu sampai konsentrasi setara dengan larutan standar. Uapkan sampai kering, tambah metanol, dan uapkan sisa 2,2,4-trimetilpentan. Encerkan dengan metanol dan aduk.

Kolom. Oktadesilsilil 5 µm, 25 cm x 4,6 mm atau yang sesuai.

Laju alir. 1,5 ml/menit.

Detektor. Spektrofotometer pada panjang gelombang 280 nm.

Kesesuaian sistem. Waktu tambat relatif 0,6 untuk α-tokoferil suksinat, 0,8 untuk α-tokoferol, dan 1,0 untuk α-tokoferil asetat, berturut-turut; resolusi antara α-tokoferil suksinat dan α-tokoferol tidak kurang dari 4,0; dan resolusi antara α-tokoferol serta α-tokoferil asetat tidak kurang dari 3,0. Simpangan baku relatif tidak lebih dari 3%.

Injek 25 µl larutan standar dan larutan uji. Hitung kadar (µg) dengan rumus:

$$26{,}5\ CD\left(\frac{A_S}{A_{Std}}\right)$$

Keterangan :

C = konsentrasi standar (mg/ml)

D = faktor pelarut sebagai pengganti pelarut 2,2,4-trimetilpentan menjadi metanol

A_S = area puncak larutan uji

A_{Std} = area puncak larutan standar

[Ekstraksi awal pada 26,5 ml 2,2,4-trimetilpentan telah dibukukan dalam rumus] Hitung α-tokoferol setara dengan α-tokoferil asetat atau α-tokoferil suksinat dengan cara mengalikan jumlah (mg), oleh faktor 0,91 atau 0,81.

3. Lakukan dengan metode kromatografi cair, menggunakan:

Pelarut. Campuran asetonitril dan etil asetat (1:1).

Fase gerak. Campuran metanol, asetonitril, dan n-heksan (46,5:46,5:7,0). Jika diperlukan buat penyesuaian (lihat kesesuaian sistem kromatografi).

Larutan standar. Larutan dan encerkan standar α-tokoferol, α-tokoferil asetat, atau α-tokoferil suksinat dalam metanol sampai konsentrasi 0,3 mg/ml.

Larutan uji. Sediaan setara dengan 8 mg α-tokoferol, ke dalam labu-125 ml. Tambah 25 ml air, 25 ml alkohol dehidrat dan 3,5 g kalium hidroksida. Aduk selama 1 jam dalam penangas air 55°C, dinginkan, dan pindahkan dengan bantuan 50 ml n-heksan ke dalam labu pisah-125 ml dan kocok selama 60 detik sampai lapisan terpisah. Pindahkan lapisan air ke dalam labu pisah-250 ml kedua, dan ulangi ekstraksi dengan 50 ml n-heksan. Buang lapisan air dan gabungkan ekstrak heksan. Bilas ekstraksi dengan 25 ml air sampai lapisan terpisah, dan buang lapisan air. Tambah 3 tetes asam asetat glasial dan ulangi prosedur pembilasan sebanyak 2 kali. Saring hasil bilasan lapisan heksan dengan natrium sulfat anhidrat ke dalam botol-250 ml. Bilas corong dan natrium sulfat dengan n-heksan dan tambah hasil bilasan ke dalam larutan heksan dalam botol. Uapkan larutan heksan dalam penangas air pada suhu 50°C sampai kering. Segera tambah 25,0 ml pelarut dan aduk sampai residu larut.

Kolom. Oktadesilsilil, ukuran 25 cm x 4,6 mm atau yang sesuai, suhu 40°C.

Laju alir. 3 ml/menit.

Detektor. Spektrofotometer pada panjang gelombang 291 nm.

Simpangan baku relatif. Tidak lebih dari 5%.

Injek. 20 µl larutan standar dan larutan uji.

Hitung kadar (µg) dengan rumus:

$$25\ C\left(\frac{A_S}{A_{Std}}\right)$$

Keterangan :

C = konsentrasi standar (mg/ml)

A_S = area puncak larutan uji

A_{Std} = area puncak larutan standar

Vitamin K_1 (fitonadion)

Lakukan penetapan kadar dengan salah satu metode berikut:

1. Lakukan dengan metode kromatografi cair, menggunakan:

Fase gerak. Campuran metanol dan air (95:5). Jika diperlukan buat penyesuaian (lihat kesesuaian sistem kromatografi).

Larutan stok standar. Larutkan dan encerkan sediaan dalam metanol sampai konentrasi 200 µg/ml (fitomenadion), jika perlu dengan bantuan sonikasi.

Larutan standar. Encerkan 10 ml larutan stok standar dengan metanol sampai batas volume 100 ml dan aduk.

Larutan kesesuaian sistem. Larutkan 65 mg α-tokoferil asetat dengan 75 ml metanol, tambah 10 ml larutan stok standar, encerkan dengan metanol sampai batas volume 100 ml.

Larutan uji. Uapkan 20 ml larutan (yang diperoleh pada penetapan vitamin A, metode 1), pada suhu ruang dengan vakum sampai mendekati kering. Larutkan dan encerkan residu dengan metanol sampai konsentrasi fitomenadion 20 µg/ml.

Kolom. Oktadesilsilil 5 µm, ukuran 10 cm x 8 mm.

Detektor. Spektrofotometer pada panjang gelombang 254 nm.

Kesesuaian sistem. Resolusi antara α-tokoferil asetat dan fitonadion tidak kurang dari 5. Waktu retensi relatif 0,68 untuk α-tokoferil asetat dan 1,0 untuk fitonadion dan simpangan baku relatif tidak lebih dari 3%.

Injek 100 µl larutan standar dan larutan uji.

Hitung kadar (µg) dengan rumus:

$$C\,(LD)\left(\frac{A_S}{A_{Std}}\right)$$

Keterangan :

C = konsentrasi standar sediaan (µg/ml)
L = jumlah fitomenadion pada sediaan (µg)
D = konsentrasi fitomennadion dalam larutan uji (µg/ml)
A_S = area puncak larutan uji
A_{Std} = area puncak larutan standar.

2. Lakukan dengan metode kromatografi cair, menggunakan:

Pelarut. Campuran metanol dan isopropanol (95:5).

Fase gerak. Campuran 800 ml metanol, 200 ml metilen klorida, 0,1 ml asam asetat glasial, 1,36 g seng klorida, dan 0,41 g natrium asetat.

Larutan standar internal. Larutan menakuinon 4 (vitamin K_2) dalam pelarut sampai konsentrasi 5 µg/ml. [Stok larutan menakuinon 4 (100 µg/ml) dapat disimpan selama 2 bulan dalam lemari pendingin].

Larutan stok standar. Larutkan sediaan fitonadion dalam metilen klorida dengan bantuan sonikasi. Encerkan dengan pelarut sampai konsentrasi 5 µg/ml.

Larutan standar. Encerkan 1 ml larutan stok standar dan 1 ml larutan standar internal dengan pelarut sampai volume 5,0 ml dan aduk. Saring dengan membran 0,45 µm atau yang sesuai.

Larutan uji. Pada sediaan setara dengan 50 µg fitonadion, tambah 4 ml air, sumbat, dan aduk. Tempatkan tabung dalam penangas air pada suhu 60°C selama 5 menit. Buang rendaman dan aduk selama 1 menit biarkan larutan tetap panas. Tambah 8 ml alkohol dan aduk. Tempatkan tabung dalam penangas air pada suhu 60°C selama 5 menit. Buang rendaman, dan aduk selama 2 menit biarkan larutan tetap panas. Dinginkan pada suhu ruang. Encerkan dengan larutan standar internal setara dengan 5 µg/ml fitonadion. Tambah 20 ml petroleum benzin dan sumbat. Aduk selama 15 menit. Sentrifus untuk memisahkan kedua lapisan. Pindahkan lapisan atas dari petroleum benzin setara dengan 5—50 µg fitonadion ke dalam labu. Uapkan tabung dalam penangas air pada suhu 35°—45°C dengan aliran nitrogen sampai lemak residu hilang. Larutkan residu dalam pelarut sampai konsentrasi 1 µg/ml fitomenanadion.

Kolom. Oktadesilsilil 5 µm, ukuran 25 cm x 4,6 mm atau yang sesuai.

Pasca kolom. Serbuk seng, ukuran 3 cm x 4,6 mm atau yang sesuai. [Siapkan reaktor paska kolom jika diperlukan atur kesesuaian sistem.]

Laju alir. 1 ml/menit.

Detektor. Fluorometer pada panjang Ex. 320 nm untuk Em. 420 nm.

Kesesuaian sistem. Waktu tambat relatif 1,0 untuk standar internal dan 1,4 untuk fitonadion; efisiensi kolom untuk puncak fitonadion tidak kurang dari 2500 plat teoritis; faktor tailing untuk puncak fitonadion tidak lebih dari 1,5; dan simpangan baku relatif tidak lebih dari 3%.

Injek 25 µl larutan standar dan larutan uji.

Hitung kadar (µg) dengan rumus:

$$SCD\left(\frac{A_S}{A_{Std}}\right)$$

Keterangan:

C = konsentrasi standar (µg/ml)
D = volume larutan standar internal yang digunakan untuk larutan uji (ml)
A_S = area puncak larutan uji
A_{Std} = area puncak larutan standar

β-Karoten

Lakukan dengan metode spektrofotometer, menggunakan:

Larutan kalium hidroksida. Larutkan 58,8 g kalium hidroksida dalam air sampai batas volume 50 ml.

Larutan iodium. Larutkan 10 mg iodium dengan sikloheksan dan aduk. Encerkan 10 ml larutan dengan sikloheksan sampai batas volume 100 ml dan aduk. Larutan harus segar.

Larutan uji. Pada sediaan setara dengan 2 mg β-karoten, tambah 100 ml alkohol, 6 ml larutan kalium hidroksida dan aduk. Panaskan dengan refluks kondensor selama 45 menit. Dinginkan pada suhu ruang, tambah 170 ml larutan heksan dan aduk selama 30 menit. Biarkan selama 10 menit. Pindahkan lapisan organik ke dalam labu 500 ml. Pada lapisan air, tambah 170 ml heksan dan aduk selama 20 menit. Biarkan selama 10 menit. Buang lapisan air dan campur lapisan organik. Pada fase organik, tambah 3 g natrium sulfat anhidrat dan aduk. Pindahkan larutan setara dengan 100 µg β-karoten ke dalam labu -50 ml. Uapkan dengan aliran nitrogen sampai kering dan segera tambah sikloheksan. Tambah 2 ml larutan iodium dan panaskan selama 15 menit dalam penangas air pada suhu 65°C. Dinginkan dan encerkan dengan sikloheksan, aduk. Ukur serapan pada panjang gelombang maksimum 452 nm. Hitung kadar (mg) dengan rumus:

$$LD\left(\frac{A_S}{223}\right)$$

Keterangan:

L = jumlah β-karoten pada sediaan (mg)
D = konsentrasi β-karoten pada larutan uji (mg/ml)
A_S = serapan larutan uji
223 = serapan β-karoten pada panjang gelombang 452 nm

Asam askorbat, kalsium askorbat dan natrium askorbat

Pada sediaan setara dengan 100 mg asam askorba, tambah 75 ml asam metafosfat asetat. Sumbat dan aduk selama 30 menit. Encerkan dengan air dan aduk. Sentrifus sampai supernatan. Pada 4 ml larutan, tambah 5 ml asam metafosfat-asetat dan titrasi dengan larutan standar diklorofenol-indofenol sampai warna merah muda tetap selama 5 detik. Standarisasi larutan diklorofenol-indofenol dengan campuran 5,5 ml asam metafosfat- asetat dan 15 ml air.

Vitamin H (biotin)

Lakukan penetapan kadar dengan salah satu metode berikut:

1. Lakukan dengan metode kromatografi cair, menggunakan:

   Larutan uji. Larutkan sediaan setara dengan 1 mg biotin dalam 3 ml dimetil sulfoksid, hangatkan di atas penagas air pada suhu 60°—70°C selama 5 menit. Sonikasi selama 5 menit dan encerkan dengan air sampai batas volume 200 ml.

   Larutan standar. Larutkan dan encerkan 67 mg standar biotin dalam dimetilsulfoksid sampai batas volume 200 ml. Encerkan larutan dengan air sampai konsentrasi 5 µg/ml.

   Kolom. Oktilsilil, 3-µm ukuran 15 cm x 4,6 mm, atau yang sesuai.

   Fase gerak. Campur 85 ml asetonitril, 1 g natrium perklorat, dan 1 ml asam fosfat, encerkan dengan air sampai batas volume 1000 ml, aduk, saring. Jika perlu buat penyesuaian (lihat kesesuaian sistem kromatografi).

   Laju alir. 1,2 ml/menit

   Detektor. Spektrofotometer pada panjang gelombang 200 nm.

   Sistem kromatografik. Simpangan baku relatif tidak lebih dari 3%.

   Injek 100 µl larutan standar dan larutan uji.

   Hitung kadar (µg) dengan rumus:

   $$200\ C \left(\frac{A_S}{A_{Std}}\right)$$

   Keterangan :

   C = konsentrasi biotin pada larutan standar (µg/ml)

   A_S = area puncak larutan uji

   A_{Std} = area puncak larutan standar.

2. Lakukan dengan metode mikrobiologi menggunakan:

   Larutan stok standar. Larutkan dan encerkan standar biotin dalam alkohol 50% sampai konsentrasi 50 µg/ml dan aduk. Simpan larutan dalam lemari pendingin.

   Larutan standar. Encerkan stok standar dengan air sampai konsentrasi 0,1 ng/ml.

   Larutan uji. Pada sediaan setara dengan 100 µg biotin, tambah 3 ml alkohol 50%, dan aduk. Panaskan dalam penangas air pada suhu 70°C selama 5 menit. Sonikasi selama 5 menit, encerkan dengan alkohol 50% sampai batas volume 200 ml dan saring. Encerkan larutan dengan air sampai konsentrasi 0,1 ng/ml.

   Larutan asam-kasein hidrolisat. Campurkan 100 g vitamin bebas kasein dengan 500 ml asam hidroklorida 6 M dan refluks selama 8—12 jam. Suling dengan pengurangan tekanan (untuk menghilangkan asam hidroklorida) sampai terbentuk pasta. Larutkan pasta dalam air, atur pH 3,5 ± 0,1 dengan natrium hidroksida 1 M dan tambah air sampai batas volume 1000 ml. Tambah 20 g arang aktif, aduk selama 1 jam dan saring ke dalam botol. Ulangi proses dengan arang aktif. Simpan botol dalam toluen pada suhu tidak lebih dari 10°C.

   Larutan sistin-triptofan. Suspensikan 4,0 g L-sistin dalam 1,0 g L-triptofan (atau 2,0 g D,L-triptofan) dalam 700 ml air, panaskan pada suhu 70°— 80°C, dan tambah secara perlahan larutan asam hidroklorida (1 dalam 2), aduk. Dinginkan dan encerkan dengan air sampai batas volume 1000 ml. Simpan botol dalam toluen pada suhu tidak lebih dari 10°C.

   Larutan urasil-guanin-adenin. Larutkan 200 mg adenin sulfat, guanin hidroklorida, dan urasil dalam 10 ml asam hidroklorida 4 M sambil dipanaskan, dinginkan, dan tambah air sampai batas volume 200 ml. Simpan dalam lemari pendingin.

   Larutan polisorbat 80. Larutkan dan encerkan 25 g polisorbat 80 dalam alkohol sampai batas volume 250 ml.

   Larutan kalsium pantotenat. Larutan kalsium pantotenat dalam alkohol 50% yang mengandung 10 µg/ml. Simpan dalam lemari pendingin.

   Larutan riboflavin-tiamin hidroklorida. Larutan riboflavin dan tiamin hidroklorida dalam asam asetat 0,02 M yang mengandung 20 µg/ml riboflavin dan 10 µg/ml tiamin hidroklorida. Simpan botol dalam toluen pada suhu tidak lebih 10°C.

   Larutan asam p-aminobenzoat-niasin-piridoksin hidroklorida. Campuran air dan alkohol netral (3:1) yang mengandung 10 µg/ml asam p-aminobenzoat, 50 µg/ml niasin dan 40 µg/ml piridoksin hidroklorida. Simpan dalam lemari pendingin.

   Larutan garam 1. Larutkan dan encerkan 25 g kalium fosfat dan 25 g dikalium fosfat dalam air sampai batas volume 500 ml. Tambah 5 tetes asam hidroklorida dan aduk. Simpan botol dalam toluen.

   Larutan garam 2. Larutkan dan encerkan 10 g magnesium sulfat, 0,5 g natrium klorida, 0,5 g besi sulfat dan 0,5 g mangan sulfat dalam air sampai batas volume 500 ml. Tambah 5 tetes asam hidroklorida dan aduk. Simpan botol dalam toluen.

   Larutan basal stok medium. Campur 25 ml larutan asam kasein hidrolisat, 25 ml larutan

sistin-triptofan, 0,25 ml larutan polisorbat 80, 10 g dekstrosa anhidrat, 5 g natrium asetat anhidrat, 5 ml larutan urasil-guanin-adenin, 5 ml larutan kalsium pantotenat, 5 ml larutan riboflavin-tiamin hidroklorida, 5 ml larutan asam p-aminobenzoat-niasin-piridoksin hidroklorida, 5 ml larutan garam (1), 5 ml larutan garam (2), atur pH 6,8 ± 0,1 dengan natrium hidroksida 1 M dan encerkan dengan air sampai batas volume 250 ml.

Stok kultur *lactobacillus plantarum*. Larutkan 2 g sari ragi dalam 100 ml air, tambah 500 mg dekstrosa anhidrat, 500 mg natrium asetat anhidrat dan 1,5 g agar. Panaskan campuran di atas penangas air dengan pengadukan sampai agar larut. Pindahkan 10 ml larutan panas pada tabung uji, sumbat, sterilkan dalam otoklaf 121°C dan biarkan tabung sampai dingin dalam posisi tegak lurus. Siapkan kultur pada tiga atau lebih tabung, gunakan kultur murni *lactobacillus plantarum*, inkubasi selama 16—24 jam pada suhu 30°—37°C dan tetap pada suhu ±0,5°C. Simpan dalam lemari pendingin. Siapkan stok kultur segar setiap minggunya dan jangan gunakan untuk inokulum jika kultur lebih dari 1 minggu.

Medium kultur. Setiap tabung uji mengandung 5 ml larutan basal stok medium, tambah 5 ml air yang mengandung 0,5 mg biotin. Sumbat dengan katun, sterilkan dengan otoklaf 121°C dan dinginkan.

Inokulum. [Suspensi beku *lactobacillus plantarum* dapat digunakan sebagai stok kultur untuk menghasilkan inokulum yang sebanding dengan kultur segar]. Pindahkan secukupnya dari stok kultur *lactobacillus plantarum* ke dalam tabung steril yang mengandung 10 ml medium kultur. Inkubasi pada suhu 30°—37°C selama 16—24 jam.

Prosedur. Siapkan enam tabung, tambah larutan standar ke setiap tabung yang berbeda masing-masing 1,0; 1,5; 2,0; 3,0; 4,0 dan 5,0 ml. Pada setiap tabung dan empat tabung kosong lain, tambah 5 ml larutan basal stok medium dan air sampai volume 10 ml. Pada empat tabung yang kosong, tambahkan larutan uji 2—3 kali larutan standar termasuk 2,0; 3,0; dan 4,0 ml. Pada setiap tabung, tambah 5 ml larutan basal stok medium dan air sampai volume 10 ml. Sumbat semua tabung, sterilkan pada otoklaf 121°C selama 5 menit. Dinginkan, tambah 1 tetes inokulum pada setiap tabung, kecuali dua dari empat tabung tidak mengandung larutan standar (blanko) dan aduk. Inkubasi pada suhu 30°—37°C selama 16—24 jam inkubasi. Dalam 2 jam pertama tidak terjadi kekeruhan dalam tabung yang mengandung standar dengan konsentrasi paling tinggi.

Ukur %T masing-masing tabung dengan spektrofotometer pada panjang gelombang 540—660 nm.

Perhitungan: Lakukan perhitungan dengan bantuan kurva konsentrasi-respon (%T) atau dengan bantuan program yang tersedia pada peralatan.

3. Lakukan dengan metode kromatografi cair, menggunakan:

Dapar. Pada 800 ml air dan 100 ml tritilamin, tambah 80 ml asam fosfat 85%, encerkan dengan air sampai batas volume 1000 ml dan aduk.

Fase gerak. Pada 80 ml asetonitril dan 10 ml dapar, encerkan dengan air sampai batas volume 1000 ml, aduk dan saring. Jika diperlukan buat penyesuaian (lihat kesesuaian sistem kromatografi).

Larutan standar. Larutkan dan encerkan 25 mg standar biotin dengan air sampai batas volume 250 ml dan aduk. Pada 1,5 ml larutan, encerkan dengan air sampai konsentrasi 0,6 µg/ml biotin. [Gunakan sebagian larutan standar untuk penentuan angka temuan kembali pada prosedur ekstraksi fasa-padat (*solid phase extraction*)].

Larutan uji. Larutkan dan encerkan sediaan setara dengan 60 µg biotin dengan air (jika perlu sonikasi selama 30—40 menit) sampai batas volume 100 ml dan saring. Atur pH 6,0—7,0 dengan asam asetat atau natrium hidroksida 0,1 M.

Ekstraksi fasa-padat (*solid-phase extraction*). Sebelum digunakan, bilas kolom dengan 2 ml metanol. Ekuilibrasi dengan 2 ml air]: Pipet masing-masing 5 ml larutan uji dan larutan standar ke dalam kolom ekstraksi fasa-padat yang berbeda (mengandung penukar ion dan fase terbalik kopolimer N-vinilpirolidon dan divinilbenzen). Bilas kolom dengan 10 ml metanol (30% v/v). Alirkan sekita 4,9 ml pada metanol (30% v/v dalam asam hidroklorida 0,1 M) ke dalam kolom. Campur eluat ke dalam labu ukur-5 ml, yang mengandung 100 µl natrium asetat (40% v/v) dan encerkan dengan metanol (30% v/v dalam asam hidroklorida 0,1 M) sampai volume 5,0 ml.

Kolom. Oktadesilsilil, ukuran 25 cm x 4,6 atau yang sesuai.

Laju alir. 2 ml/menit.

Detektor. Spektrofotometer pada panjang gelombang 200 nm.

Kesesuaian sistem. Faktor tailing tidak lebih dari 1,5; dan simpangan baku relatif tidak lebih dari 2%.

Injek 100 µl larutan standar dan larutan uji.

Hitung kadar (µg) dengan rumus:

$$100\ C \left(\frac{A_S}{A_{Std}} \right)$$

Keterangan :

C = konsentrasi biotin dalam larutan standar (µg/ml)

A_S = area puncak larutan uji

A_{Std} = area puncak larutan standar

Vitamin B_{12} (sianokobalamin)

Lakukan penetapan kadar dengan salah satu metode berikut:

1. Lakukan dengan metode kromatografi cair, menggunakan:

Fase gerak. Campuran air dan metanol (65:35).

Jika diperlukan buat penyesuaian (lihat kesesuaian sistem kromatografi).

Larutan standar. Larutkan standar sianokobalamin dalam air sampai konsentrasi 10 µg/ml. Encerkan stok larutan dengan air sampai konsentrasi 1 µg/ml.

Larutan uji. Larutkan dan encerkan sediaan setara 100 µg sianokobalamin dengan air sampai batas volume 250 ml. Saring dan gunakan hasil saringan.

Kolom. Oktadesilsilil 5 µm, ukuran 15 cm x 4,6 mm atau yang sesuai.

Laju alir. 0,5 ml/menit.

Detektor. Spektrofotometer pada panjang gelombang 550 nm.

Kesesuaian sistem. Simpangan baku relatif tidak lebih dari 3%.

Injek 200 µl larutan standar dan larutan uji.

Hitung kadar (µg) dengan rumus:

$$100\ C \left(\frac{A_S}{A_{Std}}\right)$$

Keterangan :

C = konsentrasi sianokobalamin dalam larutan standar (µg/ml)

A_S = area puncak larutan uji

A_{Std} = area puncak larutan standar

2. Lakukan dengan metode mikrobiologi menggunakan:

Larutan stok standar sianokobalamin. Larutkan standar sianokobalamin dalam alkohol 25% sampai konsentrasi 1 µg/ml. Simpan dalam lemari pendingin.

Larutan standar. Encerkan larutan stok standar sianokobalamin dengan air sampai kosentrasi 0,01 dan 0,04 ng/ml. Larutan harus segar.

Larutan uji. Pada sediaan setara dengan 1,0 µg sianokobalamin, tambah 25 ml larutan pengekstrak (yang mengandung 1,29 g natrium fosfat dibasa, 1,1 g asam sitrat anhidrat dan 1 g natrium metabisulfit dalam 100 ml), otoklaf pada suhu 121°C selama 10 menit. Saring atau sentrifus jika diperlukan. Encerkan hasil saringan atau supernatan dengan air sampai konsentrasi antara 0,01 dan 0,04 ng/ml.

Larutan asam kasein-hidrolisat. Lakukan seperti yang tertera pada penetapan kadar kalsium pantotenat, metode 2.

Larutan asparagin. Larutkan dan encerkan 2,0 g L-asparagin dalam air sampai batas volume 200 ml. Simpan botol dalam toluen pada lemari pendingin.

Larutan adenin-guanin-urasil. Lakukan seperti yang tertera pada penetapan kadar kalsium pantotenat, metode 2.

Larutan xantin. Larutkan 0,2 g xantin dalam sekitar 30 ml air, panaskan pada suhu 70°C, tambah 6 ml amonium hidroksida 6 M dan aduk sampai larut. Dinginkan dan tambah air sampai batas volume 200 ml. Simpan botol dalam toluen pada lemari pendingin.

Larutan garam 1. Larutkan dan encerkan 10 g kalium fosfat monobasa dan 10 g kalium fosfat dibasa dalam air sampai batas volume 200 ml dan tambah 2 tetes asam hidroklorida. Simpan botol dalam toluen pada lemari pendingin.

Larutan garam 2. Larutkan 4 g magnesium sulfat, 0,2 g natrium klorida, 0,2 g besi sulfat dan 0,2 g mangan sulfat dalam air sampai batas volume 200 ml dan tambah 2 tetes asam hidroklorida. Simpan botol dalam toluen pada lemari pendingin.

Larutan polisorbat 80. Larutkan dan encerkan 20 g polisorbat 80 dalam alkohol sampai batas volume 200 ml. Simpan botol dalam toluen pada lemari pendingin.

Larutan vitamin 1. Larutkan dan encerkan 10 mg riboflavin, 10 mg tiamin hidroklorida, 100 µg biotin dan 20 mg niasin dalam asam asetat glasial 0,02 M sampai volume 400 ml. Simpan botol dalam toluen pada lemari pendingin.

Larutan vitamin 2. Larutkan dan encerkan 20 mg asam p-aminobenzoat, 10 mg kalsium pantotenat, 40 mg piridoksin hidroklorida, 40 mg piridoksal hidroklorida, 8 mg piridoksamin dihidroklorida dan 2 mg asam folat dalam campuran air dan alkohol netral (3:1) sampai volume 400 ml. Simpan botol dalam toluen pada lemari pendingin.

Larutan basal stok medium. Larutkan bahan-bahan di bawah ini dalam asam hidroklorida secukupnya sampai larut. Tambah 100 ml air, aduk dan larutkan dekstrosa, natrium asetat dan asam askorbat. Saring, jika diperlukan, tambah larutan polisorbat 80. Atur pH 5,5—6,0 dengan natrium hidroksida 1 M dan tambah air murni sampai batas volume 250 ml.

Komposisi medium. Campur 0,1 g L-sistin, 0,05 g L-triptofan, 10 ml asam hidroklorida 1 M, 5 ml larutan adenine-guanin-urasil, 5 ml larutan xantin, 10 ml larutan vitamin 1, 10 ml larutan vitamin 2, 5 ml larutan garam (1), 5 ml larutan garam (2), 5 ml larutan asparagin, 25 ml larutan asam kasein-hidrolisat, 10 g dekstrosa anhidrat, 5 g natrium asetat anhidrat, 1 g asam askorbat dan 5 ml larutan polisorbat 80.

Jus tomat. Sentrifus jus tomat yang dijual secara komersial sampai kotoran hilang. Saring sampai diperoleh sampai diperoleh hasil saringan berwarna kekuning-kuningan. Simpan botol dalam toluen pada lemari pendingin.

Medium kultur. Larutkan 0,75 g sari ragi, 0,75 g pepton, 1 g dekstrosa anhidrat dan 0,2 g kalium fosfat monobasa dalam sekitar 60 ml air. Tambah 10 ml jus tomat dan 1 ml larutan polisorbat 80. Atur pH 6,8 dengan natrium hidroksida 1 M dan tambah air sampai batas volume 100 ml. Pindahkan 10 ml larutan dalam tabung uji dan sumbat dengan katun. Sterilkan dengan otoklaf pada suhu 121°C selama 15 menit. Dinginkan dengan cepat untuk menghindari perbuahan warna yang dihasilkan dari medium yang terlalu panas.

Suspensi medium. Encerkan larutan basal stok medium dengan air dengan volume yang sama. Pindahkan 10 ml medium ke dalam tabung uji. Sterilkan dengan otoklaf pada suhu 121°C selama 15 menit. Dinginkan dengan cepat untuk menghindari perbuahan warna yang dihasilkan dari medium yang terlalu panas.

Stokkultur*lactobacillusleichmannii*. Inokulasikan *lactobacillus leichmannii* ke dalam 10 ml medium kultur yang steril (mengandung 1—1,5 g agar/100 ml). Inkubasi pada suhu 30°—40°C selama 16—24 jam. Simpan dalam lemari pendingin. Gunakan stok kultur yang segar untuk penetapan kadar.

Inokulum. [Suspensi beku *lactobacillus leichmannii* atau *lactobacillus plantarum* dapat digunakan sebagai stok kultur untuk menghasilkan inokulum yang sebanding dengan kultur segar]. Pindahkan secukupnya dari stok kultur *lactobacillus leichmannii* ke dalam tabung steril yang mengandung 10 ml medium kultur. Inkubasi pada suhu 40°C selama 16—24 jam. Suspensikan biakan dalam 5 ml suspensi medium steril dan campur. Atur volume dengan garam fisiologis sehingga campuran 1 berbanding 20 mempunyai nilai %T = 70% pada panjang gelombang 530 nm, larutan garam fisiologis sebagai blanko. Encerkan larutan sampai 1 berbanding 400 menggunakan larutan stok basal medium.

Prosedur. Pada tabung terpisah, tambah masing-masing 1,0; 1,5; 2,0; 3,0; 4,0; dan 5,0 ml larutan standar. Pada setiap tabung tersebut dan empat tabung lain, tambah 5,0 ml larutan stok basal medium dan air sampai volume 10 ml. Pada tabung yang terpisah, tambah 1,0; 1,5; 2,0; 3,0 dan 4,0 ml larutan uji. Pada setiap tabung tersebut dan empat tabung lain, tambah 5,0 ml larutan stok basal medium dan air sampai volume 10 ml. Sterilkan tabung dalam otoklaf pada suhu 121°C selama 5 menit. Tambah 0,5 ml inokulum pada setiap tabung yang telah disiapkan, kecuali dua tabung untuk blanko. Inkubasi pada suhu 300°—400°C selama 16—24 jam. Panaskan tabung pada suhu 80°C selama 5 menit. Dinginkan pada suhu ruang.

Ukur %T dengan spektrofotometer pada panjang gelombang 530 nm selama 30 detik.

Perhitungan. Lakukan perhitungan dengan bantuan kurva konsentrasi-respon (%T) atau dengan bantuan program yang tersedia pada peralatan.

Asam folat

Lakukan penetapan kadar dengan salah satu metode berikut:

1. Lakukan dengan metode kromatografi cair, menggunakan:

   Pereaksi (1). Larutan tetrabutilamonium hidroksida 25% dalam metanol.

   Pereaksi (2). Larutkan dan encerkan 5 g asam pentetat dalam natrium hidroksida 1 M sampai batas volume 50 ml.

   Fase gerak. Larutkan 2 g kalium fosfat monobasa dalam 650 ml air. Tambah 12 ml pereaksi (1), 7 ml asam fosfat 3 M dan 240 ml metanol. Dinginkan pada suhu ruang, atur pH 7,15 dengan asam fosfat dan encerkan dengan air sampai batas volume 1000 ml, aduk dan saring. [Periksa kembali pH sebelum digunakan, jika dipelukan buat penyesuaian kandungan metanol dan air (1%—3%) pada fase gerak untuk memperoleh pemisahan dan garis dasar asam folat dan standar internal yang baik].

   Larutan standar internal. Pada 40 mg metil-paraben tambah 220 ml metanol aduk sampai larut. Larutkan 2 g kalium fosfat monobasa dalam 300 ml air. Campurkan kedalam larutan yang bersi metil paraben, tambah 300 ml air dan aduk. Tambah 19 ml pereaksi (1), 7 ml asam fofat 3 M dan 30 ml pereaksi (2). Atur pH 9,8 dengan amonia. Alirkan nitrogen kedalam larutan selama 30 menit, encerkan dengan air sampai batas volume 1000 ml dan aduk.

   Larutan standar. Larutkan dan encerkan standar asam folat dalam larutan standar internal sampai konsentrasi 0,2 mg/ml. Encerkan 2 ml dengan larutan standar internal sampai volume 25 ml dan aduk.

   Larutan uji. Larutkan dan encerkan sediaan setara dengan 0,4 mg asam folat dalam 25 ml larutan standar internal, aduk selama 10 menit, dan sentrifus. Saring supernatan dan gunakan hasil saringan untuk penetapan.

   Kolom. Oktadesilsilil, ukuran 30 cm x 4,6 mm atau yang sesuai

   Laju alir. 1 ml/menit

   Detektor. Spektrofotometer pada panjang gelombang 280 nm.

   Injek larutan standar, waktu tambat relatif sekitar 0,8 untuk asam folat dan 1,0 untuk metilparaben; simpangan baku relatif tidak lebih dari 3%.

   Injek 15 µl larutan standar, larutan standar internal dan larutan uji.

   Hitung kadar (µg) dengan rumus:

$$25\,C\left(\frac{A_S}{A_{Std}}\right)$$

   Keterangan:

   C = konsentrasi asam folat larutan standar, (mg/ml)

   A_S dan A_{Std} = perbandingan area asam folat terhadap metilparaben pada larutan uji dan larutan standar

2. Lakukan dengan metode kromatografi cair, menggunakan:

   Pereaksi. Larutkan 7,5 g dinatrium edetat dalam 500 ml air (yang mengandung 10 ml amonium hidroksida).

   Pelarut pengencer. Amonium hidroksida (60 µg/ml).

   Fase gerak. Encerkan 0,4 ml tritilamin, 15 ml asam asetat glasial dan 350 ml metanol dengan natrium

1-heksansulfonat 0,008 M sampai batas volume 2000 ml dan saring. Jika perlu, buat penyesuaian (lihat kesesuaian sistem kromatografi).

Larutan stok standar. Larutkan dan encerkan standar asam folat ke dalam pelarut pengencer sampai konsentrasi 60 µg/ml. Larutan harus segar.

Larutan standar. Pada 5 ml larutan stok standar, tambah 10 m metanol dan 35 ml pereaksi. Aduk selama 15 menit di dalam penangas air pada suhu 60°C, dinginkan. Saring (buang beberapa ml hasil saringan pertama) dan gunakan hasil saringan.

Larutan uji. Pada sediaan setara dengan 0,3 mg asam folat, tambah 10 ml metanol dan 35 ml pereaksi. Aduk selama 15 menit didalam penangas air pada suhu 60°C, dinginkan. Saring (buang beberapa ml hasil saringan pertama), gunakan hasil saringan.

Kolom. Oktilsilil, ukuran 25 cm x 4,6 mm, suhu 59°C.

Kecepatan alir. 2 ml/menit.

Detektor. Spektrofotometer pada panjang gelombang 270 nm.

Injek larutan standar, Simpangan baku tidak lebih dari 2,0%.

Injek 5 µl larutan standar dan larutan uji.

Hitung kadar (µg) dengan rumus:

$$45\ C\left(\frac{A_S}{A_{Std}}\right)$$

Keterangan :

C = konsentrasi asam folat dalam larutan standar (mg/ml)

A_S = area puncak larutan uji

A_{Std} = area puncak larutan standar

Kalsium pantotenat

Lakukan penetapan kadar dengan salah satu metode berikut:

1. Lakukan dengan metode kromatografi cair, menggunakan:

   Fase gerak. Campur air dan asam fosfat (1000:1). Jika perlu, buat penyesuaian (lihat kesesuaian sistem kromatografi).

   Larutan standar internal. Larutkan 80 mg asam p-hidroksibenzoat dalam 3 ml alkohol. Tambah 50 ml air dan 7,1 g natrium fosfat dibasa. Encerkan dengan air sampai batas volume 1000 ml dan aduk. Atur pH 6,7, dengan asam fosfat.

   Larutan standar. Larutkan dan encerkan standar kalsium pantotenat dengan larutan standar internal sampai konsentrasi 0,6 mg/ml.

   Larutan uji. Pada sediaan setara dengan 15 mg kalsium pantotenat, tambah 25 ml larutan standar internal, aduk selama 10 menit. Sentrifus dan saring. Gunakan hasil saringan.

   Kolom. Oktadesilsilil, ukuran 25 cm x 3,9 mm.

   Laju alir. 1,5 ml/menit.

   Detektor. Spektrofotometer pada panjang gelombang 210 nm.

   Injek larutan standar, waktu tambat relatif adalah 0,5 untuk kalsium pantotenat dan 1,0 untuk asam p-hidroksibenzoat; simpangan baku relatif tidak lebih dari 3%.

   Injek larutan standar. Simpangan baku tidak lebih dari 2,0%.

   Injek 10 µl larutan standar, larutan standar internal dan larutan uji.

   Hitung kadar (µg) dengan rumus:

   $$25\ C\left(\frac{A_S}{A_{Std}}\right)$$

   Keterangan :

   C = konsentrasi kalsium pantotenat dalam larutan standar (mg/ml)

   A_S dan A_{Std} = Perbandingan area kalsium pantotenat terhadap parahidroksibenzoat pada larutan uji dan larutan standar

2. Lakukan dengan metode mikrobiologi, menggunakan:

   Larutan stok standar. Larutkan 50 mg kalsium pantotenat (sebelumnya dikeringkan dan disimpan dalam tempat gelap diatas fosfor pentoksida) dalam 500 ml air. Tambah 10 ml asam asetat 0,2 M, 100 ml larutan natrium asetat (1 dalam 60), dan encerkan dengan air sampai konsentrasi 50 µg/ml. Simpan botol dalam toluen di lemari pendingin.

   Larutan standar. Encerkan larutan stok standar dengan air sampai konsentrasi 0,01—0,04 µg/ml kalsium pantotenat.

   Larutan uji. Larutkan sediaan setara 50 mg kalsium pantotenat dalam 500 ml air. Tambah 10 ml asam asetat 0,2 M, 100 ml larutan natrium asetat (1 dalam 60), encerkan dengan air sampai batas volume 1000 ml dan saring. Encerkan larutan sampai konsentrasi setara dengan larutan standar.

   Larutan asam-kasein hidrolisat. Campurkan 100 g vitamin bebas kasein dengan 500 ml asam hidroklorida 6 M dan refluks selama 8—12 jam. Suling dengan pengurangan tekanan (untuk menghilangkan asam hidroklorida) sampai terbentuk pasta. Larutkan pasta dalam air, atur pH 3,5 ± 0,1 dengan natrium hidroksida 1 M dan tambah air sampai batas volume 1000 ml. Tambah 20 g arang aktif, aduk selama 1 jam dan saring ke dalam botol. Ulangi proses dengan arang aktif. Simpan botol dalam toluen pada suhu tidak lebih dari 10°C.

   Larutan sistin-triptofan. Suspensikan 4,0 g L-sistin dalam 1,0 g L-triptofan (atau 2,0 g D,L-triptofan) dalam sekitar 700 ml air, panaskan pada suhu 70°—80°C, tambah setetes demi setetes larutan asam hidroklorida (1 dari 2), dan aduk. Dinginkan dan encerkan dengan air sampai batas volume 1000 ml. Simpan botol dalam toluen pada suhu tidak lebih dari 10°C.

Larutan urasil-guanin-adenin. Larutkan 200 mg adenin sulfat, guanin hidroklorida, dan urasil dalam 10 ml asam hidroklorida 4 M sambil dipanaskan, dinginkan, dan tambah air sampai batas volume 200 ml. Simpan dalam lemari pendingin.

Larutan polisorbat 80. Larutkan dan encerkan 25 g polisorbat 80 dalam alkohol sampai batas volume 250 ml.

Larutan riboflavin–tiamin hidroklorida–biotin. Larutan riboflavin dan tiamin hidroklorida dan biotin dalam asam asetat 0,02 M yang mengandung 20 µg/ml riboflavin dan 10 µg/ml tiamin hidroklorida dan 0,04 µg/ml biotin. Simpan botol dalam toluen pada suhu tidak lebih 10°C.

Larutan asam p-aminobenzoat-niasin-piridoksin hidroklorida. Campuran air dan alkohol netral (3:1) yang mengandung 10 µg/ml asam p-aminobenzoat, 50 µg/ml niasin dan 40 µg/ml piridoksin hidroklorida. Simpan dalam lemari pendingin.

Larutan garam 1. Larutkan dan encerkan 25 g kalium fosfat monobasa dan 25 g kalium fosfat dibasa dalam air sampai batas volume 500 ml. Tambah 5 tetes asam hidroklorida dan aduk. Simpan botol dalam toluen.

Larutan garam 2. Larutkan dan encerkan 10 g magnesium sulfat, 0,5 g natrium klorida, 0,5 g besi sulfat dan 0,5 g mangan sulfat dalam air sampai batas volume 500 ml. Tambah 5 tetes asam hidroklorida dan aduk. Simpan botol dalam toluen.

Stok kultur *lactobacillus plantarum*. Larutkan 2 g sari ragi dalam 100 ml air, tambah 500 mg dekstrosa anhidrat, 500 mg natrium asetat anhidrat dan 1,5 g agar. Panaskan campuran di atas penangas air dengan pengadukan sampai agar larut. Pindahkan 10 ml larutan panas pada tabung uji, sumbat, sterilkan dalam otoklaf 121°C dan biarkan tabung sampai dingin dalam posisi tegak lurus. Siapkan stok kultur pada tiga atau lebih tabung, gunakan kultur murni *lactobacillus plantarum*, inkubasi selama 16—24 jam pada suhu 30°—37°C. Simpan dalam lemari pendingin. Siapkan stok kultur segar setiap minggunya dan jangan gunakan untuk inokulum jika kultur lebih dari 1 minggu.

Medium kultur. Setiap tabung uji mengandung 5 ml larutan basal stok medium, tambah 5 ml air yang mengandung 0,5 mg kalsium pantotenat. Sumbat dengan katun, sterilkan dalam otoklaf 121°C dan dinginkan.

Inokulum. [Suspensi beku *lactobacillus plantarum* dapat digunakan sebagai stok kultur untuk menghasilkan inokulum yang sebanding dengan kultur segar]. Pindahkan secukupnya dari stok kultur *lactobacillus plantarum* ke dalam tabung steril yang mengandung 10 ml medium kultur. Inkubasi pada suhu 30°—37°C selama 16—24 jam.

Larutan stok basal medium. Campur 25 ml larutan asam-kasein hidrolisat, 25 ml larutan sistin triptofan, 0,25 ml polisorbat 80, 10 g dektrosa anhidrat, 5 g natrium asetat anhidrat, 5 ml larutan urasil-adenin-guanin, 5 ml riboflavin-tiamin hidroklorida-biotin, 5 ml larutan p-aminobenzoat-niasin-piridoksin hidroklorida, 5 ml larutan garam-1, 5 ml larutan garam-2, atur pH 6,8 dengan natrium hidroksida 1 M dan encerkan dengan air sampai batas volume 250ml.

Prosedur. Siapkan enam tabung, tambah ke setiap tabung yang berbeda 1,0; 1,5; 2,0; 3,0; 4,0 dan 5,0 ml larutan standar. Pada setiap tabung dan empat tabung kosong lain, tambah 5 ml larutan basal stok medium dan air sampai volume 10 ml.

Pada empat tabung yang kosong, tambahkan larutan uji 2 - 3 kali larutan standar termasuk 2,0; 3,0; dan 4,0 ml. Pada setiap tabung, tambah 5 ml larutan basal stok medium dan air sampai volume 10 ml.

Sumbat semua tabung, sterilkan pada otoklaf 121°C selama 5 menit. Dinginkan, tambah 1 tetes inokulum pada setiap tabung, kecuali dua dari empat tabung tidak mengandung larutan standar (blanko) dan aduk. Inkubasi pada suhu 30°—37°C selama 16—24 jam inkubasi. Dalam 2 jam pertama tidak terjadi kekeruhan dalam tabung yang mengandung standar dengan konsentrasi paling tinggi.

Ukur %T dengan spektrofotometer pada panjang gelombang 540—660 nm.

Perhitungan. Lakukan perhitungan dengan bantuan kurva konsentrasi-respon (%T) atau dengan bantuan program yang tersedia pada peralatan.

3. Lakukan dengan metode kromatografi cair, menggunakan:

Dapar fosfat. Larutkan dan encerkan 10 g kalium fosfat monobasa dalam air sampai batas volume 2000 ml. Atur pH 3,5 dengan sam fosfat.

Fase gerak. Campur dapar fosfat dan metanol (90:10). Jika perlu, lakukan penyesuaian jika diperlukan (lihat kesesuaian sistem kromatografi.

Larutan stok standar. Larutan standar kalsium pantotenat dalam air sampai konsentrasi 0,25 mg/ml. Simpan dalam lemari pendingin.

Larutan standar. Encerkan stok standar dengan air sampai konsentrasi 40 µg/ml.

Larutan uji. Larutkan sediaan setara 10 mg kalsium pantotenat dengan 50 ml metanol, dan encerkan dengan air sampai bats volume 250 ml dan saring.

Kolom. Oktadesilsilil, ukuran 25 cm x 3,9 mm, atau yang sesuai, suhu 50°C.

Laju alir. 2 ml/menit.

Detektor. Spektrofotometer pada panjang gelombang 205 nm.

Injek larutan standar, simpangan baku relative tidak lebih dari 3,0%.

Injek 25 µl larutan standar dan larutan uji.

Hitung kadar (mg) dengan rumus:

$$250\ C\left(\frac{A_S}{A_{Std}}\right)$$

Keterangan :

C = konsentrasi kalsium pantotenat dalam larutan standar (mg/ml)

A_S = area puncak larutan uji

A_{Std} = area puncak larutan standar

Niasin atau niasinamid, piridoksin hidroklorida, riboflavin dan tiamin hidroklorida

Vitamin B_3 (niasin)

Lakukan penetapan kadar dengan salah satu metode berikut:

1. Lakukan dengan metode kromatografi cair, menggunakan:

   Larutan pengencer. Campur air, asetonitril, dan asam asetat glasial (94:5:1).

   Fase gerak. Campur air, metanol, dan asam asetat glasial (73:27:1) yang mengandung 140 mg natrium 1-heksansulfonat per 100 ml. Jika perlu, buat penyesuaian (lihat kesesuaian sistem kromatografi).

   Larutan standar. Pada 80 mg standar niasinamid, 20 mg standar piridoksin hidroklorida, 20 mg standar riboflavin, dan 20 mg standar tiamin hidroklorida, tambah 180 ml larutan pengencer. Rendam labu dalam penangas air pada suhu 65°—70°C selama 10 menit sambil diaduk sampai larut. Dinginkan segera dalam air dingin selama 10 menit pada suhu ruang, encerkan dengan larutan pengencer sampai batas volume 200 ml dan aduk.

   Larutan uji. Pada sediaan setara 10 mg niasinamid dan 2,5 mg setiap piridoksin hidroklorida, riboflavin, dan tiamin, tambah 25 ml larutan pengencer, dan aduk selama 30 detik sampai larut. Rendam tabung sentrifus dalam penangas air pada suhu 65°—70°C, panaskan selama 5 menit, dan aduk selama 30 detik. Masukan kembali tabung ke dalam penangas air, panaskan kembali selama 5 menit, dan aduk selama 30 detik. Saring larutan, dinginkan pada suhu ruang, dan gunakan saringan. [Catatan - gunakan saringan dalam jangka waktu 3 jam].

   Kolom. Oktadesilsilil, ukuran 25 cm x 3,9 mm atau yang sesuai.

   Laju alir. 1 ml/menit.

   Detektor. Spektrofotometer pada panjang gelombang 280 nm.

   Injek larutan standar, waktu tambat relatif dari niasinamid, piridoksin, riboflavin, dan tiamin adalah sekitar 0,3; 0,5; 0,8; dan 1,0; simpangan baku relatif tidak lebih dari 3%.

   Injek 25 µl larutan standar dan larutan uji.

   Hitung kadar (mg) dengan rumus :

$$25\ C\left(\frac{A_S}{A_{Std}}\right)$$

   Keterangan :

   C = konsentrasi niasin dalam larutan standar (mg/ml)

   A_S = area puncak larutan uji

   A_{Std} = area puncak larutan standar

2. Lakukan dengan metode kromatografi cair, menggunakan:

   Larutan pengekstrak. Pada 1 ml asam asetat glasial dan 2,5 g dinatrium edetat larutkan dan encerkan dengan air sampai bats volume 100 ml dan aduk. Campur larutan dengan metanol (75:25).

   Fase gerak. Natrium asetat 0,1 M (larutkan 13,6 g natrium asetat ke dalam 1000 ml air. Atur pH 5,4 dengan asam asetat dan aduk. Jika perlu, buat penyesuaian (lihat kesesuaian sistem kromatografi). Pada fase gerak, tambah metanol sampai konsentrasi 1%.

   Larutan stok standar. Larutkan dan encerkan standar niasin dalam larutan pengekstrak sampai konsentrasi 1 mg/ml.

   Larutan standar. Encerkan 5 ml larutan stok standar dengan larutan pengesktrak sampai volume 25 ml.

   Larutan uji. Pada sediaan setara dengan 2 mg riboflavin atau setara dengan 2 mg piridoksin atau setara dengan 20 mg niasin atau niasinamid, tambah 100 ml larutan pengekstrak dan aduk selama 20 menit dalam penangas air pada suhu 70°—75°C, dan panaskan selama 20 menit. Aduk selama 30 detik, dinginkan pada suhu ruang dan saring. Gunakan hasil saringan.

   Kolom. Oktadesilsilil, ukuran 25 cm x 4,6 mm atau yang sesuai.

   Laju alir. 1 ml/menit.

   Detektor. Spektrofotometer pada panjang gelombang 254 nm.

   Injek standar, simpangan baku relatif tidak lebih dari 3%. Jika diperlukan, bilas kolom dengan metanol.

   Injek 20 µl larutan standar dan larutan uji.

   Hitung kadar (mg) dengan rumus :

$$100\ C\left(\frac{A_S}{A_{Std}}\right)$$

   Keterangan :

   C = konsentrasi niasin dalam larutan standar (mg/ml)

   A_S = area puncak larutan uji

   A_{Std} = area puncak larutan standar

3. Lakukan dengan metode kromatografi cair (untuk niasin atau niasinamida, piridoksin hidroklorida, riboflavin dan tiamin).

   Pereaksi. Larutan 25 g dinatrium edetat dalam 1000 ml air.

Fase gerak. Pada 0,4 ml trietilamin, 15,0 ml asam asetat glasial dan 350 ml metanol, tambah natrium 1-heksansulfonat 0,008 M sampai batas volume 2000 ml dan aduk. Saring dan gunakan hasil saringan. Jika perlu, buat penyesuaian (lihat kesesuaian sistem kromatografi).

Larutan stok standar. Larutkan standar niasin atau niasinamid, piridoksin hidroklorida, riboflavin, dan tiamin hidroklorida dengan pereaksi (jika perlu, panaskan), sampai konsentrasi 1,5 mg/ml (niasin atau niasinamid), 0,24 mg/ml (piridoksin hidroklorida), 0,08 mg/ml (riboflavin) dan 0,24 mg/ml (tiamin hidroklorida).

Larutan standar. Pada 5 ml larutan stok standar, tambah 10 ml campuran metanol dan asam asetat glasial (9:1) dan 30 ml campuran metanol dan etilen glikol (1: 1). Sumbat, aduk selama 15 menit dalam penangas air pada suhu 60°C, dan dinginkan. Saring dan buang beberapa ml hasil saringan pertama.

Larutan uji. Pada sediaan setara 7,5 mg niasin atau niasinamid, 1,2 mg piridoksin hidroklorida, 0,4 mg riboflavin, dan 1,2 mg tiamin hidroklorida. Tambah 10 ml campuran metanol dan asam asetat glasial (9:1), 30 ml campuran metanol dan etilen glikol (1:1). Sumbat dan aduk selama 15 menit dalam penangas air pada suhu 60°C, dan dinginkan. Saring dan buang beberapa ml hasil saringan pertama.

Kolom. Oktilsilil, ukuran 25 cm x 4,6 mm, atau yang sesuai. Suhu 50°C.

Laju alir. 2 ml/menit.

Detektor. Spektrofotometer pada panjang gelombang 270 nm.

Injek standar; simpangan baku relatif tidak lebih dari 2%.

Injek 5 µl larutan standar dan larutan uji.

Hitung kadar (mg) dengan rumus:

$$40\ C \left(\frac{A_S}{A_{Std}}\right)$$

Keterangan :

C = konsentrasi niasin dalam larutan standar (mg/ml)

A_S = area puncak larutan uji

A_{Std} = area puncak larutan standar

Vitamin B_3 (niasinamid)

Lakukan penetapan kadar dengan salah satu metode berikut:

1. Lihat metode 1 untuk niasin.
2. Lakukan dengan kromatografi cair, menggunakan:

   Lakukan seperti yang tertera dalam penetapan kadar niasin, metode 2, menggunakan: Larutan pengekstrak, fase gerak, larutan stok standar, larutan standar, larutan uji, dan sistem kromatografik.

   Injek 20 µl larutan standar dan larutan uji.

   Hitung kadar (mg) dengan rumus :

$$100\ C \left(\frac{A_S}{A_{Std}}\right)$$

   Keterangan :

   C = konsentrasi niasinamid dalam larutan standar (mg/ml)

   A_S = area puncak larutan uji

   A_{Std} = area puncak larutan standar

3. Lihat metode 3 untuk niasin.

Vitamin B_6 (piridoksin hidroklorida)

Lakukan penetapan kadar dengan salah satu metode berikut:

1. Lihat metode 1 untuk niasin.
2. Lakukan dengan kromatografi cair, menggunakan:

   Lakukan seperti yang tertera dalam penetapan kadar niasin, metode 2, menggunakan: larutan pengekstrak, fase gerak.

   Larutan stok standar. Larutkan dan encerkan standar piridoksin hidroklorida dalam larutan pengekstrak sampai konsentrasi 0,1 mg/ml.

   Larutan standar. Encerkan 5 ml larutan stok standar dengan larutan pengekstrak sampai volume 25 ml dan aduk.

   Larutan uji. Lakukan seperti dalam penetapan kadar niasin, metode 2.

   Kolom. Oktadesilsilil, ukuran 25 cm x 4,6 mm.

   Laju alir. 1 ml/menit.

   Detektor. Spektrofotometer pada panjang gelombang 254 nm.

   Injek standar, simpangan baku relatif tidak lebih dari 3%.

   Injek 20 µl larutan standar dan larutan uji.

   Hitung kadar (mg) dengan rumus :

$$100\ C \left(\frac{A_S}{A_{Std}}\right)$$

   Keterangan :

   C = konsentrasi piridoksin hidroklorida dalam larutan standar (mg/ml)

   A_S = area puncak larutan uji

   A_{Std} = area puncak larutan standar

3. Lihat metode 3 untuk niasin.

Vitamin B_2 (riboflavin)

Lakukan penetapan kadar dengan salah satu metode berikut:

1. Lihat metode 1 untuk niasin.
2. Lakukan dengan metode kromatografi cair, menggunakan:

   Larutan pengekstrak. Lihat metode 2 untuk niasin.

   Fase gerak. Larutkan 6,8 g natrium asetat dalam 1000 ml air dan aduk. Campur larutan dengan metanol (65:35). Tambah 2 ml trietilamin, atur pH