

Validasi metode analisis Siklofosfamid dan 4-Hidroksisiklofosfamid dalam plasma in vitro secara kromatografi cair kinerja ultra tinggi-tandem spektrometri massa = Validation of analytical method of cyclophosphamide and 4-hydroxycyclophosphamide in plasma in vitro by ultra performance liquid chromatography tandem mass spectrometry

Nazulanita Rahma, author

Deskripsi Lengkap: <https://lib.ui.ac.id/detail?id=20386395&lokasi=lokal>

Abstrak

Siklofosfamid merupakan agen kemoterapi kanker yang memerlukan bioaktivasi oleh sitokrom P450 menjadi metabolit aktifnya yaitu 4-hidroksisiklofosfamid untuk menghasilkan efek sitotoksik. Penelitian ini bertujuan untuk memperoleh metode yang optimum dan tervalidasi dalam menganalisis siklofosfamid dan 4-hidroksisiklofosfamid secara simultan dalam plasma menggunakan metode kromatografi cair kinerja ultra tinggi tandem spektrometri massa. Pemisahan dilakukan dengan kolom Waters Acquity UPLC Class BEH C18 1,7 m (2,1 x 100 mm) yang dilindungi prekolom VanGuard™ BEH 1,7 m dengan fase gerak berupa asam format 0,1% - metanol dengan gradien elusi dan laju alir 0,2 mL/menit. Deteksi massa dilakukan dengan Waters Xevo TQD tipe Electrospray Ionization (ESI) positif pada mode Multiple Reaction Monitoring. Siklofosfamid dideteksi pada m/z 260,968 > 139,978; 4-hidroksisiklofosfamid-semikarbazida pada 338,011 > 224,979; dan parasetamol sebagai baku dalam pada 152,040 > 109,779. Senyawa 4-hidroksisiklofosfamid sangat tidak stabil dalam plasma dan karenanya diperlukan proses derivatisasi terlebih dulu. Derivatisasi dilakukan dengan semikarbazida-hidroklorida 2 M dalam dapar kalium fosfat 50 mM pH 7,4. Sampel plasma sebanyak 250 L yang telah diderivatisasi diekstraksi menggunakan 1 mL etil asetat, dilakukan pencampuran putar, dan sentrifugasi pada 3.000 rpm selama 10 menit. Metode ini linear pada rentang 50 ? 10.000 ng/mL dengan r 0,9999 untuk siklofosfamid dan 5 ? 500 ng/mL dengan r 0,9994 untuk 4-hidroksisiklofosfamid. Nilai % diff dan koefisien variasi (KV) untuk akurasi dan presisi intra hari dan antar hari selama tiga hari tidak lebih dari 15% dan tidak lebih dari 20% pada konsentrasi LLOQ. Secara keseluruhan, metode ini memenuhi persyaratan selektivitas, linearitas, akurasi, presisi, carry over, dan efek matriks sesuai EMEA Guidelines.

.....

Cyclophosphamide is an agent for cancer chemotherapy that requires bioactivation by cytochrome P450 to its active metabolite, 4-hydroxycyclophosphamide, to manifest its cytotoxic activity. The aim of this research is to develop an optimum and validated method on analyzing cyclophosphamide and 4-hydroxycyclophosphamide simultaneously using ultra performance liquid chromatography tandem mass spectrometry. Chromatographic separation was achieved by a Waters Acquity UPLC Class BEH C18 column (1.7 m, 50 mm x 2.1 mm) protected by a VanGuard™ BEH 1.7 m precolumn. The mobile phase consisted of formic acid 0.1% and methanol under gradient elution and flow rate of 0.2 mL/min. Mass detection was performed on Waters Xevo TQD equipped with an electrospray ionization (ESI) source at positive ion mode in the multiple reaction monitoring (MRM) mode. Cyclophosphamide was detected at m/z 260.968 > 139.978, 4-hydroxycyclophosphamide-semicarbazide at m/z 338.011 > 224.979, and paracetamol as internal standard at m/z 152.040 > 109.779. Due to the highly instability of 4-hydroxycyclophosphamide in plasma, it is necessary to undergo derivatization process. Derivatization was performed by 2 M

semicarbazide hydrochloride that was diluted with 50 mM potassium phosphate buffer pH 7.4. Plasma was extracted using 1 mL ethyl acetate, followed by whirl-mixing for 2 minutes, and centrifuged at 3000 rpm for 10 minutes. This method fulfill the acceptance criteria of linearity in range of 50 ? 10.000 ng/mL with r 0.9999 for cyclophosphamide and 5 ? 500 ng/mL with r 0.9994 for 4-hydroxycyclophosphamide. This method also fulfill the acceptance criteria for accuracy and precision within and between run in three days by % diff and coefficient of variation (CV) not more than 15% and not more than 20% for LLOQ concentration. Overall, this method fulfill the acceptance criteria for selectivity, linearity, accuracy, precision, carry over, and matrix effect based on EMEA Guidelines.