

# ANALISIS 6-MERKAPTOPURIN DAN 6-TIOGUANIN DALAM DRIED BLOOD SPOT DENGAN KROMATOGRAFI CAIR-TANDEM SPEKTROMETRI MASSA

Supandi<sup>1,2)</sup>, Yahdiana Harahap<sup>2)\*</sup>, Herman Suryadi<sup>2)</sup>, dan Cheputri Rahma<sup>2)</sup>

<sup>1)</sup>Program Studi Farmasi, Fakultas Farmasi dan Sains, Universitas Muhammadiyah Prof. DR. HAMKA

<sup>2)</sup>Program Studi Farmasi, Fakultas Farmasi, Universitas Indonesia

**ABSTARCT-** 6-Mercaptopurine (6-MP) is a chemotherapeutic drug that belongs to a class of purine antagonist antimetabolite used for acute lymphoblastic leukemia. 6-Mercaptopurine has to go through the metabolic pathway to become 6-Thioguanine nucleotide (active metabolites). This study aimed to analyzing 6-Mercaptopurine and 6-Thioguanine (6-TG) simultaneously in Dried Blood Spot (DBS) samples using liquid chromatography-tandem mass spectrometry. The quality control and calibration curve solutions were made by spot 60  $\mu$ L at DBS CAMAG paper and were dried for 3 hours. DBS papers were cut and extracted with methanol containing internal standard 5-fluorouracil (5-FU). Separation performed with Waters Acquity™ UPLC BEH Amide column 1.7  $\mu$ m (2.1 x 100 mm) with a mobile phase consists of 0.2 % formic acid in water – 0.1% formic acid in acetonitrile – methanol with gradient elution and flow rate 0.2 mL/minutes. Mass detection was done using Waters Xevo TQD with positive electrospray ionization (ESI) for 6-MP and 6-TG and negative ESI for 5-FU in Multiple Reaction Monitoring mode. Detection of 6-MP, 6-MMP, 5-FU respectively are 153,09 > 119,09; 168,09 > 107,06; 129,15 > 42,05. This method is linear with the range 25-1000 ng /mL for 6-MP and 6-TG with consecutive r value is  $\geq 0,996$  and  $\geq 0,995$ . Diff value percentage and coefficient of variation (CV) for accuracy and precision of intra-day and inter-day are not more than  $\pm 15\%$  and not more than  $\pm 20\%$  at a concentration LLOQ. This method fulfill the requirements of validation that refers to the European Medicines Agency guideline.

Keywords: 6-mercaptopurine, 6-thioguanine, analysis, dried blood spot

## Pendahuluan

Leukemia adalah penyakit yang menjangkit darah dan jaringan pembentuk darah di sumsum tulang belakang (Lockwood, 2015). Leukimia limfoblastik akut (LLA) memiliki prevalensi paling banyak yaitu 82% (Rini *et al*, 2009). Salah satu pengobatan kuratif untuk LLA adalah kemoterapi dengan 6-merkaptopurin (Katzung, 2012). 6-Merkaptopurin mengalami tiga jalur metabolisme. Pada jalur yang pertama, merkaptopurin berubah menjadi tiinosin monofosfat (TIMP) oleh enzim *hipoxantin fosforibosil transferase* (HPRT), dan selanjutnya akan diubah menjadi metabolit aktifnya yaitu 6-tioguanin nukleotida (TGN) yang mudah terhidrolisis menjadi 6-tioguanin (TG). Pada jalur kedua, 6-merkaptopurin akan di hidrosilasi oleh *xantin oksidase* (XO) menjadi metabolit yang tidak aktif yaitu asam 6-tiourat. Jalur terakhir 6-merkaptopurin akan dimetilasi menjadi 6-metilmerkaptopurin (6-MMP) oleh *tiopurin metiltransferase* (TPMT) (Su, Hon, Chu, Van De Poll, & Relling, 1999). Tingginya konsentrasi 6-TG

\* Penulis Koresponden, email: yahdina03@yahoo.com

memiliki korelasi dengan keberhasilan efikasi terapi dan tingginya konsentrasi 6-MMP berasosiasi dengan toksisitas hati (Al-Ghobashy et al., 2016). Sehingga diperlukan pemantauan terapi 6-merkaptopurin untuk mendapatkan informasi yang tepat terkait ketersediaan metabolit 6-merkaptopurin baik metabolit aktif maupun tidak aktif dalam terapi individual.

Secara umum sampel biologis diperoleh dengan metode biosampling invasif melalui vena (*venipuncture*), metode ini memiliki kelemahan diantaranya; volume sampel yang besar sekitar 3-4 mL, tidak efektif dalam penyimpanan dan distribusi, butuh tenaga ahli dan cukup menyakitkan bagi pasien/subyek (Spooner, Lad, & Barfield, 2009). Saat ini, berkembang metode biosampling dengan sampel darah kering (*Dried Blood Spot*). Metode ini memiliki keuntungan seperti; minimum invasif dengan menggunakan jarum lancet steril pada jari tangan, jari kaki atau tumit, volume sampel yang sedikit berkisar 10-100  $\mu$ L, efisiensi biaya penyimpanan dan pendistribusian, analit yang stabil, mengurangi risiko infeksi serta nyaman bagi subyek/pasien (Déglon, Thomas, Mangin, and Staub, 2012; Evans et al., 2015). Penggunaan metode sampel darah kering dalam bioanalisis memberikan penyederhanaan dalam proses pengumpulan darah dan analisis, dibandingkan metode konvensional (*Venipuncture*).

Analisis 6-merkaptopurin dan 6-tioguanin pernah dilakukan dalam sampel plasma menggunakan kromatografi cair kinerja-tandem spektrometri massa (Al-Ghobashy et al., 2016), dan dalam darah utuh (Zochowska et al., 2016). Sedangkan metode analisis pada sampel darah kering masih belum tersedia. Oleh karena itu, penelitian ini bertujuan untuk memperoleh metode analisis 6-merkaptopurin, 6-tioguanin dan 5-fluorourasil sebagai baku dalam secara simultan yang valid dalam sampel darah kering menggunakan kromatografi cair-tandem spektrometri massa.

## **Metode Penelitian**

### **Alat dan Bahan**

Seperangkat alat kromatografi cair-tandem spektrometri massa yang terdiri dari; quaternary solvent manager (Acquity UPLC H-Class), sample manager (Acquity UPLC), mass analyzer triple quadrupole (Xevo TQD), nitrogen generator compressor (PEAK Scientific), kolom Amida Waters Acquity 1,7  $\mu$ m; (2,1 mm x 100 mm).

Bahan yang digunakan; standar 6- merkaptopurin monohidrat, 6-tioguanin, 5-fluoro urasil (Sigma-Aldrich), asetonitril HPLC grade (Merck), metanol HPLC grade (Merck), asam formiat (Merck), Kertas filter (CAMAG DBS, Ahlstrom 226 grade), dan darah utuh (Palang Merah Indonesia).

### **Jalanya Penelitian**

Prosedur kerja pada penelitian eksperimen ini adalah sebagai berikut:

#### **Optimasi Deteksi pada Spektrometri Massa**

Larutan standar 6-merkaptopurin, 6-tioguanin dan 5-Fluorourasil pada konsentrasi 1,00  $\mu$ g/mL, masing-masing dimasukkan ke dalam reservoir. Larutan standar dialirkan ke dalam spektrometri massa dengan mode infuse, digunakan *electrospray ionization* (ESI) dan mode analisis *multiple reaction monitoring* (MRM). Hasil optimasi ditentukan berdasarkan nilai m/z dari ion induk dan ion produk yang memiliki respon tertinggi dan selektif yang digunakan dalam analisis.

#### **Optimasi Analisis Analit sampel darah kering**

Bercak sampel pada kertas yang berisi analit dengan konsentrasi masing-masing 1000 ng/mL diletakkan pada tabung sentrifugasi. Ditambahkan larutan pengekstraksi dan 100  $\mu$ L 5-fluorourasil 1000 ng/mL sebagai baku dalam, kemudian di kocok selama 30 detik dan disonikasi 25 menit pada suhu 55<sup>0</sup>C. Supernatan yang diperoleh diuapkan sampai kering dengan *turbovop evaporator* yang dialiri gas nitrogen pada suhu 40<sup>0</sup>C. Residu

direkonstitusi dengan 100  $\mu$ L asetonitril 10%, dikocok 30 detik dan sentrifugasi 5 menit pada 3100 rpm. Selanjutnya 5  $\mu$ L aliquot disuntikan ke dalam alat LC-MS/MS pada kondisi terpilih.

### Validasi Metode Bioanalisis

Validasi metode bioanalisis menurut *Guidline on Bioanalytical Method Validation* dari *European Medicines Agency* tahun 2011 yang meliputi; selektivitas, *carry-over*, penentuan batas kuantitasi lebih rendah (*lower limit of quantification/LLOQ*), kurva kalibrasi, akurasi, presisi, integritas pengenceran, efek matriks, dan stabilitas.

### Hasil dan Pembahasan

#### Deteksi Analit pada spektrometri massa

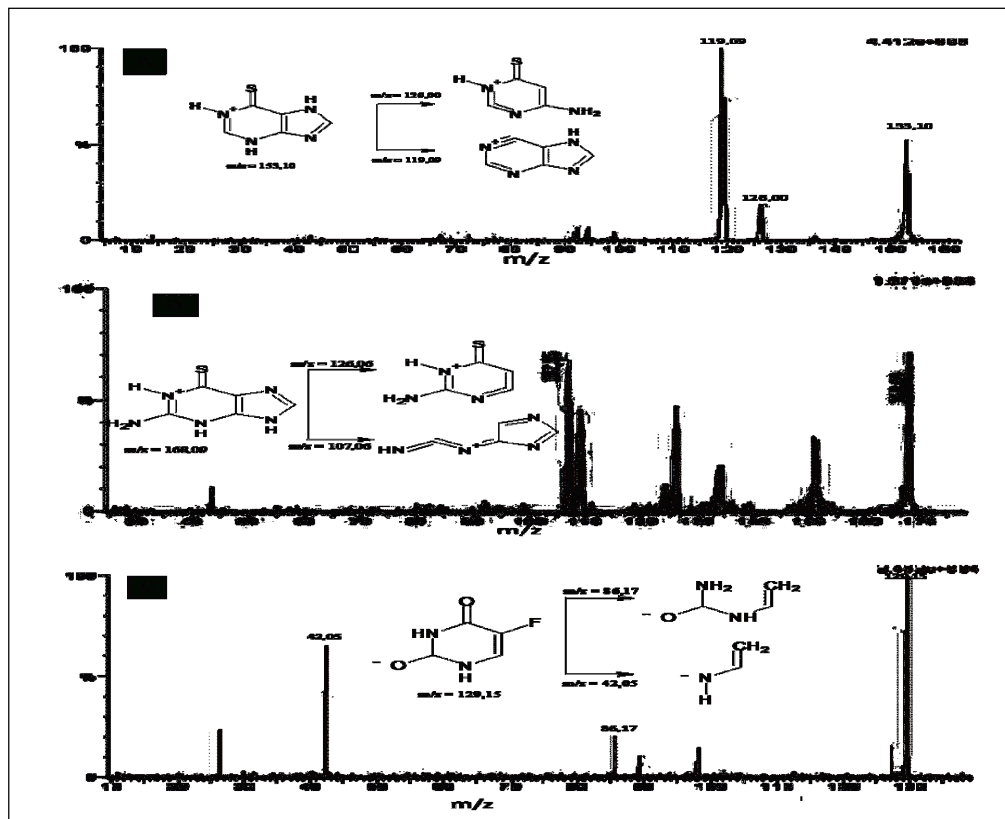
Penentuan nilai  $m/z$  suatu senyawa yang dianalisis dengan spektrometri massa perlu dilakukan untuk mendeteksi senyawa tersebut pada pecahan massa yang spesifik. Mode analisis yang digunakan adalah *Multiple Reaction Monitoring* (MRM), mode analisis ini memilih nilai  $m/z$  yang spesifik pada kedua penganalisis massa untuk menghasilkan nilai  $m/z$  dari ion induk dan  $m/z$  dari ion produk, sehingga identitas senyawa yang akan dianalisis menjadi selektif. Analisis yang selektif diperlukan dalam menganalisis lebih dari satu senyawa dalam satu sampel, seperti dalam penelitian ini yang menganalisis 6-merkaptopurin, 6-tioguanin nukleotida dan 5-fluorourasil sebagai baku dalam secara simultan. Deteksi 6-merkaptopurin dan 6-tioguanin menggunakan ionisasi positif (ESI +), sedangkan baku dalam menggunakan ionisasi negatif (ESI -). Nilai rasio  $m/z$  6-merkaptopurin, 6-tioguanin dan 5-fluorourasil berturut-turut adalah 153,10>119,09; 168,09>107,06; dan 129,15>42,05. Data optimasi analisis deteksi massa dapat dilihat di Tabel 1 dan Gambar 1.

Tabel I. Hasil optimasi deteksi  $m/z$  pada spektrometri massa

Senyawa	BM	ion induk ( $m/z$ )	Ion produk ( $m/z$ )	<i>Cone voltage</i>	<i>Collision energy</i>	Mode ion	area
6-MP	152	153,10	126,00	44	20	ESI +	4,41 e <sup>4</sup>
			<b>119,09</b>	<b>52</b>	<b>23</b>	<b>ESI +</b>	<b>4,41 e<sup>6</sup></b>
6-TG	167	168,09	<b>107,06</b>	<b>49</b>	<b>25</b>	<b>ESI +</b>	<b>1,07 e<sup>6</sup></b>
			126,03	50	25	ESI +	7,11 e <sup>5</sup>
5-FU	130	129,15	86,17	28	24	ESI -	1,21 e <sup>3</sup>
			<b>42,05</b>	<b>28</b>	<b>14</b>	<b>ESI -</b>	<b>9,48 e<sup>4</sup></b>

#### Optimasi Kondisi Analisis Sampel

Preparasi sampel dilakukan untuk menarik analit sekaligus membersihkan analit dari pengotor-pengotor pada matriks yang berpotensi mengganggu saat analisis. Dalam bioanalisis preparasi sampel diperlukan untuk meminimalisir pengotor yang dapat mengganggu analisis sekaligus meningkatkan konsentrasi analit dengan proses pemekatan dibawah aliran gas nitrogen. Penggunaan sampel darah kering (DBS) dapat meningkatkan kestabilan analit dalam sampel biologis. Hal ini dikarenakan pada sampel darah kering darah dalam bentuk padatan, sehingga sel-sel darah pecah menyebabkan aktivitas proteinnya berhenti dan enzim-enzim yang dapat mengkatalisis perubahan senyawa obat menjadi senyawa lain penyebab ketidakstabilan analit dalam sampel biologis tidak dapat bekerja (McDade, 2007). Sampel dalam kertas DBS yang sudah kering dilakukan Ekstraksi dengan pengendapan protein menggunakan pelarut organik.



Gambar 1. Spektrum massa dari 6-merkaptopurin (A), 6-tioguanin (B), dan 5-fluorourasil (C)

Proses ekstraksi analit dari sampel kertas DBS dioptimalkan dengan larutan pengestraksi dan sonikasi. Larutan pengestraksi yang digunakan yaitu metanol, asetonitril dan kombinasi asetonitril-metanol. Kemudian sampel di sonikasi selama 25 menit pada suhu 55 °C (data pada tabel 2).

Tabel 2. Hasil optimasi larutan pengestraksi

Larutan Pengestraksi	Area (µV/s)		
	6-MP	6-TG	5-FU
Metanol 2 mL	9476	20780	1089
Asetonitril 2 mL	2124	2564	1343
Metanol-Asetonitril (3:1)	5832	14130	1022
Metanol-Asetonitril (1:1)	5951	12744	834
Metanol-Asetonitril (1:3)	4346	11942	1199

### Validasi metode analisa

#### Selektivitas

Uji selektivitas bertujuan melihat kemampuan metode bioanalisis untuk mengukur dan membedakan analit yang diuji dan baku dalam yang digunakan dengan adanya komponen lain yang terdapat dalam sampel. Uji selektivitas dilakukan dengan menganalisis analit pada blangko darah dari 6 sampel yang berbeda sumbernya menggunakan konsentrasi lebih rendah (LLOQ). Hasil analisis menyatakan interferensi pada blangko sampel yang berbeda sumbernya (golongan darah dan nilai hematokrit) tidak melebihi ± 20 % dari area analit dan ± 5 % dari area baku dalam pada konsentrasi LLOQ. Pada 6-merkaptopurin diperoleh nilai selektivitas 7,82% - 14,22%, dan 6-tioguanin diperoleh nilai 1,49%–6,92%. Sedangkan baku dalam diperoleh nilai selektivitas 1,38% – 4,91%. Pengujian pada konsentrasi LLOQ menunjukkan metode yang digunakan dalam penelitian ini

memenuhi kriteria selektif. Variasi golongan darah dan nilai hematokrit pada blangko darah yang digunakan untuk uji selektifitas menghasilkan penyebaran dan homogenitas bercak sampel pada kertas DBS masih memenuhi kriteria uji selektifitas dengan nilai akurasi dan presisi tidak melebihi 20%. Hal ini menunjukkan aplikasi metode DBS secara *in vivo* memberikan selektifitas yang baik dengan adanya variasi golongan darah dan nilai hematokrit pasien (data pada tabel 3).

Tabel 3. Hasil selektivitas.

Darah Utuh (gol. Darah, nilai Hct)	Area Blangko			Area LLOQ			% Selektivitas		
	6-MP	6-TG	5-FU	6-MP	6-TG	5-FU	6-MP	6-TG	5-FU
A (B, 29%)	117 173	29 16	37 27	1290 1340	1187 1068	1114 1028	9,10 12,92	2,46 1,49	3,34 2,67
B (B, 32%)	181 144	61 23	30 50	1269 1170	1256 1105	1176 1056	14,23 12,32	4,78 2,06	2,52 4,76
C (A, 35%)	156 129	68 30	22 51	1209 1299	1285 1145	1214 1048	12,94 9,69	5,31 2,63	1,83 4,91
D (B, 40%)	101 168	89 79	23 21	1295 1214	1293 1677	1215 1533	7,82 13,81	6,92 4,68	1,91 1,38
E (O, 41%)	173 117	28 42	64 30	1363 1369	1399 1187	1308 1079	12,65 8,51	1,98 3,52	4,87 2,80
F (AB, 44%)	162 153	36 86	67 42	1192 1247	1609 1326	1489 1183	13,63 12,26	2,25 6,49	4,51 3,58

### Carry-over

Parameter *carry-over* untuk melihat adanya komponen yang terbawa dari analit dan baku dalam pada penyuntikan selanjutnya setelah penyuntikan analit pada konsentrasi lebih tinggi (*Upper Limit of Quantification/ULOQ*). Analisis dilakukan dengan menyuntikan blangko setelah penyuntikan sampel analit pada konsentrasi ULOQ. Area analit yang terdapat pada blangko tidak boleh melebihi 20% dari area LLOQ dan area baku dalam tidak boleh melebihi 5%. Konsentrasi analit 1000 ng/mL memberikan hasil *carry-over* 6-merkaptopurin sebesar 7,46% - 15,02%, 6-tioguanin sebesar 0,48% - 8,66% dan 6baku dalam sebesar 1,89% - 4,66%.

### Kurva kalibrasi, linieritas, dan LLOQ

Kurva kalibrasi dilakukan pada konsentrasi LLOQ dan 6 seri konsentrasi analit, dilakukan juga terhadap blangko (matriks tanpa analit dan baku dalam) dan zero (matriks dengan baku dalam).

Diperoleh rentang kurva kalibrasi 6-merkaptopurin dan 6-metilmerkaptopurin 25-1000 ng/mL, yaitu; 25, 50, 100, 200, 500, 800, dan 1000 ng/mL. Koefisien korelasi untuk 6-merkaptopurin adalah 0,9981 dengan persamaan regresi linier yaitu  $y = 0,0193x + 0,5789$ , pada 6-tioguanin diperoleh Koefisien korelasi 0,9964 dengan persamaan regresi linier yaitu  $y = 0,0222x + 0,4307$ .

Penentuan LLOQ untuk memastikan konsentrasi terendah dari analit yang masih terukur secara kuantitatif dan memenuhi persyaratan akurasi-presisi. Nilai LLOQ sebagai konsentrasi terendah dari rentang kurva kalibrasi. Pada penelitian ini diperoleh LLOQ 6-merkaptopurin sebesar 25 ng/mL dengan %KV 11,32 % dan %diff -21,83% - 14,39%. Sedangkan 6-tioguanin diperoleh LLOQ 25 ng/mL dengan %KV 11,93% dan %diff -14,85% - 9,307%.

**Akurasi dan presisi**

Akurasi merupakan kedekatan nilai yang diperoleh dengan metode yang digunakan terhadap nilai konsentrasi analit yang sebenarnya. Sedangkan presisi merupakan kedekatan dari keterulangan pengukuran setiap individu analit. Uji ini dilakukan pada 4 konsentrasi, *lower limit of quantification* (LLOQ), *quality control low* (QCL), *quality control medium* (QCM), dan *quality control high* (QCH). Hasil penelitian akurasi *within-run* 6-merkaptopurin konsentrasi LLOQ diperoleh nilai % *diff* -12,58- 14,40% dan pada konsentrasi QCL, QCM dan QCH adalah -10,66% - 12,63%. Sedangkan pada 6-tioguanin nilai %*diff* pada konsentrasi LLOQ sebesar -17,79% -9,76% dan pada konsentrasi QCL, QCM dan QCH adalah -6,22% -11,84%. Uji presisi *within-run* 6-merkaptopurin diperoleh nilai %KV 10,28% pada LLOQ, dan pada konsentrasi QCL, QCM, dan QCH adalah 3,33% -9,70%. Sedangkan nilai %KV untuk 6-tioguanin adalah 13,25% pada LLOQ, dan pada konsentrasi QCL, QCM, dan QCH 5,24% -6,99%. Selanjutnya, uji akurasi dan presisi *between-run* pada 6-merkaptopurin diperoleh nilai %*diff* pada konsentrasi LLOQ -15,48% - 17,81% dan pada konsentrasi QCL, QCM, dan QCH adalah -12,50% -12,63%. Nilai %KV diperoleh 10,93% pada LLOQ, dan pada QCL, QCM, dan QCH adalah 6,46% - 8,32%. Hasil uji akurasi dan presisi *between-run* 6-tioguanin diperoleh nilai % *diff* pada konsentrasi LLOQ -18,61% - 13,32% dengan nilai %KV sebesar 10,83% dan nilai % *diff* pada konsentrasi selain QCL, QCM, dan QCH adalah -13,20% -11,84% dengan nilai % KV sebesar 7,03%-8,09. Hasil uji akurasi dan presisi *whitin-run* dan *beetwen-run* memenuhi persyaratan nilai %KV dan %*diff* tidak lebih besar dari  $\pm 20\%$  untuk LLOQ dan tidak lebih besar dari  $\pm 15\%$  untuk konsentrasi lainnya (data pada tabel 4 dan 5).

Tabel 4. Hasil akurasi dan presisi *whitin-run* dan *between-run* 6-merkaptopurin.

Analit	Konsentrasi seungguhnya (ng/mL)	Rata-rata Konsentrasi yang diperoleh (ng/mL) $\pm$ SD (n=5)	Presisi (%KV)	Presisi (%diff)
<i>Whitin-run</i>	LLOQ (25)	24,55 $\pm$ 2,52	10,28	-12,58- 14,40
	QCL (100)	105,65 $\pm$ 5,93	5,61	-1,55 - 12,24
	QCM (500)	509,55 $\pm$ 49,43	9,70	-10,66 - 12,63
	QCH (800)	794,65 $\pm$ 26,45	3,33	-4,73 - 3,86
<i>Between-run</i>	LLOQ (25)	24,69 $\pm$ 2,70	10,93	-15,48 - 17,81
	QCL (100)	103,84 $\pm$ 6,71	6,46	-6,58 - 12,24
	QCM (500)	498,17 $\pm$ 41,42	8,32	-10,66 - 12,63
	QCH (800)	801,50 $\pm$ 54,29	6,77	-12,50 - 8,74

Keterangan; *lower limit of quantification* (LLOQ), *quality control low* (QCL), *quality control medium* (QCM), dan *quality control high* (QCH)

Tabel 5. Hasil akurasi dan presisi *whitin-run* dan *between-run* 6-tioguanin

Analit	Konsentras i sesungguhnya (ng/mL)	Rata-rata Konsentrasi yang diperoleh (ng/mL) $\pm$ SD (n=5)	Pr esisi (%KV)	Presisi (%diff)
<i>Whitin- run</i>	LLOQ (25)	23,97 $\pm$ 3,18	13, 25	-17,79 - 9,76
	QCL (100)	99,23 $\pm$ 6,99	6,9	-5,99 - 11,11
	QCM (500)	505,62 $\pm$ 35,14	6,6	-6,22 - 11,55
	QCH (800)	836,39 $\pm$ 43,82	5,2	-1,09 - 11,84
				4

<i>Between-run</i>	LLOQ (25)	24,26 ± 2,62	10,82	-18,61 - 13,32
	QCL (100)	99,26 ± 7,34	7,39	-11,20 - 11,11
	QCM (500)	486,68 ± 39,39	8,09	-13,20 - 8,69
	QCH (800)	787,72 ± 55,41	7,03	-12,94 - 11,84

Keterangan; *lower limit of quantification* (LLOQ), *quality control low* (QCL), *quality control medium* (QCM), dan *quality control high* (QCH)

### Efek matrik

Uji efek matriks dilakukan untuk mengetahui efek ionisasi yang terjadi pada analit dan baku dalam dengan adanya komponen-komponen lain di dalam matriks pada sampel. Uji ini wajib dilakukan untuk metode analisis menggunakan spektrometri massa (EMA, 2011). Efek matriks dinyatakan dengan faktor matriks, diperoleh berdasarkan persentase area analit dan baku dalam pada matriks setelah proses ekstraksi terhadap area analit dan baku dalam tanpa matriks. Uji efek matriks dilakukan pada konsentrasi rendah (QCL) dan konsentrasi tinggi (QCH).

*Ion suppression* adalah terjadinya penekanan ionisasi analit dan baku dalam selama proses analisis menggunakan spektrometri massa. Penekanan ionisasi terjadi apabila faktor matriks yang diperoleh kurang dari 100%, sedangkan peningkatan ionisasi analit dan baku dalam oleh matriks apabila faktor matriks yang diperoleh lebih dari 100%. Hasil pengujian diperoleh faktor matriks 6-merkaptopurin QCL 76% dan QCH 81%, dan pada 6-tioguanin QCL 79% dan QCH 77%. Faktor matriks untuk baku dalam diperoleh 88%. Hasil ini menunjukkan komponen-komponen lain di dalam matriks menghalangi proses ionisasi analit dan baku pada analisis spektrometri massa sehingga terjadi penekanan ionisasi. Terjadinya penekanan ionisasi masih dapat diterima, karena nilai %KV analit dan baku dalam yang diperoleh dari analisis 6 sumber matriks berbeda tidak melebihi 15% (data pada tabel 6).

Tabel 6. Hasil efek matriks.

Darah	Konsentrasi (ng/mL)	FM (%)			MEIS		
		6-MP	6-TG	5-FU	6-MP	6-TG	
1	QCL (100)	87	83,5	94	0,93	0,88	
		2	82,5	76,5	94	0,88	0,81
		3	72	82,5	82	0,88	1,01
		4	74,5	83	87,5	0,85	0,95
		5	73,5	74	84,5	0,87	0,88
		6	70,5	75	84	0,84	0,89
1	QCH (800)	85	75	94	0,90	0,80	
		2	83	78	94	0,88	0,83
		3	86	79	82	1,05	0,96
		4	76	74,5	87,5	0,87	0,85
		5	82	79,5	84,5	0,97	0,94
		6	72,5	77,5	84	0,86	0,92

Keterangan; Faktor matriks (FM), Faktor matrikternormalisasi baku dalam (MEIS), *quality control low* (QCL), dan *quality control high* (QCH)

### Integritas pengenceran

Parameter ini bertujuan untuk mengetahui pengenceran sampel dalam analisis tidak mempengaruhi akurasi dan presisi. Integritas pengenceran dilakukan pada konsentrasi

lebih tinggi ULOQ, kemudian diencerkan  $\frac{1}{2}$  dan  $\frac{1}{4}$  kali dengan matriks, diperoleh konsentrasi pengenceran 800 ng/ mL dan 400 ng/mL untuk kedua analit. Analisis dilakukan 5 replika setiap konsentrasinya.

Diperoleh hasil uji integritas pengenceran memenuhi persyaratan untuk kedua analit, pada setengah ULOQ adalah 4,457% KV dan -6,73 -3,85% diff untuk 6-MP, 2,56% CV dan -1,19 – 5,19% diff untuk 6-tioguanin. Pada konsentrasi seperempat ULOQ adalah 5,28% KV dan -7,98 – 4,38% diff untuk 6-MP 7,72% KV dan -12,31 – 6,32% diff untuk 6-tioguanin.

### Stabilitas

Pengujian larutan stok analit dan baku dalam dilakukan secara terpisah dengan konsentrasi masing-masing 1000 $\mu$ g/mL . Larutan tersebut disimpan pada suhu kamar selama 24 jam untuk pengujian jangka pendek, untuk mengetahui apakah larutan stok stabil pada suhu kamar. Diperoleh nilai %diff dari larutan stok 6-merkaptopurin -2,00% - -1,96%, 6-tioguanin -1,03% - -0,80%, dan baku dalam -0,2% - 1,5%. Nilai %KV 6-merkaptopurin 0,03%, 6-tioguanin 0,17%, dan baku dalam 0,39%. Larutan induk analit dan baku dalam stabil di pada suhu kamar selama 24 jam penyimpanan.

Dilakukan juga pengujian stabilitas larutan stok pada suhu -20°C selama 20 hari. Hasil stabilitas yang diperoleh untuk pengujian jangka panjang untuk 6-merkaptopurin hasil %diff adalah -0,74% - -0,40% dengan %KV sebesar 0,24%. Kemudian untuk 6-tioguanin diperoleh %diff sebesar -0,50% - -0,12% dengan %KV sebesar 0,27%, sedangkan untuk baku dalam 5-fluorourasil %diff adalah -1,98% - -1,56%. Dari data stabilitas induk jangka panjang disimpulkan bahwa larutan stok stabil selama 20 hari di suhu -20°C.

Stabilitas jangka pendek dilakukan dengan membiarkan kertas DBS yang sudah ditotolkan dengan darah pada konsentrasi QCL dan QCH pada suhu kamar dengan rentang waktu 0 jam, 6 jam, dan 24 jam. Persyaratan dari stabilitas adalah nilai %diff tidak lebih dari 15%. Hasil uji stabilitas jangka pendek 6 merkaptopurin diperoleh hasil %diff pada konsentrasi QCL -6,58% - 8,94%, sedangkan pada konsentrasi QCH diperoleh hasil -12,50 - -3,73. Hasil stabilitas jangka pendek 6-tioguanin pada konsentrasi QCL diperoleh nilai %diff -6,74% - 9,63%, sedangkan pada konsentrasi QCH diperoleh nilai -12,94% - -9,94%. Dari hasil yang diperoleh didapatkan semua hasil %diff baik dari 6-merkaptopurin maupun 6-tioguanin diperoleh hasil dibawah 15% sehingga dapat disimpulkan bahwa analit akan stabil pada kertas DBS yang telah dikeringkan selama 24 jam.

Stabilitas jangka panjang dilakukan dengan membiarkan kertas DBS yang sudah ditotolkan dengan darah pada konsentrasi QCL dan QCH pada suhu kamar. Penyuntikan dilakukan pada hari ke-0 dan ke-16. Dari hasil penelitian nilai % diff larutan kontrol konsentrasi rendah dan tinggi 6-merkaptopurin masih stabil hingga hari ke-16 dengan nilai % diff berturut-turut yaitu 6,93% hingga 9,08% dan 10,49% hingga 12,58%. Hasil penelitian nilai % diff larutan control konsentrasi rendah dan tinggi 6-tioguanin masih stabil hingga hari ke-16 dengan nilai % diff berturut-turut yaitu -1,69% hingga 3,71% dan 1,49% hingga 8,03%. Sehingga dapat disimpulkan 6-merkaptopurin dan 6-tioguanin dalam sampel darah kering stabil hingga minimum 16 hari.

Stabilitas pasca preparasi (*autosampler*) bertujuan mengetahui lama penyimpanan di dalam *autosampler* yang masih bisa digunakan setelah plasma diekstraksi. Uji dilakukan menggunakan konsentrasi QCL dan QCH yang telah diekstraksi dan siap disuntikkan lalu dianalisis pada jam ke-0 dan dibiarkan berada pada *autosampler* selama 24 jam. Hasil uji stabilitas *autosampler* 6-merkaptopurin diperoleh hasil %diff pada konsentrasi QCL -5,66 % s.d. 10,95%, sedangkan pada konsentrasi QCH diperoleh hasil -4,29 s.d. 3,92%. Dari

hasil yang diperoleh didapatkan semua hasil %diff baik dari 6-merkaptopurin maupun 6-tioguanin diperoleh hasil di bawah 15%. Dengan demikian dapat dinyatakan analit stabil selama 24 jam penyimpanan di *autosampler*.

### Kesimpulan

Analisis 6-MP dan 6-TG dalam *dried blood spot* dengan 5-fluorourasil sebagai baku dengan secara kromatografi cair-tandem spektrometer massa dapat dilakukan secara simultan yang memenuhi persyaratan validasi berdasarkan EMEA *bioanalytical guideline* tahun 2011.

### Daftar Pustaka

- Al-Ghobashy, M. A., Hassan, S. A., Abdelaziz, D. H., Elhosseiny, N. M., Sabry, N. A., Attia, A. S., & El-Sayed, M. H. (2016). Development and validation of LCMS/MS assay for the simultaneous determination of methotrexate, 6-mercaptopurine and its active metabolite 6-thioguanine in plasma of children with acute lymphoblastic leukemia: Correlation with genetic polymorphism. *Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences*, 1038, 88–94.
- Déglon, J., Thomas, A., Mangin, P., & Staub, C. (2012). Direct analysis of dried blood spots coupled with mass spectrometry: Concepts and biomedical applications. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 402(8), 2485–2498.
- Evans, C., Arnold, M., Bryan, P., Duggan, J., James, C. a, Li, W., & Zane, P. (2015). Implementing Dried Blood Spot Sampling for Clinical Pharmacokinetic Determinations: Considerations from the IQ Consortium Microsampling Working Group. *The AAPS Journal*, 17(2), 292–300.
- Katzung, B. G., Susan, B., Masters, T., & Anthony, J. (2012). *Basic and clinical Pharmacology* (Twelfth Ed). Mc. Graw Hill Medical.
- Lockwood, W., 2015, *Leukemia: AML, CML, ALL and CLL*, (Cml), 1–32.
- Rini, T. A., Aisyi, M., Sari, Y., & Edi, S.T. (2009). Karakteristik Leukemia Limfoblastik Akut pada Anak di Rumah Sakit Kanker Dharmais 2000-2008. *Ind J Cancer*, 4, 4: 137-140.
- Spooner, N., Lad, R., & Barfield, M. (2009) Dried blood spots as a sample collection technique for the determination of pharmacokinetics in clinical studies: considerations for the validation of a quantitative bioanalytical method. *Analytical Chemistry*, 81(4), 155.
- Su, Y., Hon, Y. Y., Chu, Y., Poll, M. E. C., & Relling, M. V. (1999). Assay of 6-mercaptopurine and its metabolites in patient plasma by high-performance liquid chromatography with diode-array detection. *Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences*, 732, 459–468.
- Zochowska, D., Zegarska, J., Hryniewiecka, E., Samborowska, E., Jazwiec, R., Tszysznyc, W., & Paczek, L. (2016). Determination of Concentrations of Azathioprine Metabolites 6-Thioguanine and 6-Methylmercaptopurine in Whole Blood With the Use of Liquid Chromatography Combined With Mass Spectrometry. *Transplantation Proceedings*, 48(5), 1836–1839.

