

# Validasi metode analisis siklofosfamid dan 4-hidroksisiklofosfamid dalam dried blood spot secara kromatografi cair kinerja ultra tinggi-tandem spektrometri massa = Analytical method validation of cyclophosphamide and 4 hydroxycyclophosphamide in dried blood spot by ultra performance liquid chromatography tandem mass spectrometry

Nurlita Gustiyanti, author

Deskripsi Lengkap: <https://lib.ui.ac.id/detail?id=20475095&lokasi=lokal>

---

## Abstrak

Siklofosfamid adalah kemoterapi yang bekerja sebagai agen pengalkilasi dan merupakan prodrug sehingga membutuhkan aktivasi oleh enzim sitokrom P450 untuk berubah menjadi metabolit aktifnya, yaitu 4-hidroksisiklofosfamid 4-OHCP. Tujuan penelitian ini adalah untuk memperoleh metode optimum dan tervalidasi untuk analisis siklofosfamid dan 4-OHCP dalam dried blood spot menggunakan Kromatografi Cair Kinerja Ultra Tinggi-Tandem Spektrometri Massa KCKUT-SM/SM. Penelitian siklofosfamid dan 4-hidroksisiklofosfamid secara simultan ini dikembangkan pertama kalinya dalam sampel dried blood spot. Metabolit 4-OHCP bersifat tidak stabil dalam cairan biologis, sehingga prosedur derivatisasi dilakukan sebelum analisis, yaitu menggunakan semikarbazid hidroklorida. Pemisahan dilakukan pada kolom UPLC Class BEH C18 menggunakan fase gerak asam format 0,01 dalam air-metanol 50:50 dengan mode elusi isokratik pada laju alir 0,3 mL/menit selama 4 menit. Deteksi massa dilakukan pada Waters Xevo TQD dengan Electrospray Ionization positif untuk siklofosfamid, 4-OHCP, dan heksametilfosforamid sebagai baku dalam dengan nilai m/z berturut-turut adalah 260,968 > 139,976; 338,011 > 224,979; dan 180,17 > 92,08. Ekstraksi dilakukan menggunakan metode pengendapan protein dengan pelarut metanol ? ?asetonitril 2:1. Metode ini linear pada rentang 50-30.000 ng/mL untuk siklofosfamid dan 10-1.000 ng/mL untuk 4-OHCP dengan r berturut-turut adalah 0,9972 dan 0,9984. Nilai LLOQ untuk siklofosfamid dan 4-OHCP berturut-turut adalah 50 ng/mL dan 10 ng/mL. Nilai diff dan KV untuk akurasi dan presisi intra hari dan antar hari tidak melebihi 15 dan tidak melebihi 20 pada konsentrasi LLOQ. Secara keseluruhan metode ini telah memenuhi persyaratan validasi yang mengacu pada European Medicines Agency Guidelines 2011.

.....

Cyclophosphamide is a chemotherapy that acts as an alkylating agent and a prodrug that requires activation by the cytochrome P450 enzyme to convert into its active metabolite, 4 hydroxycyclophosphamide 4 OHCP. The purpose of this research is to obtain the optimum and validated method for the analysis of cyclophosphamide and 4 OHCP in dried blood spots using Ultra Performance Liquid Chromatography Tandem Mass Spectrometry UPLC MS MS. This simultaneous cyclophosphamide and 4 OHCP study was developed for the first time in dried blood spot sample. The 4 OHCP metabolite is unstable in biological fluids, so the derivatization procedure was performed prior to analysis, using semicarbazide hydrochloride. The separation was performed on UPLC Class BEH C18 column using mobile phase of 0.01 formic acid in water methanol 50 50 with isocratic elution mode at 0.3 mL minute for 4 min. Mass detection was performed on Waters Xevo TQD with Positive Electrospray Ionization for cyclophosphamide, 4 OHCP, and hexamethylphosphoramide as internal standard with m z values respectively are 260.968 139.976 338.011 224.979 and 180.17 92.08. Extraction was performed using protein precipitation method with methanol acetonitrile 2 1. This method was linear in the range of 50 30,000 ng mL for cyclophosphamide and 10

1,000 ng mL for 4 OHCP with r respectively are 0.9972 and 0.9984. The LLOQ values for cyclophosphamide and 4 OHCP were 50 ng mL and 10 ng mL. The value of diff and CV for accuracy and precision intra days and between days did not exceed 15 and did not exceed 20 of LLOQ concentrations. Overall this method has met the validation requirements that refer to European Medicines Agency Guidelines 2011.