

# Pengaruh Pelarut terhadap Optimasi Reaksi Derivatisasi Lisinopril dengan 1-Fluoro-2,4-Dinitrobenzene serta Pemilihan Standar Internalnya

Ririn Sumiyani<sup>1</sup>, Sudibyo Martono<sup>2</sup>, dan Sugiyanto<sup>3</sup>

<sup>1</sup> Laboratorium Kimia Analisis Farmasi Fakultas Farmasi Universitas Surabaya, Surabaya

<sup>2</sup> Laboratorium Kimia Analisis Farmasi Fakultas Farmasi Universitas Gadjah Mada, Yogyakarta

<sup>3</sup> Laboratorium Farmakologi& Toksikologi Fakultas Farmasi Universitas Gadjah Mada, Yogyakarta

Korespondensi: Ririn Sumiyani

Email: ririn\_sum@staff.ubaya.ac.id

**ABSTRAK:** Telah dilakukan penelitian untuk mengoptimasi reaksi derivatisasi lisinopril dalam pelarut aquades dan metanol dengan 1-fluoro-2,4-dinitrobenzene (FDNB) serta memilih standar internal. Gabapentin, amlodipin, enalapril, dan metoprolol dipilih sebagai kandidat standar internal (IS). Pada kondisi optimum reaksi lisinopril, standar internal harus membentuk produk derivatisasi dengan FDNB. Reaksi derivatisasi lisinopril dalam pelarut aquades optimum pada pH 9,5 bufer borat dengan pemanasan pada suhu 70°C selama 25 menit. Pada kondisi ini yang dapat membentuk produk derivatisasi hanya gabapentin. Analisis lisinopril dengan standar internal secara *High Performance Liquid Chromatography* (HPLC) menggunakan kolom Novapack C<sub>18</sub> (250 mm x 4,60 mm) dan fase gerak buffer asetat (0,02 M, pH 3,5):asetonitril = 55:45 dengan laju alir 0,8 ml/min. Pemisahan lisinopril-DNB dan gabapentin-DNB terjadi pada waktu retensi berturut-turut 12,06 dan 18,86 menit dengan waktu analisis 25 menit. Karena waktu analisis terlalu panjang, maka dicari alternatif waktu preparasi dan analisis yang lebih cepat. Reaksi derivatisasi lisinopril dalam pelarut metanol, didapatkan kondisi optimum pada pH 11,0 tanpa pemanasan. Pada pelarut metanol, selain lisinopril, gabapentin, amlodipin, enalapril, dan metoprolol juga membentuk produk derivatisasi dengan FDNB sehingga berpotensi sebagai standar internal. Namun demikian, pada analisis secara *Ultra Performance Liquid Chromatography* (UPLC) menggunakan kolom Acquity BEH C<sub>18</sub>, fase gerak buffer asetat (0,01 M, pH 3,5):asetonitril:metanol = 70:15:15 dengan laju alir 0,3 ml/min, semua standar internal tidak terpisah dengan produk derivatisasi lisinopril. Disimpulkan bahwa lisinopril dalam pelarut metanol lebih efektif karena reaksi derivatisasi dengan FDNB tidak memerlukan pemanasan. Analisis lisinopril dalam pelarut air dengan standar internal gabapentin menggunakan HPLC kolom Novapack C<sub>18</sub> memerlukan waktu analisis 25 menit, sedangkan dalam pelarut metanol dengan UPLC menggunakan kolom Acquity BEH C<sub>18</sub>, analisis melalui derivatisasi dengan FDNB dapat dilakukan tanpa standar internal dengan waktu retensi lisinopril-DNB 4,67 menit.

**Kata kunci:** lisinopril; FDNB; derivatisasi; HPLC; UPLC

**ABSTRACT:** Derivatization of lisinopril with 1-fluoro-2,4-dinitrobenzene (FDNB) in distilled water as solvent was optimized. Internal standard (IS) selection for the analysis method was also conducted. Gabapentin, amlodipin, enalapril, and metoprolol were selected for the IS studied. The optimum derivatization reaction was obtained at pH 9.5 (borate buffer), at 70°C for 25 min when distilled water was used as the solvent with gabapentin as the most suitable IS. This derivatization product was then analyzed by High Performance Liquid Chromatography (HPLC) using a Novapack C<sub>18</sub> (250 mm x 4.60 mm) column as stationary phase and acetate buffer (0.02 M, pH 3.5):acetonitrile = 55:45 as a mobile phase at flow rate of 0.8 ml/min. Although the established HPLC analysis method successfully separated lisinopril-DNB and gabapentin-DNB (IS), uneffective analysis condition was observed. A long running time, approximately 25 minutes, should be applied. Thus, it is time consuming especially when routine operation takes place and consumes much volumes of solvent. Therefore, derivatization of lisinopril in methanol as a solvent was also conducted. An Ultra Performance Liquid Chromatography (UPLC) was applied to analyse the products of the derivatization reaction. An Aquity BEH C<sub>18</sub> column was used with acetate buffer (0.01 M, pH 3.5):acetonitrile:methanol = 70:15:15 as mobile phase at 0.3 ml/min of flow rate. This analysis method was more efficient e.g. does not need any IS, lower preparation step, and shorter analysis time (approximately 5 minutes).

**Keywords:** lisinopril; FDNB; derivatization; HPLC; UPLC

## 1. Pendahuluan

Hipertensi di Indonesia merupakan penyakit yang tidak dapat diabaikan, karena prevalensinya cukup tinggi yaitu 25,8 % [1], meskipun hasil ini lebih kecil dibanding hasil riset tahun 2007 yaitu 31,27 % [2]. Obat anti hipertensi terdiri dari beberapa golongan antara lain: *Angiotensin Receptor Blocker*, *calcium antagonist*, inhibitor *Angiotensin Converting Enzim (ACE)* dan *Beta Blocker*. Pemilihan antihipertensi inhibitor ACE memiliki nilai lebih, karena inhibitor ACE mempunyai efek lain yang menguntungkan yaitu efek proteksi vaskular yang dapat mencegah terjadinya arteriosklerosis [3, 4]. Obat inhibitor ACE termasuk 48 obat prioritas untuk dilakukan uji bioavailabilitas dan bioekivalensi [5] yang merupakan uji kadar obat di dalam plasma dari waktu ke waktu. Untuk uji kadar lisinopril dalam plasma biasanya dilakukan secara Kromatografi Cair Kinerja Tinggi (KCKT)-tandem Spektrometri Massa [6, 7] atau KCKT detektor fluoresensi dengan terlebih dahulu lisinopril direaksikan dengan penderivat sehingga terbentuk senyawa yang berfluoresensi [8, 9]. Untuk mendeteksi senyawa konsentrasi kecil, metode KCKT-Spektrometri Massa ini sensitif, selektif dan akurat, tetapi harga alat ini mahal sehingga tidak semua laboratorium memilikinya. Oleh karena itu perlu dikembangkan suatu metode analisis yang tidak terlalu mahal tetapi memiliki sensitivitas tinggi, selektif, dan akurasi yang memadai.

Analisis secara KCKT pada umumnya menggunakan standar internal dengan tujuan memperbaiki kesalahan karena variabilitas dalam pengenceran, penguapan, perolehan kembali, adsorpsi, derivatisasi, dan penginjekan [10]. Secara umum inhibitor ACE termasuk lisinopril menunjukkan absorptivitas sinar yang rendah di daerah UV, karena itu analisis dengan spektrofotometer biasanya dilakukan melalui teknik derivatif turunan kedua atau spektrofotometri dengan ditambah penderivat untuk membentuk senyawa yang berfluoresensi [11]. Paraskevas *et al.* [12] telah melakukan derivatisasi lisinopril dengan 1-fluoro 2,4 dinitro-benzen (FDNB) dilanjutkan penentuan kadar secara spektrofotometri detek-

tor UV-Vis. Pada penelitian tersebut lisinopril dilarutkan aquades ditambah bufer borat pH 8,2 sebanyak 10% dan dipanaskan 60°C selama 45 menit. Reaksi derivatisasi lisinopril dalam pelarut metanol dengan FDNB dengan pemanasan 90°C telah dilakukan oleh Abdel-Razak *et al.* [13].

Parameter yang berpengaruh pada reaksi derivatisasi adalah: pH, suhu, waktu, lama reaksi, dan perbandingan molekul. Pada penelitian ini dicari kondisi optimum lisinopril dalam pelarut aquades pada reaksi dengan FDNB, serta dicari senyawa yang dapat digunakan sebagai standar internalnya, selanjutnya dilakukan analisis dengan KCKT, selain itu dilakukan derivatisasi lisinopril dalam pelarut metanol. Penderivat FDNB dapat digunakan pada senyawa amin primer dan sekunder [14]. Contoh senyawa amin primer adalah gabapentin dan amlodipin, sedangkan amin sekunder adalah enalapril dan metoprolol. Analisis gabapentin dengan standar internal amlodipin secara KCKT melalui derivatisasi dengan FDNB telah dilakukan oleh Soury *et al.* [15] dan Jalalzadeh *et al.* [16]. Pada kedua penelitian tersebut reaksi derivatisasi membutuhkan pemanasan 60°C dan jumlah bufer borat yang ditambahkan sebanyak 10% dan demikian juga pada penelitian Efendi [17], untuk derivatisasi gabapentin dan FDNB membutuhkan pemanasan. Optimasi jumlah bufer borat telah dilakukan oleh Sumiyani *et al.* [18], yaitu bufer borat 10%, 20% dan 30%, didapatkan jumlah 10% bufer borat adalah yang optimum. Derivatisasi metoprolol dalam pelarut metanol telah dilakukan oleh Nugraheni *et al.* [19], reaksi ini tanpa pemanasan tetapi bufer borat yang digunakan sekitar 80%. Pada penelitian ini dicari kondisi optimum reaksi lisinopril dalam pelarut aquades dan metanol dengan FDNB, serta dicari senyawa yang dapat digunakan sebagai standar internal pada kondisi tersebut secara KCKT dan *Ultra Performance Liquid Chromatography (UPLC)*.

## 2. Metode

### 2.1. Bahan

Lisinopril, enalapril, amlodipin, gabapentin,

dan metoprolol baku pembanding derajat pro analisis (Sigma),serta  $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ , NaOH dan kalium klorida derajat pro analisis (E. Merck), Aquabidestilata (PT. Ikapharmindo Putramas), asam asetat pekat, metanol dan asetonitril derajat pro HPLC (E. Merck), serta 1-fluoro-2,4-dinitrobenzene derajat *derivatization for Gas Chromatography*.

## 2.2. Alat

Spektrofotometer (Shimadzu), pH meter, KCKT dengan kolom Novapack  $\text{C}_{18}$  (250 mm x 4,6 mm), UPLC dengan kolom Aquity BEH  $\text{C}_{18}$  (5  $\mu\text{m}$ ) *pre-packed* kolom (50 mm x 2,6 mm) dilengkapi dengan *column guard* (Waters), *ultrasonic bath* (Branson 1200), mikropipet ukuran 200-1000  $\mu\text{l}$  (Socorex Acura 821) dan mikropipet ukuran 0,5-5,0 ml (*Brand Transferpette*), oven, serta alat-alat gelas yang lazim digunakan di laboratorium analisis.

## 2.3. Penyiapan larutan standar

Lisinopril dilarutkan dalam aqua bidestilata, dibuat pada konsentrasi 1 mg/ml, disimpan pada *refrigerator*. Larutan FDNB dibuat pada konsentrasi 1 mg/ml dengan pelarut asetonitril. Pereaksi ini harus ditangani dengan hati-hati, karena dapat mengiritasi kulit. Bufer borat 0,025 M yang mengandung KCl 0,025 M, dibuat dengan menimbang  $\text{H}_3\text{BO}_3$  dan KCl yang sesuai dan dibuat pH yang diinginkan dengan NaOH 1,0 M dan diukur dengan pH meter (dibuat pH 8; 8,5; 9,0; 9,5; 10,0; 10,5 ; 11,0; dan 11,5).

## 2.4. Derivatisasi lisinopril dan pengukuran absorbansi

Dipipet lisinopril 200,0  $\mu\text{l}$ , ditambah buffer borat 500  $\mu\text{l}$  (jumlah bufer borat 10%) dan FDNB 300,0  $\mu\text{l}$ , ditambah asetonitril sampai 3,5 ml, dihomogenkan kemudian dipanaskan pada 70°C selama 25 menit, didinginkan dan ditambah asetonitril sampai 5,0 ml. Absorbansi diukur dengan spektrofotometer pada panjang gelombang 200-600 nm.

## 2.5. Optimasi jumlah bufer borat pada reaksi derivatisasi

Dilakukan optimasi jumlah bufer borat 10%, 20%, dan 30% sesuai dengan prosedur sebelumnya (derivatisasi lisinopril dan pengukuran absorbansi). Dengan cara yang sama dilakukan optimasi pH, suhu, dan waktu reaksi, sehingga akan didapatkan kondisi optimum reaksi derivatisasi lisinopril.

## 2.6. Penentuan standar internal

Senyawa yang dicoba sebagai standar internal yaitu gabapentin, enalapril, amlodipin dan metoprolol. Senyawa ini direaksikan dengan FDNB pada kondisi optimum lisinopril. Senyawa yang membentuk produk derivatisasi dibuktikan secara spektrofotometri, ditunjukkan dengan terjadinya spektrum baru produk derivatisasi yang mengalami pergeseran panjang gelombang maksimum ke arah yang lebih panjang dan absorbansi yang meningkat dibandingkan dengan senyawa asal dan FDNB. Demikian juga pembuktian dengan UPLC menunjukkan terjadinya puncak baru dengan area yang lebih besar.

## 2.7. Pemilihan fase gerak pada UPLC

Fase gerak terdiri dari bufer asetat (pH 3,5; 0,01 M):asetonitril:metanol (70:10:20), pada penelitian ini hanya sampai pada tahapan analisis kualitatif untuk membuktikan telah terjadi produk derivatisasi dengan terbentuknya puncak baru dengan luas area yang lebih besar dibandingkan senyawa asal dan FDNB.

## 3. Hasil dan pembahasan

### 3.1. Analisis lisinopril dengan FDNB dalam pelarut aquades

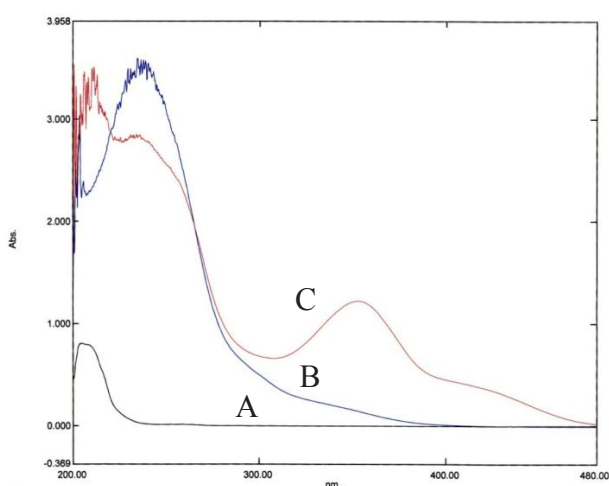
Mula-mula dilakukan penelitian untuk mencari kondisi optimum lisinopril dalam pelarut aquades pada reaksi derivatisasi dengan FDNB. Mengingat nilai pH, suhu, waktu reaksi, dan perbandingan mol (*mol ratio*) mempengaruhi reaksi derivatisasi, maka parameter tersebut juga turut dioptimasi pada penelitian ini.

Lisinopril diderivatisasi dengan FDNB dalam pelarut aquades. Produk reaksi derivatisasi yang

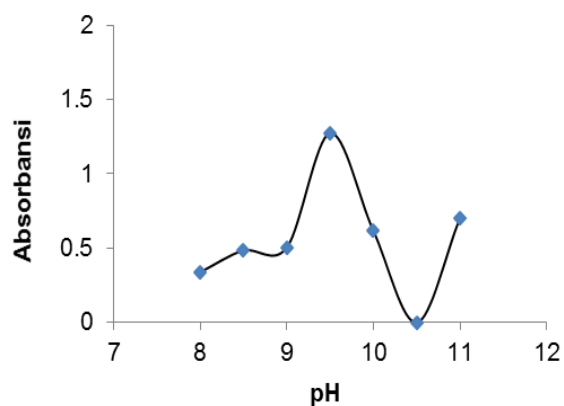
dihasilkan selanjutnya dipantau secara spektrofotometri untuk mengetahui terbentuk atau tidak terbentuknya produk derivatisasi yang diinginkan sebagaimana ditunjukkan pada spektrogram (Gambar 1). Terlihat dari Gambar 1, spektrogram lisinopril (A) memiliki absorbansi lemah, absorbansi FDNB (B) dengan panjang gelombang maksimum 249 nm, dan terbentuknya lisinopril-DNB (C). Lisinopril-DNB memiliki panjang gelombang maksimum yang lebih panjang dari lisinopril (A) maupun FDNB (B); selain itu mempunyai absorbansi yang lebih tinggi dari lisinopril (A) itu sendiri.

Selanjutnya, dilakukan optimasi untuk memperoleh kondisi reaksi derivatisasi lisinopril dengan FDNB. Parameter-parameter reaksi yang dioptimasi meliputi: pH larutan, suhu, dan waktu derivatisasi.

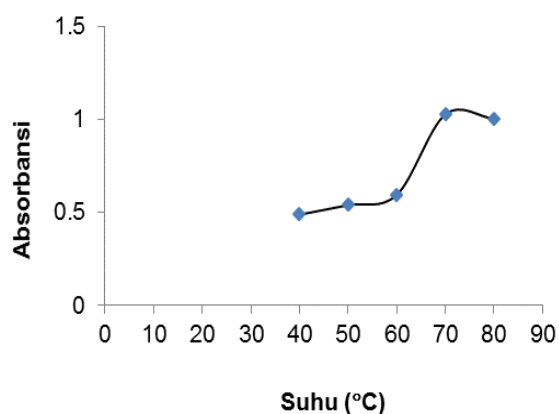
Reaksi optimum derivatisasi terjadi pada pH (pelarut aquades) = 9,5 (Gambar 2). Kondisi pH optimum ini digunakan untuk memperoleh suhu optimum (Gambar 3), dan didapatkan suhu optimum terjadi pada 70°C. Optimasi waktu reaksi derivatisasi dilakukan pada pH dan suhu optimum (pH = 9,5; 70°C), didapatkan waktu reaksi optimum 25 menit (Gambar 4).



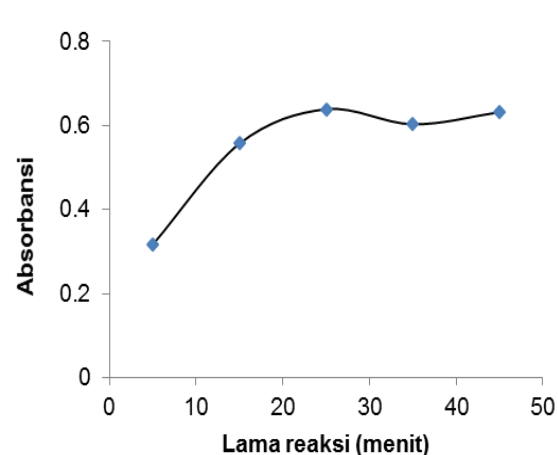
**Gambar 1.** Spektrogram reaksi derivatisasi lisinopril dan FDNB dalam larutan dapar borat pH 9,5. (A) lisinopril; (B) FDNB; (C) lisinopril-DNB



**Gambar 2.** Kurva hubungan pH bufer borat terhadap absorbansi lisinopril-DNB dalam pelarut aquades



**Gambar 3.** Kurva hubungan suhu dan absorbansi lisinopril-DNB dalam pelarut aquades pada pH 9,5



**Gambar 4.** Kurva hubungan lama reaksi terhadap absorbansi lisinopril-DNB dalam pelarut aquades suhu 70°C

Selanjutnya dilakukan pemilihan senyawa yang dapat digunakan sebagai standar internal untuk analisis lisinopril secara KCKT. Gabapentin, enalapril, amlodipin dan metoprolol adalah senyawa-senyawa kandidat yang akan digunakan sebagai standar internal pada penelitian ini. Oleh karena itu, reaksi FDNB dengan gabapentin, enalapril, amlodipin, dan metoprolol dilakukan pada kondisi optimum reaksi lisinopril dengan FDNB hasil optimasi sebelumnya (bufer borat (pH 9,5) 10% (v/v), asetonitril 90% (v/v), suhu pemanasan 70°C selama 25 menit).

Hasil reaksi derivatisasi antara kandidat standar internal dan FDNB menunjukkan bahwa produk dengan FDNB hanya terbentuk dari reaksi antara gabapentin dan FDNB. Hal tersebut ditunjukkan dengan absorbansi pada  $\lambda_{\text{maksimum}}$  363 nm. Oleh karena itu disimpulkan hanya gabapentin yang dapat digunakan standar internal sedangkan kandidat senyawa lain (enalapril, amlodipin, dan metoprolol), tidak dapat digunakan sebagai standar internal dalam analisis lisinopril secara KCKT.

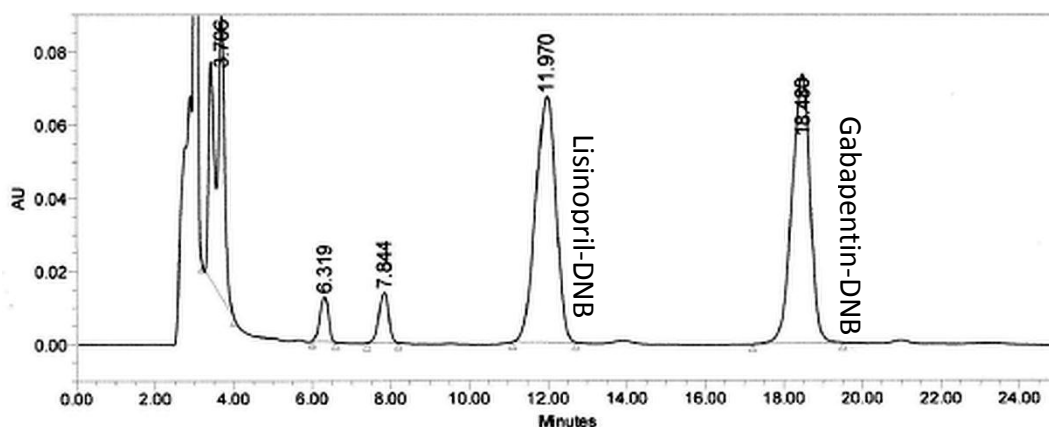
Kolom Novapack C<sub>18</sub> (250 mm x 4,6 mm) dengan fase gerak buffer asetat (0,02 M, pH 3,5): asetonitril (55:45) digunakan untuk analisis lisinopril secara KCKT, gabapentin yang terderivatisasi dengan FDNB digunakan sebagai standar

internalnya. Hasil analisis menunjukkan bahwa lisinopril-DNB terpisah dengan gabapentin-DNB berturut-turut dengan Rt = 12,06 dan 18,86 menit (Gambar 5). Mengingat *running time* yang panjang untuk menganalisis analit yang diinginkan (lisinopril-DNB), maka kondisi ini kurang efektif digunakan sebagai metode analisis rutin sehingga perlu didapatkan metode analisis lain yang lebih efektif. Oleh karena itu, selanjutnya dilakukan pengembangan analisis lisinopril dengan pelarut metanol secara UPLC. Sebelum dilakukan analisis lisinopril-DNB secara UPLC, optimasi reaksi lisinopril dalam pelarut metanol dengan FDNB perlu dilakukan. Selanjutnya, pengembangan metode analisis lisinopril dengan pelarut metanol diuraikan.

### 3.2. Analisis lisinopril dengan FDNB dalam pelarut metanol

#### 3.2.1. Hasil optimasi reaksi lisinopril pelarut metanol dengan FDNB

Dengan cara yang sama dengan optimasi lisinopril pada pelarut aquades, kondisi optimum reaksi lisinopril dalam pelarut metanol didapatkan pada suhu kamar dan pH 11,0. Selanjutnya dibuktikan terjadinya produk derivatisasi lisinopril dengan FDNB secara spektrofotometri dan UPLC.

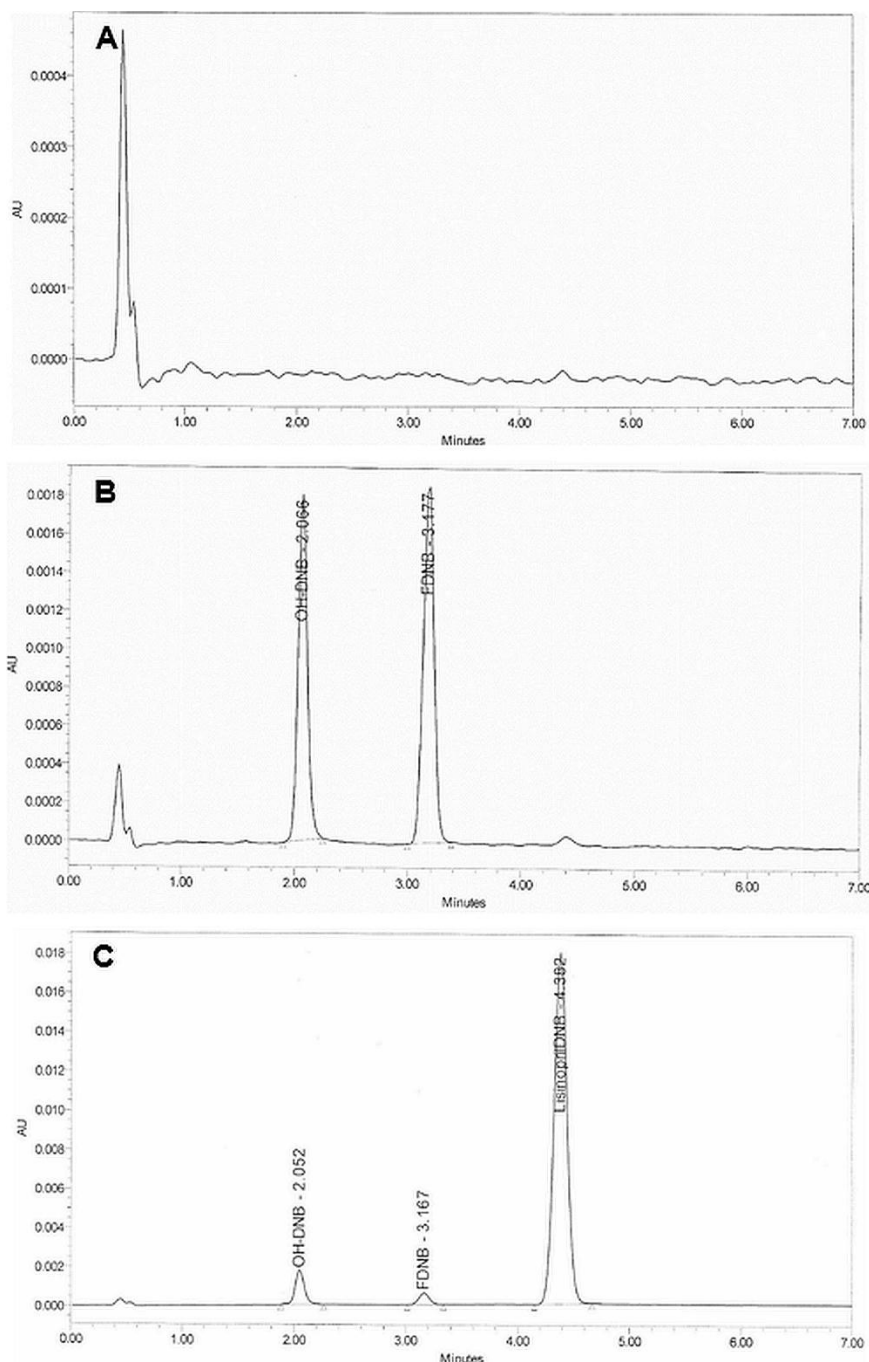


**Gambar 5.** Kromatogram lisinopril-DNB dan gabapentin-DNB pada fase gerak campuran buffer asetat (pH 3,5; 0,02 M):asetonitril = 50:50, laju alir 0,8 ml/menit dan panjang gelombang 353 nm

### 3.2.2. Bukti terjadinya reaksi derivatisasi terbentuk produk lisinopril-DNB

Gambar 6A menunjukkan bahwa lisinopril memberikan kromatogram tanpa puncak yang jelas, dikarenakan kurangnya gugus kromofor yang dimiliki oleh lisinopril. Gambar 6B menunjukkan kromatogram OH-DNB dengan  $R_t = 2,066$  menit dan FDNB  $R_t = 3,177$  menit, selanjutnya pada

Gambar 6C terlihat adanya puncak baru  $R_t = 4,302$  menit yang menunjukkan terbentuknya lisinopril-DNB. Bukti terjadinya produk derivatisasi secara spektrofotometer telah dijelaskan pada Gambar 1. Metode yang sama (spektrofotometri), juga digunakan untuk melihat terbentuk atau tidaknya produk derivatisasi dari gabapentin, amlodipin, enalapril dan metoprolol dengan FDNB (Tabel 1).



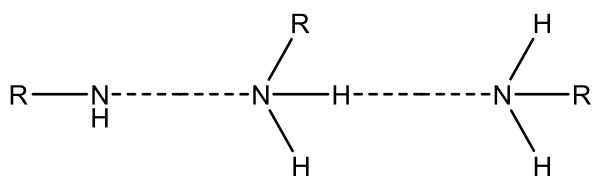
**Gambar 6.** Kromatogram lisinopril (A), FDNB (B), dan lisinopril-DNB (C) pada fase gerak bufer asetat (0,01 M; pH 3,5):asetonitril:metanol = 70:15:15, laju alir 0,3 ml/menit dan detektor UV 296 nm

**Tabel 1.** Perbandingan reaksi dengan pelarut air dan pelarut metanol pada reaksi derivatisasi dengan 1-fluoro-2,4-dinitrobenzene (FDNB)

Senyawa	Reaksi derivatisasi dengan pelarut air	Reaksi derivatisasi dengan pelarut metanol
Lisinopril	Positif, memerlukan pemanasan	Positif, tanpa pemanasan
Gabapentin	Positif, memerlukan pemanasan	Positif, tanpa pemanasan
Amlodipin	Negatif	Positif, tanpa pemanasan
Metoprolol	Negatif	Positif, tanpa pemanasan
Enalapril	Negatif	Positif, tanpa pemanasan

### 3.3. Perbandingan reaksi beberapa senyawa dengan pelarut aquades dan pelarut metanol pada reaksi derivatisasi dengan FDNB

Senyawa amin dalam larutan seperti amonia merupakan senyawa polar dan dapat membentuk ikatan hidrogen intermolekuler kecuali amonia tersier. Selain itu, amina primer, sekunder, dan tersier dapat juga membentuk ikatan hidrogen dengan air [20].



Fakta ini menjelaskan mengapa lisinopril dalam pelarut aquades pada reaksi derivatisasi pembentukan lisinopril-DNB memerlukan pemanasan, sedangkan pada pelarut metanol dapat beraksi tanpa pemanasan.

Pemanasan diperlukan pada reaksi derivatisasi dengan pelarut aquades karena diperlukan untuk memecah ikatan hidrogen intermolekuler lisinopril dan intramolekuler antara lisinopril dan air, setelah itu baru terjadi reaksi antara lisinopril dan FDNB yang merupakan reaksi Substitusi Nukleofilik bimolekuler ( $S_N2$ ). Sebenarnya pada pelarut metanol yang termasuk pelarut berproton dapat menurunkan kecepatan reaksi  $S_N2$  dengan cara solvasi, yaitu mengelilingi nukleofilik sambil membentuk ikatan hidrogen sehingga menstabilkan gugus nukleofilik dan pada akhirnya menurunkan kecepatan reaksi  $S_N2$  [20]. Pada pelarut metanol hanya terjadi ikatan hidrogen intramolekuler, sedangkan pada pelarut

aquades terjadi ikatan hirogen inter- dan intramolekuler. Fakta ini menjelaskan mengapa reaksi  $S_N2$  pada pelarut metanol lebih mudah terjadi dari pada pelarut aquades.

## 4. Kesimpulan

Reaksi derivatisasi lisinopril dengan FDNB lebih efektif menggunakan pelarut metanol dibandingkan pelarut aquades. Derivatisasi lisinopril dengan FDNB dalam pelarut metanol dapat dilakukan tanpa pemanasan serta lebih beragamnya senyawa yang dapat digunakan sebagai standar internal. Namun, penggunaan standar internal tidak diperlukan jika analisis dilakukan menggunakan UPLC dengan kolom Acquity BEH  $C_{18}$ . Namun tidak demikian halnya jika analisis dilakukan dengan menggunakan KCKT kolom Novapack  $C_{18}$ . Dengan KCKT penggunaan standar internal (gabapentin-DNB) diperlukan dan waktu analisis menjadi lebih panjang.

## Daftar pustaka

1. Badan Penelitian dan Pengembangan Kesehatan Departemen Kesehatan Republik Indonesia. Riset Kesehatan Dasar 2013. Jakarta; 2014.
2. Badan Penelitian dan Pengembangan Kesehatan Departemen Kesehatan Republik Indonesia. Riset Kesehatan Dasar 2007. Jakarta; 2008.
3. Akil MN, Bakri HS. Angiotensin Converting Enzyme Inhibitor (ACE-I) dan Proteksi Vaskular. *Cer-*

- min Dunia Kedokteran*. 2001;132:7-9.
4. Arsana PM. Peran ACE-Inhibitor selain antihipertensi. *Buletin Perkumpulan Endokrinologi Indonesia*. 2008; 22 Juli.
  5. Badan Pengawasan Obat dan Makanan Republik Indonesia. Obat Wajib Uji Bioekuivalensi. Jakarta; 2011.
  6. Tsakalof A, Bairachtari K, Georgarakis M. Development of a liquid chromatography-mass spectrometry method for monitoring the angiotensin-converting enzyme inhibitor lisinopril in serum. *J. Chromatogr. B*. 2008;783:425-432.
  7. Kousoulos C, Tsatsou G, Dotsikas, Loukas Y, Loukas YL. Development of a rapid liquid chromatography tandem mass spectrometry method for the determination of lisinopril, applicable for a bioequivalence study, employing a 96-well format solid phase extraction protocol. *Anal. Chim. Acta*. 2008;551:177-183.
  8. Sagirli O, Ersoy L. An HPLC method for the determination of lisinopril in human plasma and urine with fluorescence detection. *J. Chromatogr. B*. 2004;809:159-165.
  9. El-Emam AA, Hansen SH, Moustafa MA, El-Ashry SM, El-Sherbuny DT. Determination of lisinopril in dosage forms and spiked human plasma through derivatization with 7-chloro-4-nitrobenzo-2-oxa-1,3-diazole (NBD-Cl) followed by spectrophotometry or HPLC with fluorimetric detection. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 2004;34:35-44.
  10. Tan A, Hussain S, Musuku A, Massé R. Internal standard response variations during incurred sample analysis by LC-MS/MS: Case by case trouble-shooting. *J. Chromatogr. B*. 2009;877:3201-3209.
  11. El-Gindy A, Ashour A, Abdel Fattah L, Shabana MM. Spectrophotometric, Spectrofluorimetric and LC determination of lisinopril. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 2001;25:913-922.
  12. Paraskevas G, Atta-Politou J, Koupparis M. Spectrophotometric determination of lisinopril in tablets using 1-fluoro-2,4-dinitrobenzene reagent, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 2002;29:865-872.
  13. Abdel-Razak O, Belal SF, Bedair MM, Barakat NS, Haggag RS. Spectrophotometric and polarographic determination of enalapril and lisinopril using 2,4-dinitrofluorobenzene. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 2003;31:701-711.
  14. Toyo'oka T. (Editor). Modern Derivatization methods for separation Science. New York: John Wiley and Sons; 1999:102.
  15. Soury E, Jalalizadeh H, Shafiee A. Optimization of an HPLC Method for Determination of Gabapentin in Dosage forms through with 1-Fluoro-2,4-dinitrobenzene. *Chem. Pharm. Bull.* 2007;55(10):1427-1430.
  16. Jalalizadeh, Hassan, Soury, Effat, Tehrani, Maliheh Barazandeh, Jahangiri, Alireza. Validated HPLC method for the determination of gabapentin in human plasma using pre-column derivatization with 1-fluoro-2,4-dinitrobenzene and its application to a pharmacokinetic study. *J. Chromatogr. B*. 2007; 854:43-47.
  17. Effendi N. Validasi Penetapan Kadar Gabapentin terderivatisasi secara High Performance Liquid Chromatography dan aplikasinya dalam sediaan kapsul. Tesis. Universitas Gadjah Mada Yogyakarta; 2011.
  18. Sumiyani R, Martono S, Sugiyanto. Optimasi reaksi Lisinopril terderivatisasi 1-fluoro-2,4-dinitrobenzene dan standard internal pada Kromatografi Cair Kinerja Tinggi. disampaikan pada Seminar Nasional dan Talk Show Eksistensi Apoteker, Farmasi Komunitas di Era SJSN 2014, Universitas Gadjah Mada Yogyakarta, 20 Desember 2012.
  19. Nugraheni B, Martono S, Sugiyanto. Pengembangan dan validasi metode penetapan kadar metoprolol dalam spiked plasma dengan High Performance Liquid Chromatography yang didahului dengan derivatisasi menggunakan 1-fluoro-2,4-dinitrobenzene. disampaikan pada Seminar Nasional dan Talk Show Eksistensi Apoteker, Farmasi Komunitas di Era SJSN 2014, Universitas Gadjah Mada Yogyakarta, 20 Desember 2012.
  20. Riswiyanto. Kimia Organik. Jakarta: Erlangga; 2009.