

LIQUID CHROMATOGRAPHY-TANDEM MASS SPECTROMETRY (LC-MS/MS)



Prof. Dr. A.A. Kade Harmita, Apt
Prof. Dr. Yahdiana Harahap, M.Si., Apt
Dr. Supandi, M.Si., Apt

Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry (LC-MS/MS)

ISBN - 978-602-17850-7-2

Oleh:

Prof. Dr. A.A. Kade Harmita, Apt
Prof. Dr. Yahdiana Harahap, M.Si., Apt
Dr. Supandi, M.Si., Apt

 **Gisfi Penerbitan**
Innovative Scientific Futuristic Informative

Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry (LC-MS/MS)

ISBN - 978-602-17850-7-2

Penulis :

Prof. Dr. A.A. Kade Harmita, Apt
Prof. Dr. Yahdiana Harahap, M.Si., Apt
Dr. Supandi, M.Si., Apt

Diterbitkan pertamakali oleh :
PT. ISFI Penerbitan
Pebruari 2019

Cetakan pertama Pebruari 2019

@ Penerbit PT. ISFI Penerbitan
Jl. Wijaya Kusuma No. 17 Tomang Jakarta Barat 11420
Telp/fax : 021-569 43842
e-mail: ptisfipenerbitan@yahoo.com
websiteside: www.ikatanapotekerindonesia.net

Cover : Ramli Badrudin

Sanksi Pelanggaran Pasal 72 | Undang-undang Nomor 19 Tahun 2002 | Tentang Hak Cipta

1. Barang siapa dengan sengaja melanggar dan tanpa hak melakukan perbuatan sebagaimana dimaksud dalam Pasal 2 Ayat (1) atau Pasal 49 Ayat (1) dan Ayat (2) dipidana dengan pidana penjara masing-masing paling singkat 1 (satu) bulan dan/atau paling lama 7 (tujuh) tahun dan/atau denda paling banyak Rp.5.000.000.000,- (lima miliar rupiah).
2. Barang siapa dengan sengaja menyiarkan, memamerkan, mengedarkan atau menjual kepada umum suatu ciptaan atau barang hasil pelanggaran Hak Cipta atau hak terkait sebagai dimaksud dalam Ayat (1), dipidana dengan pidana penjara paling lama 5 (lima) tahun dan/atau denda paling banyak Rp.500.000.000,- (lima ratus juta rupiah).

KATA PENGANTAR

Penggunaan kromatografi cair tandem-spektrometri massa atau *liquid chromatography tandem-mass spectrometry* (LC-MS/MS) semakin meningkat akhir-akhir ini, disebabkan semakin kecilnya dosis obat dan semakin kompleksnya komposisi obat yang beredar saat ini. Penggunaan LC-MS/MS dapat dilakukan tanpa proses derivatisasi atau cara lain untuk meningkatkan polaritas sampel atau fase gerak, hal ini disebabkan karena alat tersebut dapat merubah sampel menjadi ion yang mampu diseteksi oleh detektor. Beberapa cara untuk merubah sampel menjadi ion dapat dilakukan dengan ESI (*Electrospray Ionization*), APCI (*Atmospheric Pressure Chemical Ionization*), APPI (*Atmospheric Pressure Photo Ionization*) atau MALDI (*Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization*) yang masing-masing memiliki kelebihanannya.

Semakin banyak penelitian yang menggunakan alat ini, berarti sangat dipeerlukan pengenalan akan teori dasar alat LC-MS/MS agar sumberdaya manusia kita tidak tertinggal dalam menghadapi persaingan ditingkat ASEAN maupun global. Dengan semakin banyaknya penggunaan alat ini, maka akan memberikan banyak keuntungan bagi kemajuan bangsa ini karena kita dapat mendeteksi ketidakmurnian dan ketidakhalalan suatu produk dari kemampuan deteksinya yang sampai permilyar (bpm/ppb).

Buku ini dapat digunakan oleh mahasiswa S1, S2 dan S3 bidang Kimia, Farmasi, Biologi atau lainnya yang sedang mengikuti pendidikan maupun menyelesaikan penelitiannya. Bab 2 dijelaskan mengenai kromatografi cair kinerja ultra tinggi sebagai dasar untuk mengetahui proses pemisahan, jenis-jenis kolom, jenis-jenis detector, perhitungan kuantitatif dan validasi metode analisis. Bab 3 dijelaskan tentang spektrometri massa, proses pembentukan ion induk dan ion produk. Bab 4 dijelaskan mengenai LC-MS dan LC-MS/MS secara utuh, bagaimana memilih fase gerak, jenis kolom, pembentukan ion positif dan ion negatif, bagaimana pemanfaatan untuk tujuan kualitatif dan kuantitatif. Bab 5 dijelaskan pemanfaatan LC-MS/MS untuk analisis dalam sediaan farmasi dalam bentuk sirup dan bentuklainnya lengkap dengan perhitungannya. Bab 6 dijelaskan pemanfaatan LC-MS/MS untuk analisis obat dalam sediaan biologis beserta data-data dan perhitungannya. Bab 7 diberikan contoh-contoh bentuk ion induk dan ion produk dari molekul obat dan kondisi analisisnya.

Semoga buku ini dapat membuka lebih luas lagi pengetahuan dan keingintahuan kita semua, dan dapat membantu meningkatnya sumber daya manusia Indonesia.

Penulis

DAFTAR ISI

	Halaman
KATA PENGANTAR	ii
DAFTAR ISI	iv
DAFTAR TABEL	v
DAFTAR GAMBAR	vi
BAB 1. PENDAHULUAN	1
BAB 2. KROMATOGRAFI CAIR KINERJA TINGGI	4
A. KROMATOGRAFI CAIR KINERJA ULTRA TINGGI	4
B. VALIDASI METODE ANALISA	19
BAB 3. SPEKTROMETER MASSA	26
A. SUMBER PENGION	26
B. PENGANALISIS MASSA	29
C. DETEKTOR	38
D. KONFIGURASI PENGANALISIS MASSA	41
E. PEMELIHARAAN SPEKTROMETER MASSA	56
BAB 4. KROMATOGRAFI CAIR KINERJA ULTRA TINGGI TANDEM- SPEKTROMETER MASSA	64
A. MODE ANALISIS	70
B. JENIS DAN BENTUK ION	73
C. CARA KERJA DAN PENYIAPAN SAMPEL.....	74
D. DATA KROMATOGRAM YANG DIPEROLEH	85
E. ANALISA KUALITATIF DAN KUANTITATIF	85
BAB 5. PEMANFAATAN KCKUT-SM/SM UNTUK ANALISA SEDIAAN OBAT	88
A. ANALISA MULTIVITAMIN DALAM SEDIAAN SIRUP	89
B. ANALISA SEDIAAN OBAT	97
BAB 6. PEMANFAATAN KCKUT-SM/SM UNTUK ANALISA OBAT DALAM SAMPel BIOLOGIS	98
A. ANALISA SAMPEL BIOLOGIS	99
B. VALIDASI METODE BIOANALISIS	104
BAB 7. ION INDUK DAN ION PRODUK MOLEKUL OBAT	108
DAFTAR PUSTAKA	114

DAFTAR TABEL

	Halaman
Tabel 2.1. Kolom Silika	11
Tabel 2.2. Karakteristik validasi pada kategori menurut USP	21
Tabel 3.1. Tipe Penganalisis Massa pada Spektrometri Massa	30
Tabel 4.1. Hasil kurva kalibrasi 6-merkaptopurin	85
Tabel 4.2. Hasil kurva kalibrasi 6-metilmerkaptopurin	87
Tabel 4.3. Hasil Analisis Sampel	87
Tabel 5.1. Rasio m/z analit dengan mode <i>multiple reaction monitoring</i> (MRM)	90
Tabel 5.2. Kurva Kalibrasi Analit Vitamin	92
Tabel 5.3. Efek Matriks Analit Vitamin	92
Tabel 5.4. Pesisir Analit Vitamin	93
Tabel 5.5. Perolehan kembali Analit Vitamin	94
Tabel 5.6. LOD dan LOQ Analit Vitamin	94
Tabel 5.7. Penetapan kadar analit vitamin dengan modifikasi suhu dan pH	95
Tabel 6.1. Aplikasi KCKUT-SM/SM dalam uji klinik pada sampel biologis	103
Tabel 7.1. Rasio m/z senyawa antibiotik menggunakan KCKUT- SM/SM	108
Tabel 7.2. Rasio m/z senyawa sulfa menggunakan KCKUT- SM/SM	111
Tabel 7.3. Rasio m/z senyawa antifungi menggunakan KCKUT-SM/SM	112
Tabel 7.4. Rasio m/z senyawa antiviral menggunakan KCKUT-SM/SM	113
Tabel 7.5. Rasio m/z senyawa Antikonpulsan, Antidepresan, Antiansietas menggunakan KCKUT-SM/SM	115
Tabel 7.6. Rasio m/z senyawa kardiovaskular menggunakan KCKUT-SM/SM ..	119

DAFTAR GAMBAR

	Halaman
Gambar 1.1.	Diagram Alir Metode kromatografi berdasarkan sifat sampel 2
Gambar 2.1.	Sitem Kromatografi Cair Kinerja Tinggi 5
Gambar 2.2.	Pompa 6
Gambar 2.3.	Piston dan Seal 6
Gambar 2.4.	Kolom 8
Gambar 2.5.	(a) Kolom dengan silica (b) Kolom dengan Zirconium 9
Gambar 2.6.	Kromatogram placebo dan sampel pada uji selektivitas 22
Gambar 2.7.	Kurva Kalibrasi dan linieritas 23
Gambar 2.8.	Kriteria LOD dan LOQ 25
Gambar 3.1.	Diagram sumber pengion berdasarkan massa senyawa dan sensitivitas .. 26
Gambar 3.2.	Diagram Prinsip Ionisasi dengan MALDI 27
Gambar 3.3.	Diagram Prinsip Ionisasi dengan ESI 28
Gambar 3.4.	Diagram Prinsip Ionisasi dengan APCI 29
Gambar 3.5.	Diagram Prinsip Ionisasi dengan APPI 29
Gambar 3.6.	Perangkap ion tiga dimensi 32
Gambar 3.7.	Elektroda perangkap ion 33
Gambar 3.8.	Perangkap ion Linier 34
Gambar 3.9.	Reflectron TOF-MS 36
Gambar 3.10.	<i>Fourier transform analyzer: (a) pulse; (b) eksitasi chirp; (c) resonan sinyal frekuensi</i> 38
Gambar 3.11.	Detektor Ion 39
Gambar 3.12.	Penganalisis massa <i>Quadrupole</i> 42
Gambar 3.13.	Penganalisis massa <i>Ion Trapping</i> 45
Gambar 3.14.	Penganalisis massa <i>Linier Ion Trapping</i> 45
Gambar 3.15.	Penganalisis massa <i>Time-Of-Flight</i> 46
Gambar 3.16.	Penganalisis massa <i>Fourier transform</i> 46
Gambar 3.17.	Penganalisis massa <i>Triple Quadrupole</i> 47

Gambar 3.18.	Diagram skema KCKUT-SM/SM Quadrupole-Time of Flight	49
Gambar 3.19.	Profil kromatogram ekstrak tabat barito menggunakan <i>Liquid Chromatography-Quadrupole-Time of Flight</i> (UPLC-QToF)	50
Gambar 3.20.	MS/MS dari puncak 2 ekstrak daun tabat barito (A) dan standar vincenin-2	51
Gambar 3.21.	Spektrogram massa pembentukan ion Peptida (BM 948) menggunakan Quadrupole-Time of Flight (QToF)	51
Gambar 3.22.	Spektrogram massa pembentukan ion Peptida (BM 862,6) menggunakan Quadrupole-Time of Flight (QToF)	52
Gambar 3.23.	Diagram skema KCKUT-SM/SM Quadrupole-Ion Trap (QIT)	53
Gambar 3.24.	Spektrogram massa pembentukan ion oxazepam (BM 287) menggunakan Quadrupole-Ion Trap (QIT). Kiri: Mode MRM, kanan: Full-scan konfirmasi library	53
Gambar 3.25.	Diagram skema MALDI-TOF	55
Gambar 3.26.	Diagram skema MALDI-TOF	55
Gambar 3.27.	Spektrogram massa boine serum albumin (BM 1967) menggunakan MALDI-Time of Flight (MALDI-ToF)	56
Gambar 3.28.	Pompa Vakum Spektrometer Massa: (a) pompa rotari-vane (b) pompa difusi minyak (c) pompa turbo	58
Gambar 4.1.	Diagram skema Kromatografi cair kinerja ultra tinggi-tandem spektrometri massa	65
Gambar 4.2.	Mode Analisis Full Scan/MS	71
Gambar 4.3.	Skema <i>Selective Ion Reaction</i>	72
Gambar 4.4.	Skema <i>Multiple Reaction Monitoring</i>	72
Gambar 4.5.	Skema Analisis Ion Produk	73
Gambar 4.6.	Protonasi molekul	73
Gambar 4.7.	Deprotonasi molekul	74
Gambar 4.8.	Kromatogram analit dan baku dalam dengan fase gerak gradien pada kolom C18	74
Gambar 4.9.	Kurva kalibrasi 6-merkaptopurin	86
Gambar 4.10.	Kurva kalibrasi 6-metilmerkaptopurin	87
Gambar 5.1.	Perkembangan Metode Analisa	88

Gambar 5.2.	Kromatogram pemisahan tujuh vitamin. Waktu retensi (menit) sianokobalamin adalah 2,41; riboflavin adalah 2,44; dexpanthenol 1,39; pyridoxine adalah 0,53; asam askorbat adalah 0,41; tiamin hidroklorida adalah 0,35 dan nikotinamida adalah 0,5.	96
Gambar 5.3.	Profil kromatogram hasil Optimasi Metode Analisis Pirazinamid dan Etambutol dalam Sediaan FDC. Puncak A dan D pengotor, Puncak B = etambutol; Puncak C=pirazinamid	97
Gambar 6.1.	Tahapan-tahapan ekstraksi fase padat	102

BAB 1

PENDAHULUAN

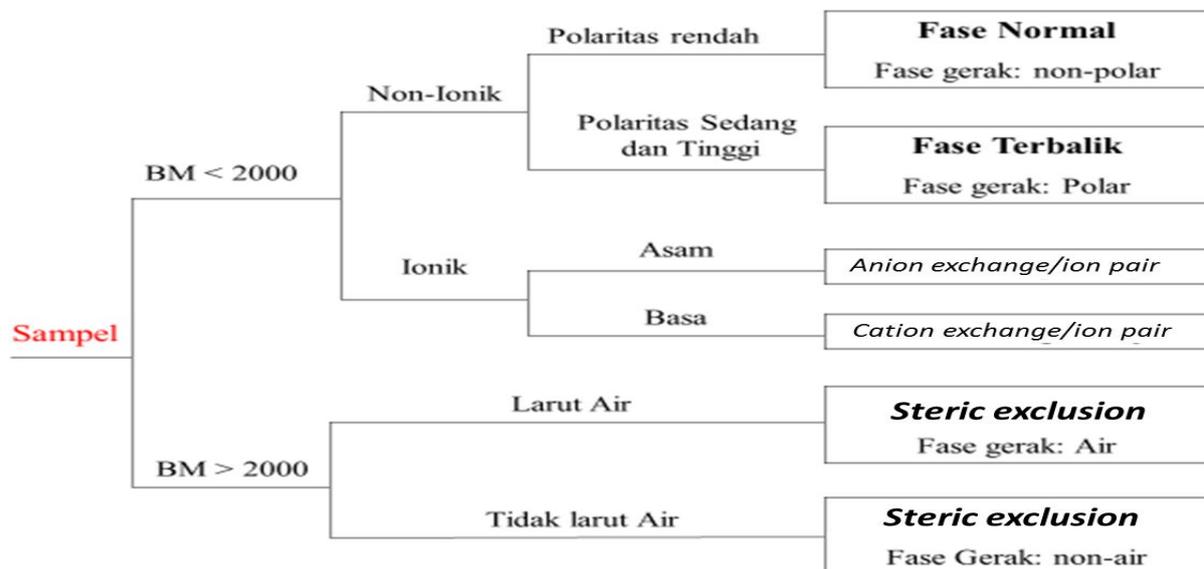
Kromatografi cair kinerja ultra tinggi-tandem spektrometri massa (KCKUT-SM/SM) merupakan instrumen analisis kombinasi dari kromatografi cair sebagai pemisah komponen-komponen analit dalam sampel, dengan spektrometri massa sebagai detektor. Aplikasi KCKUT-MS/MS lebih luas dibandingkan dengan kromatografi gas-tandem spektrometri massa karena penerapan KCKUT-MS/MS tidak terbatas pada molekul volatil saja (biasanya dengan berat molekul dibawah 500 Da), namun mampu mengukur analit yang sangat polar dan persiapan sampel cukup sederhana tanpa adanya teknik derivatisasi.

Kolom KCKUT dapat memisahkan hampir semua campuran yang bisa dilarutkan, sedangkan spektrometri massa akan mengionisasi *peak* yang dipisahkan dan menghasilkan berat molekul untuk setiap komponen dari *peak* tersebut. sistem KCUKT-SM/SM dapat menghasilkan pola fragmentasi yang khas dari *parent ion* (ion induk) dan dapat memisahkan *daughter ion* (ion pecahan) untuk proses identifikasi dan kuantifikasi.

Permasalahan yang dihadapi dari sitem KCKUT-SM/SM adalah hasil dari sistem KCKUT berupa analit dalam bentuk larutan yang akan masuk pada spektrometri massa dengan kondisi vakum, terlebih banyak fase gerak yang digunakan pada sistem KCKUT menggunakan dapar sebagai pengontrol pH untuk menghasilkan pemisahan yang optimal. Masuknya pelarut organik maupun anorganik pada sistem spektrometri massa yang vakum akan menyebabkan spektrometri massa *inlet fouling* dan kehilangan sinyal. Tantangan lainnya adalah senyawa netral yang harus dirubah ke dalam ion molekul bermuatan atau terfragmentasi menjadi ion bermuatan. Sehingga dibutuhkan suatu metode untuk merubah analit dalam larutan sebelum masuk ke dalam sistem spektrometri massa yang vakum. *Atmospheric Pressure Interface* (API) dengan menggunakan *Electro-Spray* (ES) dan *Ion Spray* (IS) memberikan solusi dengan cara eluen kromatografi cair disemprotkan bersamaan dengan gas nebulizer ke dalam bidang elektrostatik pada tekanan atmosfer yang akan menyebabkan disosiasi lebih lanjut molekul analit. Pada saat yang bersamaan gas yang dipanaskan menyebabkan menguapnya pelarut sehingga tetesan analit menyusut, konsentrasi muatan dalam tetesan meningkat. Keadaan akan memaksa ion untuk bermuatan melebihi kekuatan kohesif atau ion dikeluarkan ke dalam fasa gas. Ion-ion yang tertarik akan melewati pipa kapiler pengambilan sampel yang selanjutnya akan di teruskan ke dalam *mass analysers*.

GAMBARAN UMUM KCUKT-SM/SM

Kromatografi adalah proses pemisahan didasarkan pada partisi zat terlarut antara dua pelarut yang tidak bercampur, yaitu fase diam dan fase gerak yang didasarkan pada perbedaan polaritasnya. Kromatografi fase normal merupakan suatu sistem kromatografi dimana fase diam lebih polar dibandingkan dengan fase gerak, sementara kromatografi fase terbalik merupakan suatu sistem kromatografi dimana fase gerak bersifat lebih polar dibandingkan dengan fase diamnya.



Gambar 1.1. Diagram Alir Metode kromatografi berdasarkan sifat sampel

Kromatografi cair kinerja tinggi (KCKT) mampu menerapkan metode kromatografi dengan baik dan dapat diaplikasikan secara luas dalam analisis molekul-molekul obat dan metabolit dalam beberapa dekade belakangan. Seiring berkembangnya dan bervariasinya molekul obat dengan karakteristik yang spesifik, diperlukan metode analisis yang lebih sensitif dan selektif dalam analisis terutama dalam matriks biologis. Kromatografi cair kinerja ultra tinggi-tandem spektrometri massa (KCKUT-SM/SM) atau yang dikenal dengan *Ultra performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry* (UPLC-MS/MS) yang memiliki ukuran partikel pengisi kolom yang mencapai kurang dari 2,0 μm dan tekanan yang dihasilkan mencapai 15.000 psi mampu menghasilkan efisiensi pemisahan sampel pada kolom menjadi lebih baik. Berkurangnya ukuran partikel pengisi kolom serta penggunaan spektrometri massa menyebabkan sensitivitas meningkat. Selain itu, waktu yang diperlukan untuk analisis juga lebih singkat.

Komponen dasar sistem LCMS/MS adalah sistem pompa UHPLC, kolom pemisahan, *interface* ionisasi, MS: sistem vakum, lensa fokus, *analyzer*, detektor ion, dan sistem data/kontrol.

Sistem pompa UHPLC mampu menghasilkan tekanan mencapai 15.000 psi, dan diameter pengisi kolom 2,0 μm . *Interface* antara UHPLC dan spektrometri massa bersifat kritis untuk kekuatan sistem. Semua *interface* dirancang untuk mentransfer sampel terionisasi dari eluen UHPLC menuju spektrometri massa tanpa pencampuran senyawa yang terpisah. Sebagian besar sistem LC-MS/MS, konfigurasi *interface* dapat diganti untuk menghasilkan ion dengan muatan positif atau negatif dari input *ion spray* atau *electrospray*. Molekul ion tersebut ditarik ke dalam *analyzer* spektrometri massa melalui lubang kecil (*pinhole*) dengan perbedaan tekanan antara *interface* dan daerah *analyzer* bervakum tinggi. *Interface* dirancang untuk memastikan sampel yang tidak terionisasi dialihkan dari pintu masuk lubang kecil. Terkadang, *interface* dilengkapi dengan pelat *repeller* bermuatan dengan muatan yang sama seperti molekul ion, memaksa untuk menuju pintu masuk lubang kecil. Penggunaannya harus dengan hati-hati karena dapat menambah energi dan momentum untuk ion bermuatan, yang menyebabkan fragmentasi yang dapat mempersulit interpretasi spektrum ion, yang membuat penentuan berat molekul semakin sulit.

Penggunaan utama spektrometri massa adalah untuk menentukan berat molekul senyawa yang dipisahkan oleh UHPLC. Kegunaan kedua adalah untuk memberikan kesimpulan dari identifikasi struktur suatu senyawa yang dipisahkan menurut studi struktural atau *library* perbandingan fragmentasi. Kegunaan ketiga adalah untuk membuktikan keberadaan atau mengidentifikasi senyawa pengotor. Terakhir, spektrometri massa bermassa digunakan untuk memastikan analisis elemen berdasarkan studi rasio isotop. Penerapan ini memerlukan penggunaan sistem *analyzer* khusus resolusi tinggi.

Sistem pompa vakum untuk spektrometri massa memberikan vakum berkekuatan tinggi (kurang dari 10^{-5} sampai 10^{-7} torr) yang bersifat kritis untuk operasi spektrometer dengan mencegah benturan ion dengan udara. Senyawa terionisasi tidak bisa bertahan cukup lama untuk mencapai detektor jika bertabrakan dengan molekul udara dalam *analyzer*. Vakum dilakukan dalam dua tahap: pertama dengan pompa untuk menaikkan vakum hingga 10^{-4} torr dan kemudian pompa akhir untuk menurunkan hingga 10^{-5} - 10^{-7} torr. Pompa akhir ganda, pompa satu berfungsi untuk menghilangkan sumber spektrometri massa dan yang kedua berfungsi untuk memberikan vakum pada *analyzer*, sehingga dapat digunakan untuk penerapan volume atau laju alir yang tinggi.

Setelah sampel terionisasi, sampel ditarik ke dalam bagian analisis dari spektrometri massa. Lensa fokus yang bermuatan listrik dengan jenis muatan yang sama seperti ion berfungsi memusatkannya menjadi sinar. Ion-ion yang stabil pada setiap frekuensi kemudian diteruskan pada analyzer massa dan menuju detektor ion untuk analisis.

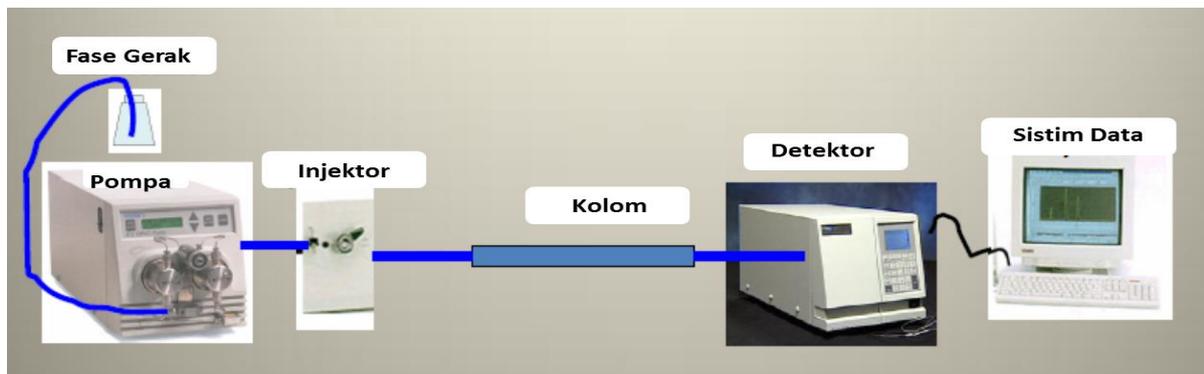
BAB 2

KROMATOGRAFI CAIR KINERJA TINGGI

A. KROMATOGRAFI CAIR KINERJA ULTRA TINGGI

Sistem kromatografi cair kinerja ultra tinggi (KCKUT) pada umumnya sama dengan sistem pada kromatografi cair kinerja tinggi (KCKT), perbedaannya terletak pada ukuran partikel pengisi kolom yang mencapai kurang dari 2,0 μm dan tekanan yang dihasilkan mencapai 15.000 psi, sehingga efisiensi pemisahan sampel pada kolom menjadi lebih baik dan meningkatkan sensitivitas. Semakin kecil ukuran partikel pada kolom, semakin pendek jalan difusi pada analit sehingga waktu yang diperlukan untuk analisis pada KCKUT lebih singkat.

Sistem KCKUT terdiri dari *solvent reservoir*, pompa, injektor, kolom, detektor, komponen pengumpulan data, dan pipa berdiameter kecil untuk menghubungkan semua komponen cair sebelum masuk ke spektrometri massa.



Gambar 2.1. Sistem Kromatografi Cair Kinerja Tinggi

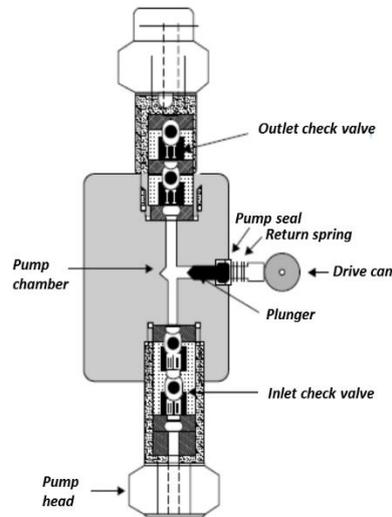
1. *Solvent Reservoir*

Suatu tempat untuk menyimpan sejumlah fase gerak dalam jumlah tertentu selama proses analisis, wadah ini harus bersih dan inert. *Reservoir* ini dilengkapi dengan sistem penghilangan gas dan penyaring khusus untuk mengisolasi fase gerak dari pengaruh lingkungan.

2. Pompa

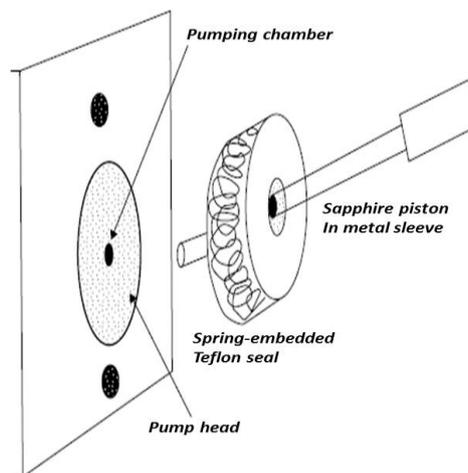
Pompa mengambil fase gerak dari *reservoir* dengan penghisapan melalui tekanan yang cukup dan mendorong fase gerak menuju injektor. Pompa harus menjamin penghantaran fase

gerak berlangsung secara tepat, reproduisibel, konstan dan bebas dari gangguan. Pompa piston *reciprocating* adalah jenis pompa yang paling umum digunakan, pompa ini terdiri dari kepala pompa (terdapat piston dan *seal*), badan pompa, Katup *check-valve* yang dilengkapi *inlet* dan *outlet* untuk memungkinkan fase gerak masuk dan keluar ruang pompa dan *cam-drive*.



Gambar 2.2. Pompa

Ketika *cam-drive* memompa piston, fase gerak terhisap menuju pompa dan pada saat bersamaan katup *check inlet* menutup untuk mencegah fase gerak kembali mengalir ke dalam reservoir, sedangkan katup *check outlet* terbuka untuk memungkinkan mengalirnya fase gerak menuju injektor. Ketika *cam-drive* menarik piston kembali, katup *check inlet* terbuka untuk memasukkan lebih banyak pelarut sementara katup *check outlet* menutup untuk mencegah kembalinya pelarut bertekanan dari injektor.



Gambar 2.3. Piston dan Seal

Kunci dari pengoperasian pompa adalah piston dan *seal*. Piston harus tahan terhadap korosi oleh komponen pelarut, termasuk konsentrasi garam tinggi dan dapar. Piston yang paling umum digunakan terbuat dari kaca *beryl* dan sering disebut sebagai piston safir. Piston safir tidak berwarna biru, tapi nama tersebut menunjukkan biaya ketika pompa rusak dan harus diganti membutuhkan biaya yang tinggi. Kebanyakan pompa dirancang untuk menghindari goncangan pada piston, sehingga alasan paling umum kerusakan piston adalah adanya penumpukan dapar pada *seal* dan kerusakan ketika kepala pompa sedang dibuka untuk memeriksa kondisi piston.

Seal berupa teflon yang mengandung pegas baja melingkar yang tertanam dengan lubang di tengah saluran dimana nantinya pompa piston bisa melewatinya. *Seal* berbentuk silinder berada bagian belakang kepala pompa. Ketika dapar atau reagen pasangan ion dari fase gerak berada dipompa akan menempel pada piston, jika tidak di hilangkan dengan dicuci dengan baik maka akan mengkristal di piston yang akan membuat *seal* aus dan mengakibatkan kebocoran yang mengharuskan seal diganti. Penggantian segel adalah proses yang paling umum menyebabkan piston rusak jika tidak dilakukan dengan benar.

Masalah mendasar dengan pompa adalah kestabilan tekanan, ketika pompa mengalirkan fase gerak ke dalam kolom, dan saat bersamaan piston mengisi ruang pompa dengan fase gerak maka tekanan dalam ruang pompa naik dan turun, menyebabkan adanya getaran pada penghantaran fase gerak melalui katup. Masalah ini diatasi dengan tiga metode: menggunakan beberapa kepala pompa yang berlawanan, kontrol mesin pompa elektronik, dan meredam denyutan.

Dua kepala pompa akan memberi masukan fase gerak yang sama pada waktu yang berbeda, satu kepala pompa dapat menghisap fase gerak dari *reservoir* sementara kepala pompa yang lain mengantarkan fase gerak. Dengan mengontrol mesin pompa secara elektronik dapat mempercepat pengisian ulang fase gerak ke pompa untuk diteruskan ke injektor, metode ini masih menghasilkan getaran, tapi berkurang drastis. kinerja metode ini tidak sebaik dua kepala pompa, tetapi secara signifikan lebih murah. metode terakhir dalam mengurangi getaran adalah peredam getaran, yaitu perangkat berupa kumparan panjang terkompresi dari tube stainless steel dengan diameter internal yang sangat halus berada diantara katup *outlet* pompa dan injektor. Ketika denyutan terjadi, kumparan ini memanjang dan kemudian mengompres lagi, redaman getaran terjadi karena efek pegas.

3. Injektor

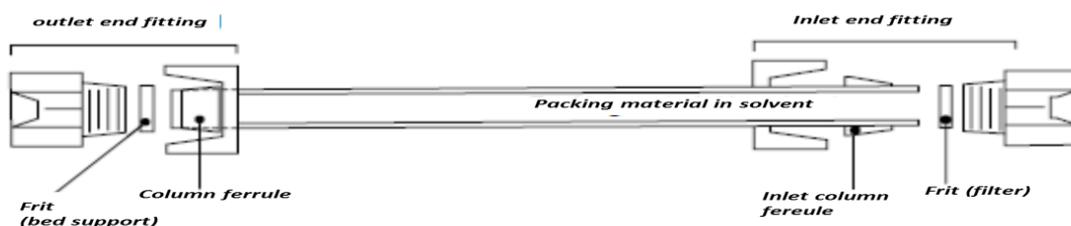
Injektor loop-katup adalah jenis yang paling umum digunakan. Pada salah satu posisi katup, cairan bertekanan tinggi mengalir dari pompa melalui internal *by-pass* dan keluar ke kolom. Sisi lain dari katup terhubung pada loop dengan diameter kecil, tempat injeksi dan saluran untuk mengeluarkan kelebihan cairan. Sampel yang dilarutkan dalam fase gerak disuntikkan ke loop, lebihkan pengisian loop setidaknya 20% tetapi dijaga tidak lebih dari 75% dari volume loop untuk menghindari kehilangan sampel keluar dari port yang meluap. Selanjutnya, injektor diaktifkan dengan cepat ke posisi inject. Sampel dicuci keluar dari belakang loop, memberikan kondisi dimana volume inject yang terakhir masuk yang akan di analisis untuk mempertahankan konsentrasi sampel.

Autoinjektor sampel umumnya menggunakan jenis susunan loop dan katup ini, meskipun sistemnya menarik sampel ke dalam loop bukan mendorongnya ke dalam loop. Mereka juga menggunakan berbagai skema pencucian untuk menghindari kontaminasi dari sampel yang terbawa ketika bergerak dari vial ke vial untuk inject berikutnya.

4. Kolom

Kolom berfungsi untuk memisahkan masing-masing komponen dalam sampel yang dianalisis. Untuk menahan tekanan tinggi kolom dibuat dari bahan yang kokoh seperti *stainless steel* atau campuran logam dan gelas. Kemampuan kolom untuk memisahkan senyawa yang dianalisis merupakan ukuran kinerja kolom. Parameter untuk mengukur kinerja kolom adalah resolusi (R) dan efisiensi kolom (N, HETP, dan T_f). Bila nilai R lebih besar dari 1,5 maka pemisahan yang dihasilkan baik. Efisiensi kolom dapat diukur sebagai jumlah plat teoritis (N) dan panjang kolom yang sesuai dengan HETP. Kolom yang baik memiliki HETP yang kecil dan N yang besar. Untuk suatu puncak yang simetris, faktor ikutan (T_f) besarnya satu.

Kolom dilengkapi dengan *inlet* dan *outlet* dengan tekanan yang dikemas dalam diameter tertentu.



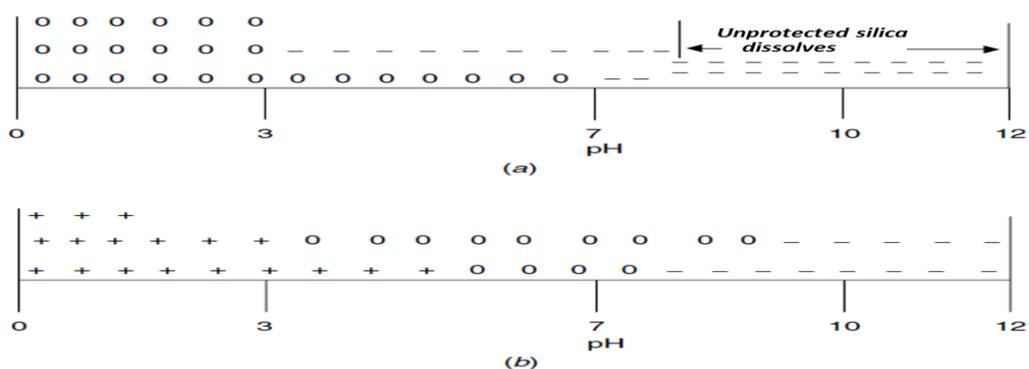
Gambar 2.4. Kolom

Pemilihan kolom dan fase gerak yang benar untuk pemisahan akan menghasilkan pemisahan yang diinginkan. Silika (Si) yang paling umum digunakan pada kolom adalah kolom C18 atau kolom ODS (oktadesil silika). Ini adalah fase organik nonpolar yang terikat secara kimia pada permukaan silika. Mungkin 80% dari semua pemisahan KCKT dilakukan pada kolom C18.

Kolom dikemas dengan silika berpori halus dengan diameter rata-rata 10 μm . Partikel dengan diameter yang lebih besar memiliki pori antar partikel sehingga molekul dapat melalui pori. Kolom pada KCKUT memiliki pengisi dengan diameter partikel kurang dari 2 μm sehingga menghasilkan efisiensi pemisahan sampel yang lebih baik dan meningkatkan sensitivitas.

Kolom silika memiliki 3 masalah besar, yaitu larut pada pH di atas 8,0 pada suhu tinggi dalam cairan fase gerak, dan pada konsentrasi garam yang tinggi. Kebanyakan pemisahan dilakukan pada silika dengan fase terikat organik yang digabungkan dengan permukaan melalui ikatan Si-O-Si yang dapat terhidrolisis pada pH dibawah 2. Ini berarti bahwa kolom harus dijalankan dalam kisaran pH 2,5–7,5 pada suhu ruang, dengan larutan garam kurang dari 100 mM. Keluar dari kondisi ini akan memperpendek umur kolom secara drastis. Jika silika melarut akan terjadi penurunan efisiensi kolom serta mengakibatkan detektor dan interface menjadi terkontaminasi.

Untuk menghindari masalah ini, digunakan kolom *cross-linked* polimer dengan fase terikat organik, inert dari pH 1-11. Tetapi kolom ini menunjukkan perbedaan pemisahan dibandingkan kolom berbasis silika karena penetrasi yang lambat dalam pori menyebabkan analisis karakteristik buruk dan efisiensi yang lebih rendah. Suhu tinggi dapat meningkatkan penetrasi pada pori tetapi dapat menyebabkan partikel terjebak, yang dapat menghambat pemisahan dan kolom polimer cenderung meluruh pada tekanan tinggi.



Gambar 2.5. (a) Kolom dengan silika (b) Kolom dengan Zirconium

Kolom berbasis zirconium, merupakan partikel berpori dengan berbagai ukuran, organik nonpolar dan lapisan penukar ion. Stabil pada pH 1-12 dan suhu sampai 200 °C. Seperti kolom silika, penambahan efek penukar kation (Lewis Acid) pada pH rendah untuk retensi karakter nonpolarnya. Pada pH tinggi, menambahkan pertukaran anion (basa Lewis) dan bertindak sebagai Kelat logam (asam Brønstead) dengan afinitas untuk pasangan elektron bebas pada senyawa seperti amina.

4.1. Kolom Fase Normal

Kolom yang tanpa perlakuan apapun disebut sebagai kolom fase normal karena merupakan jenis kolom pertama yang tersedia untuk kromatografi cair. Biasanya dikemas dalam bentuk non terhidrasi untuk digunakan dengan fase gerak non polar. Komponen yang lebih polar dari partisi sampel dalam fase gerak dipertahankan; senyawa lebih nonpolar akan keluar pertama kali. Kolom ini banyak dimanfaatkan untuk penggunaan LC/MS dalam hal memisahkan struktur isomer dan menunjukkan selektivitas untuk senyawa dengan berbagai jumlah ikatan ganda dan gugus aromatis. Biasanya dijalankan dalam pelarut organik yang mudah menguap dan lebih mudah dihilangkan dalam *interface* kromatografi cair. Kolom silika dapat digunakan dengan fase gerak cairan asam untuk melarutkan kembali campuran senyawa bermuatan seperti fosfolipid, tanpa masalah kebocoran pada fase terikat. Ini penting untuk dipahami, bahwa ketika kolom ini telah terkena fase gerak, maka tidak dapat dikembalikan ke keadaan aslinya tanpa melepaskan kolom dan memanaskannya pada suhu 300°C. Kolom ini dapat dicuci dengan larutan asam, kemudian air, dan kemudian dengan pelarut nonpolar kompatibel sehingga kembali ke silika terhidrasi yang menyediakan pemisahan reproduksibel. Tapi pemisahan ini akan berbeda dari yang diperoleh dengan kolom non terhidrasi awal.

4.2. Kolom Fase Terbalik

Kolom silika C18 atau oktildesil merupakan kolom fase diam pertama telah memberikan KCKT banyak fleksibilitas. Rantai samping oktil desil terikat dengan silika oleh ikatan Si-O-Si. Kolom fase-terbalik ini dapat dijalankan dalam pelarut yang lebih murah, lebih mudah di peroleh dan lebih aman untuk digunakan. Sekitar 80% dari semua pemisahan yang dilakukan dengan kolom silika, dijalankan dengan silika oktadesil.

Tabel 2.1. Kolom Silika

Kolom	Fase	Pelarut	Kegunaan
C18	Octildecil	ACN, MeOH, H ₂ O	Senyawa non polar
C8	Octil	ACN, MeOH, H ₂ O	Senyawa non polar
Phenyl	Stiril	ACN, MeOH, H ₂ O	As. lemak, ikatan rangkap
Cyano	Cianopropil	ACN, MeOH, THF, H ₂ O	Aldehyd, keton
Amino	Aminopropil	H ₂ O, ACN, MeOH, THF, CHCl ₃ , CH ₂ Cl ₂	Gula, anion
Diol	Dihidroxyhexil	ACN, MeOH, THF, H ₂ O	Protein
SAX	Aromatis	Buffer	Anion
SCX	Amin Quartener	ACN, MeOH, H ₂ O	Kation
	Aromatis	Buffer	
DEAE	Asam sulfonate	ACN, MeOH, H ₂ O	Protein, anion
	Alkil eter	Buffer	
CM	Ethil 2 ^o amin	ACN, MeOH, H ₂ O	Protein, kation
	Alkyl ether	Buffer	
SI	Asam asetat	ACN, MeOH, H ₂ O	Organik polar, isomer
	(none)	Hexane, methylene	

Generasi terbaru dari kolom silika disebut kolom silika hybrid. Permukaan silika dari partikel dimodifikasi dengan *cross-linked* yang melekat pada fase silika organik yang berinteraksi dengan gugus silanol yang berdekatan dan melapisi permukaan. Sedangkan silanol sisa yang bebas direaksikan dengan reagen kloro alkil silan yang sesuai untuk menghasilkan fase diam. Jembatan organosilikon menjadikan kolom ini lebih tahan terhadap pH tinggi dan dapat digunakan untuk kromatografi senyawa dasar. Kolom ini juga menunjukkan peningkatan stabilitas pada pH rendah.

Kolom oktil-silika memiliki rantai samping C8 yang melekat pada silika melalui ikatan Si-O-Si. Semakin pendek rantai maka akan menyebabkan komponen nonpolar dari fase gerak mendekati polar sehingga tidak akan terikat kuat dengan kolom silika C18. Dibutuhkan sedikit pelarut nonpolar dalam fase gerak untuk melulusi komponen nonpolar dari kolom dalam waktu yang sama. Kolom fenil-silika memiliki ikatan stiril yang terikat dengan silika dan digunakan untuk pemisahan senyawa aromatik dan senyawa dengan ikatan ganda, seperti asam lemak alami. Kolom silika Aminopropil-, cianopropil-, dan dioalkil memiliki polaritas intermediet antara octildodecil dan kolom silika fase normal. Silika tersebut dapat digunakan pada pelarut nonpolar fase normal atau pelarut campuran fase terbalik. Harus diperhatikan pada kolom silika aminopropil dan yang lainnya dengan gugus amina primer dan sekunder, karena gugus amino dapat teroksidasi dalam pelarut yang mengandung udara selama periode waktu tertentu dan akan kehilangan kemampuan pemisahannya. Pembersihan Nitrogen atau Helium pada pelarut harus dilakukan selama *running* terutama saat penyimpanan kolom ini.

Kolom yang mengikatkan gugus alkil dengan silika dapat bereaksi dengan molekul aktif yang dapat menjerap dan hanya mempertahankan satu senyawa dalam fase gerak. Setelah terperangkap, afinitas target dapat berubah dengan mengubah kondisi fase gerak untuk memaksa molekul target keluar dari fase diam. Kolom ini digunakan untuk pemurnian protein dan antibodi.

Silika Enansiomer dan kolom polimer dirancang untuk mengatasi campuran yang mengandung isomer optik. Senyawa ini memiliki setidaknya satu atom C asimetris, dan partisi memisahkan senyawa yang bersifat cermin satu sama lain. Kolom fase terikat berisi isomer optik fungsional yang akan berinteraksi secara berbeda dengan masing-masing isomer optik, yang mengarah pada perbedaan dalam *partitioning rates*. Salah satu senyawa pasangan enansiomer yang lebih erat akan dipertahankan, sedangkan lainnya akan keluar dari kolom. Kolom ini penting dalam mengatasi optik aktif farmasetikal, gula, peptida sintetik, dan protein.

Buffer digunakan pada kolom fase terbalik terutama untuk mengontrol ionisasi molekul sampel sehingga terjadi interaksi pemisahan dan pelekatan pada fase diam. Bentuk terionisasi biasanya cenderung terlalu larut dalam fase gerak dan akan terelusi pada puncak pertama. Ionisasi asam organik dapat ditekan dengan mendapar dua unit pH di bawah nilai pKa nya sekitar 4,5. Amina memiliki nilai pKa sekitar 10, dan pH kolom silika disesuaikan sehingga dapat melarut dengan mudah. Amina dapat dipisahkan pada kolom nonpolar dengan menambahkan agen *ion-pairing* seperti asam sulfonat organik untuk fase gerak. Buffer dan reagen *ion-pairing* dapat menimbulkan masalah bagi analisis LC/MS jika non volatile. Mereka tidak dapat dihilangkan dalam Interface pengion, menyebabkan penurunan ion atau kontaminasi pada sinyal analisis. Buffer garam logam non volatile, seperti kalium fosfat, dapat diganti dengan buffer volatile seperti ammonium asetat atau amonium format. Kolom fase terikat biasanya dikirim dan disimpan setidaknya dalam 25% pelarut organik untuk mencegah pertumbuhan bakteri ketika tidak digunakan. Penyimpanan dengan pelarut ini, kolom perlu dicuci ketika akan digunakan, dan kolom perlu dikalibrasi dengan fase gerak. Hati-hati untuk tidak mengganti pelarut organik menjadi buffer atau Buffer menjadi pelarut organik karna buffer akan mengendap apabila kontak dengan pelarut yang lebih nonpolar! Cuci pelarut organik dengan air terlebih dahulu dan kemudian ganti ke larutan Buffer. Umumnya, mencuci kolom dengan fase gerak sebanyak 6 kali volume kolom, sebelum menginjek sampel. Enam kali volume untuk kolom dengan diameter 4.3 mm dan panjang kolom 25 cm adalah sekitar 18 ml fase gerak.

Untuk penyimpanan kolom, cuci buffer dengan air, lalu cuci kolom dengan 25% organik dan tutup kolom untuk penyimpanan. Harap dicatat bahwa campuran pelarut organik

polar dengan air mungkin memiliki viskositas secara drastis lebih tinggi dari air atau pelarut organik saja dan dapat menyebabkan masalah kelebihan tekanan pada laju alir, sehingga amati alat pengukur tekanan pompa selama proses dan turunkan laju alir jika diperlukan. Apabila kontaminan non polar mulai ada, maka akan terlihat puncak akhir *running* dari campuran standar memakan waktu lebih lama untuk muncul atau hilang sepenuhnya dari kromatografi.

Mencuci kolom adalah sebuah seni tersendiri. Pertama, **tidak boleh mencuci kolom yang terhubung ke spektrometri massa**. Itulah gunanya katup *diverter* untuk mengalihkan pelarut pencuci dari *Interface* dan *analyser*. Beberapa detektor bisa mendapatkan keuntungan dari pencucian, tetapi tidak untuk spektrometri massa. Bahan nonpolar cenderung menumpuk pada kolom nonpolar dan dapat dicuci dengan pelarut nonpolar. Pastikan bahwa pertama kali membersihkan buffer dengan air sebelum melakukan pencucian organik. Untuk mencuci organik dari kolom silika oktil desil, menggunakan pelarut dalam urutan metanol, asetonitril, dimetilformamida, tetrahidrofuran (THF), metilen klorida, kloroform, dan heksana. Jangan pernah menggunakan pelarut yang lebih nonpolar jika pelarut yang kurang nonpolar dapat mencucinya. Anda harus menggunakan enam kali volume kolom pada masing-masing pelarut.

4.3. Kolom Silika *Ion Exchange*

Kolom silika penukar ion tersedia dalam kemasan *micro particulate*. Kolom SAX adalah kolom silika *anion-exchange* dengan amina kuartener pada akhir fase diam, sedangkan Kolom SCX adalah kolom silika *cation-exchange* dengan gugus asam sulfonat pada akhir fase diam. Kolom ini memerlukan konsentrasi tinggi garam dan garam gradien untuk mengelusi bahan terionisasi yang diperoleh dari kolom. Permukaan yang dibasahi dari sistem pompa dan detektor pertama harus dilindungi dari korosi garam dan pencucian logam dengan pengamanan secara berkala dengan asam nitrat. Ganti kolom dengan *column bridge*, untuk mengalihkan aliran dari detektor seperti spektrometri massa, dan kemudian memompa 6 N (20%) asam nitrat. Sesudah perlakuan ini sistem harus dicuci dengan sejumlah air sebelum kolom dimasukkan.

Penukar ion yang kuat cenderung mempertahankan ion *irreversibel* yang sangat kuat seperti protein, amina kuartener, dan gugus asam sulfonat yang akan menonaktifkan bahan kemas. Penukar ion yang lemah dengan gugus dietilamina etilendiamin (DEAE) dan karboksimetil (CM) sudah disiapkan terikat melalui gugus alkil dari silika. Seperti kolom silika amino-, kolom silika DEAE- perlu dilindungi dari oksidasi oleh udara dalam fase gerak. Kolom Pertukaran ion harus dielusi dengan sedikit konsentrasi garam jika digunakan dalam aplikasi *direct-flow* ke *interface* spektrometri massa, karena masalah pembersihan garam eluen non volatile. Pemisahan fraksi dari penukar ion dapat melalui *desalting size-separation column* ke

interface spektrofotometer dengan katup *diverter* yang digunakan untuk membuang fraksi garam ketika keluar.

Interaksi hidrofobik pada dasarnya terikat pada kolom non polar dengan fase gerak *ion-exchange*. Dimulai dengan konsentrasi garam yang sangat tinggi seperti 100 mM amonium sulfat, yang akan mendorong senyawa non polar ke dalam fase diam. Sistem gradien dijalankan untuk konsentrasi rendah garam pada puncak sampel elusi, dengan senyawa yang paling non polar yang dielusi terakhir. Teknik ini paling sering digunakan untuk protein.

4.4. Kolom Zirkonium

Kolom fase diam berbasis zirkonium lebih disarankan dari pada silika untuk LC/MS. kolom fase diam berbasis zirkonium menunjukkan cara pemisahan campuran yang lebih kompleks dari pada kolom silika. kolom dapat digunakan di berbagai pH, anionik, kationik, dan khelat untuk amina. Seringkali, buffer amina dan senyawa pengkelat yang sangat kuat harus ditambahkan ke fase gerak hanya untuk memungkinkan senyawa amino terelusi dari kolom.

Fase diam berbasis zirkonium yang digunakan dengan spektrometri massa adalah polimer polibutadiene atau kelompok C18 terikat oleh ikatan karbon-zirkonium langsung disiapkan dengan menggunakan senyawa diazo. Berbeda dengan hubungan silikon dalam fase silika terikat, C-Zr tidak rentan terhadap hidrolisis asam dan zirkonium yang tidak larut pada pH yang lebih tinggi. Ini memberikan kolom dapat digunakan dari pH 1 sampai 11 dan pada suhu tinggi. Kolom zirkonium menunjukkan karakterisasi partisi senyawa nonpolar mirip dengan kolom oktildesil-silika, tetapi sangat berbeda ketika memisahkan molekul muatan seperti asam organik dan amina. Karena selektivitas non polar berbeda dari kolom berbasis silika C8 dan C18. Seperti silika, kolom berbasis zirkonium menunjukkan karakteristik penukaran kation tetapi juga terdapat karakter penukar anion dan logam kelat. karakter tersebut dapat digunakan untuk mengubah karakter pemisahan pada fase diam atau dapat dihambat dengan buffer dan agen pengkelat seperti etilendiamin tetra asam fosfonat (EDTPA).

Terkadang, perbedaan ini bisa bermakna karena rata-rata kolom zirconium harus diberikan dengan khelator untuk mempertahankan kation dan amina pada kolom. Kolom zirkonium tidak memiliki masalah kebocoran kolom, fase gerak dapat dibufferkan dengan buffer yang mudah menguap dari pH tinggi ke rendah, dan mereka dapat dijalankan pada suhu setinggi 180°C untuk mempercepat resolusi puncak dan mempersingkat waktu retensi kromatografi.

Fase diam berbasis zirkonium dapat dicuci dengan tiga langkah prosedur: (1) mencuci dengan 80% asetonitril yang mengandung 100 mM ammonium hidroksida (pH 10,0) untuk 50 volume kolom; (2) cuci dengan 80% asetonitril dengan 100 mM asam nitrat untuk 50 volume kolom; dan (3) mencuci dengan 100% organik, MeOH, asetonitril, dan THF untuk 20 volume kolom. Jelas, ini harus dilakukan dengan menggunakan katup *diverter* sehingga hasil cucian tidak mengalir ke spektrometri massa.

4.5. Kolom Polimer

Kolom fase diam berbasis polimer memberikan stabilitas dari pH 1-13, dapat digunakan dengan pelarut organik murni meskipun pelarut antara seperti THF dan dioksan dapat menyebabkan masalah *swelling* pada tekanan. Kolom fase terikat polimer tersedia dengan karakter penukar anion dan kation dan dengan fase pengeluaran ion.

Beberapa polimer dapat mentoleransi tekanan balik kolom hingga 5000 psi, namun pada polimer *cross-linking* bila tekanan 5000 psi akan membatasi transfer massa menuju pori-pori dan mengurangi sampel *loading*. Kolom ini tidak dapat digunakan pada suhu tinggi, karena menyebabkan polimer mengembang dan penutupan pori. Buffer digunakan pada kolom ini untuk mengontrol dan mengurangi kontaminan ionisasi sampel, yang dapat mengganggu analisis spektrometri massa.

4.6. Pemeliharaan Kolom

4.6.1. Pembersihan Kolom Silika

Pembersihan harus dilakukan diluar spektrometri massa dan biasanya dicuci dalam gelas kimia. Kolom sebaiknya dijalankan dengan satu arah untuk menghindari penyumbatan. Ketika dilakukan penukaran pelarut, ketercampuran pelarut harus dihindari dengan memompa 6 kali volume kolom pelarut baru. Perawatan terhadap buffer, perhatikan untuk tidak membiarkan buffer tersimpan di kolom, bersihkan baffle dengan air dan simpan kolom dengan pelarut organik.

Masalah terbesar adalah pada silika nonpolar seperti octildecil, octil, fenil dan ciano. Kolom akan menjadi akumulasi pengotor nonpolar pada kepala kolom dan mengubah pemisahan dengan mengangkat komponen non polar lebih banyak dari campuran sampel yang diinjeksikan. Hal ini dapat dibersihkan dengan asetonitril jika buffer pertama dihilangkan dengan *washout* nya adalah air. Jika belum memberikan hasil yang baik maka dilakukan 3 langkah pembersihan dengan asetonitril, kemudian tetrahidrofuran dan kemudian hexan dan kembali dilakukan langkah mundur baru dapat membersihkan semua pengotor non polar.

Pemisahan protein pada kolom dengan ukuran pori yang besar dan terikat dengan fase silika, secara umumnya dilapisi dengan diol fase terikat, karena dapat dicuci tapi perlu kewaspadaan terhadap *over pressure* yang disebabkan oleh perubahan viskositas karena campuran pelarut. Kolom jenis ini biasanya mudah patah, jadi perhatikan tekanan atur sesuai yang diarahkan. Dan juga perlu memperhatikan pH buffer yang digunakan. Saat memastikan bahwa tidak ada kontaminan maka perhatikan pelarut yang digunakan misalnya dimethyl sulfoxide 20% atau dimethylformamide dalam metanol karena pelarut ini memiliki viskositas yang tinggi dan harus dialirkan pada aliran yang lebih lambat untuk menghindari *over pressure* pada kolom.

Masalah sekunder pada kolom silika adalah akumulasi ion logam pada asam, gugus silanol bebas. Ion ini dapat dihilangkan dengan mencuci kolom dengan air dan kemudian 100 mM natrium oksalat (pH 4,0) 6 x volume kolom. Kelator ini akan menanggalkan ion kalsium dan magnesium yang telah terakumulasi dari air. Dan keadaan ini juga dapat merusak besi di dinding kolom dimana silika dipack jika akan melanjutkan pembersihan maka dilakukan secara hati-hati biasanya untuk 4,2 x 300 mm akan memiliki 3 mL volume kosong kolom yang dapat digunakan untuk menghitung volume untuk pencucian.

Kolom silika polar seperti silika fase normal dan kolom amino akan terjadi akumulasi kontaminan polar dan hal ini bisa dibersihkan dengan pelarut polar. Namun, hati-hati saat menggunakan pelarut anhidrat ini akan mengubah karakter pemisahan awal dan akan memiliki karakteristik pemisahan yang berbeda. Hal ini diatasi dengan mencuci silika dengan kloroform namun jika belum cukup bersih maka lakukan dengan 3 langkah yaitu heksana, tetrahidrofur, 10 mM asam asetat dan dilakukan ulang secara menurun urutannya.

Kolom amina primer dan sekunder seperti kolom amino dan kolom DEAE akan teroksidasi oleh udara sehingga akan kehilangan kemampuan pemisahannya. Hal ini dapat diatasi dengan menjalankan dan menyimpan kolom ini dengan pelarut yang telah dihilangkan gasnya oleh nitrogen dan helium.

Kolom silika *ion-exchange* adalah kolom yang terikat dengan fase dan gugus fungsi yang bermuatan positif atau negatif. Kolom ini akan mengakumulasi komponen non polar yang bisa dihilangkan dengan menggunakan pelarut organik, tetapi masalahnya jika kontaminannya berupa gugus fungsi yang terikat dengan muatan berlawanan, hal ini dapat diatasi dengan mengontrol pH untuk menetralkan salah satu kelompok yang terikat baik pada fase terikat ataupun dari senyawa yang tertarik atau dengan pemindahan ion lawan seperti menggunakan NaCl dengan konsentrasi tinggi. Namun, akan membatasi masa pakai kolom karena adanya garam yang terikat silika dan terbentuk korosi pada dinding kolom.

4.6.2. Pembersihan Kolom Zirkonium

Keuntungan kolom ini adalah stabilitasnya mencapai range pH 1-11 dan tahan suhu tinggi. Zirkonium juga bertindak sebagai kelator untuk asam lewis sehingga direkomendasikan untuk LC/MS dengan agen kelatnya berupa asam etilen diamin tetra posporik (EDTPA) untuk mengikat basa lewis pada permukaan zirkonium, hal ini memungkinkan terjadinya pemisahan. Kolom ini akan menumpuk komponen non polar yang akan mengubah karakteristik kolom, hal ini dapat diatasi dengan mencuci kolom pada pH tinggi dalam asetonitril 80% dengan 100 mM ammonium hidroksida (pH 10) dan diikuti air, pembilasan dilakukan dengan pH rendah dengan asetonitril 20% yang mengandung asam nitrat, air lagi dan akhirnya pelarut organik seperti metanol, asetonitril, atau tetrahidrofuran. Kolom ini hanya membutuhkan 20-30% pelarut untuk mengelusi komponen nonpolar sebanding dengan kolom C18. Adanya kelator pada fase gerak harus diperhatikan karna akan mengganggu molekul EDTPA dan menimbulkan penyumbatan.

4.6.3. Pembersihan Kolom Berbasis Polimer

Kolom polimer digunakan untuk analisis dan pemisahan karbohidrat namun mudah hancur sehingga perlu pengawasan khusus. Dan kolom akan hancur jika operator gagal mengatur tekanan sehingga pelarut dingin. Pemanasan wadah pelarut dalam air hangat akan cukup mengurangi viskositas dan memungkinkan penggunaan kolom. Kolom polimer modern lebih berat material penyusunnya dan lebih tahan terhadap perubahan tekanan tapi pengaturan tekanan yang dianjurkan tetap perlu diamati. Kolom ini lebih mudah dicuci dari pada kolom silika karena tidak memiliki karakter pertukaran ion sekunder. Asetonitril atau tetrahidrofuran cukup non polar untuk membersihkan cemar di kolom, dan keduanya memiliki viskositas yang rendah dari campuran air dan metanol. Pemanasan wadah pelarut dapat mempersingkat waktu pencucian kolom dengan mengurangi viskositas dan meningkatkan perpindahan massa keluar dari pori-pori kolom. Namun, jangan melebihi titik didih pelarut. Adanya ikatan silang ion yang kuat pada polimer, bisa diatasi dengan garam konsentrasi tinggi pada pH tinggi maupun rendah dan pada temperatur tinggi, tanpa merusak permukaan polimer. Tapi, garam konsentrasi tinggi dapat merusak besi pada dinding kolom sehingga tetap diperlukan pencucian dengan 6 kali volume kolom air untuk menetralkan kolom kembali.

5. Detektor sekunder

Dalam sistem kromatografi cair-tandem spectrometer masa detektornya bersatu dengan spektrometri massa, tapi detektor pada KCKUT dapat menggunakan aliran pelarut yang sama dari kolom, baik dalam seri dengan spektrometri massa atau dengan menggunakan *splitter*

untuk mengalihkan atau diteruskan pada detektor sekunder seperti detektor Indeks bias (RI), detektor konduktivitas, detektor ultraviolet (UV), atau fluorometer (FL). Semua puncak detektor sekunder tersebut harus menggunakan aliran sel dengan volume yang sangat rendah (*low-dead-volume*) jika ingin menjaga dari pencampuran kembali puncak kromatografi yang telah dipisahkan atau mencegah pengenceran dengan fase gerak. Semuanya memberikan informasi tambahan tentang komponen puncak yang telah dipisahkan. Detektor indeks bias (RI) dan detektor konduktivitas adalah detektor primer dengan daerah puncak sebanding dengan jumlah bahan di setiap puncak. Fluorometer bereaksi terhadap bahan spesifik yang menyerap sinar UV dan memancarkan kembali sinar itu pada panjang gelombang yang lebih tinggi. Detektor UV adalah detektor KCKT yang paling serbaguna. Detektor yang bervariasi dapat diatur untuk melihat senyawa yang hanya menyerap pada panjang gelombang tertentu, sedangkan detektor UV dioda-array dapat mendeteksi senyawa yang menyerap sinar UV di mana saja dalam panjang gelombang yang tersedia untuk analisis.

Analisis spektrometri massa adalah teknik destruktif yang menggunakan detektor, tapi sangat sedikit sampel yang diperlukan untuk memberikan sinyal MS. Sejauh ini, detektor KCKUT yang paling fleksibel dan sering digunakan adalah detektor ultraviolet (UV). Detektor ini menggunakan prinsip bahwa kebanyakan senyawa organik menyerap sinar ultraviolet pada beberapa panjang gelombang. Detektor dapat diatur pada panjang gelombang tertentu untuk penyerapan senyawa tertentu, ditetapkan pada panjang gelombang rendah untuk mendeteksi hampir semua senyawa, atau berjalan dalam modus deteksi fotodiode untuk memindai berbagai panjang gelombang UV. Sinyal UV tidak hanya bergantung pada konsentrasi tapi juga pada koefisien absorpsi dari keberadaan gugus kromofor pada efluen sampel, yang dapat memberikan informasi tambahan tentang keberadaan dan identitas senyawa target dan pengotornya.

Detektor *fluorescence* (FL) dapat memberikan informasi spesifik tentang senyawa yang dapat menyerap sinar UV dan menaikannya menjadi panjang gelombang untuk emisi fluoresen. Dengan menyetel *input* dan panjang gelombang, detektor ini dapat diatur untuk mencari senyawa tertentu pada HPLC dengan sensitivitas sangat tinggi.

Detektor indeks bias (RI) merupakan detektor yang bergantung pada konsentrasi yang mencari senyawa dengan indeks bias yang berbeda dari fase gerak. Ini dapat menemukan hampir semua senyawa yang ada tetapi dibatasi oleh sensitivitasnya yang rendah dan menggunakan sistem pelarut isokratik. Detektor HPLC yang lain, seperti detektor konduktivitas dan elektrokimia, umumnya tidak digunakan sebagai detektor sekunder karena cenderung dapat merusak sampel atau membutuhkan konsentrasi ion yang tinggi.

Detektor HPLC yang beredar di pasaran saat ini umumnya berfungsi sebagai detektor universal dengan sensitifitas tinggi dengan sistem gradient menggunakan buffer yang volatil. Detektor aerosol korona bermuatan (*Corona charged aerosol detector*) menggunakan sesuatu seperti *nebulizer* penyemprot ion (*ion spray nebulizer*) untuk menguapkan pelarut dan buffer, kemudian memberikan muatan pada *droplet* multi atom dengan melewatkannya pada jarum bertegangan rendah. Muatan pada *droplet* kemudian diukur dengan elektrometer, yang baik dalam mendeteksi karbohidrat, fosfolipid, steroid, dan peptide yang sulit diukur menggunakan detektor UV.

6. Komputer

Komputer digunakan untuk akuisisi dan pengolahan data. Ini dapat digunakan secara sederhana sebagai perekam atau integrator, atau dapat digunakan sebagai sistem berbasis komputer untuk mengendalikan semua komponen sistem dan memperoleh data puncak, mengukur luas area puncak, menentukan berat molekul komponen dari masing-masing puncak, mengidentifikasi ketidakmurnian, dan membandingkan pola fragmentasi puncak dengan database yang diketahui untuk mengidentifikasi masing-masing senyawa yang ada secara pasti.

B. VALIDASI METODE ANALISA

Validasi metode analisa adalah suatu tindakan penilaian terhadap parameter tertentu, berdasarkan percobaan laboratorium, untuk membuktikan bahwa parameter tersebut memenuhi syarat untuk penggunaannya.

Hal-hal yang harus diperhatikan sebelum melakukan validasi metode:

1. Kesesuaian instrumentasi yang digunakan, Status Kualifikasi dan Kalibrasi
2. Kesesuaian Bahan, Status Standar Referensi, Reagen, dll.
3. Kesesuaian Analis, Status Catatan Pelatihan dan Kualifikasi
4. Kesesuaian Dokumentasi, Prosedur analitis tertulis dan protokol yang disetujui dengan benar dengan kriteria penerimaan yang telah ditentukan sebelumnya.

Parameter/karakterisasi validasi (menurut USP)

Kategori I

Komponen utama dalam obat ruahan, bahan baku obat atau komponen aktif dan pengawet dalam sediaan farmasi

Kategori II

Metode analisis untuk penentuan kemurnian (cemaran) dalam obat ruahan/hasil urai dalam sediaan farmasi

Kategori III

Penentuan karakteristik penampilan sediaan jadi farmasi, seperti; disolusi (pelepasan obat) keseragaman kandungan, dsb.

Kategori IV

Uji Identifikasi

Tabel 2.2. Karakteristik validasi pada kategori menurut USP

Karakteristik	Kategori I	Kategori II		Kategori III	Kategori IV
		Kuantitatif	Uji batas		
Akurasi	Ya	Ya	*	*	Tidak
Presisi	Ya	Ya	Tidak	Ya	Tidak
Spesifitas	Ya	Ya	Ya	*	Ya
Limit Deteksi	Tidak	Tidak	Ya	*	Tidak
Limit Kuantisasi	Tidak	Ya	Tidak	*	Tidak
Linieritas	Ya	Ya	Tidak	*	Tidak
Rentang	Ya	Ya	*	*	Tidak

* Mungkin diperlukan, tergantung

Implementasi metode di laboratorium harus menggunakan metode yang telah divalidasi/diverifikasi.

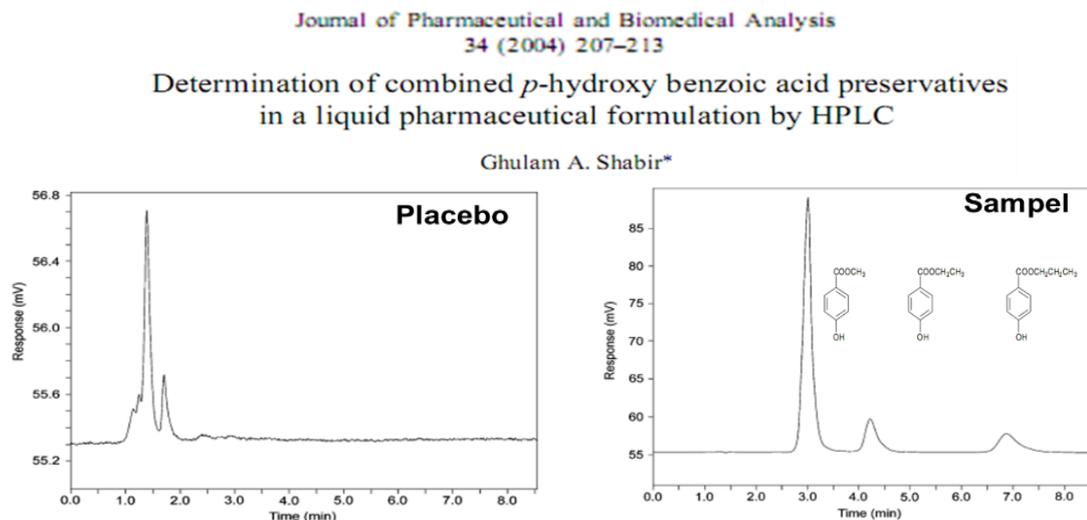
Validasi metode analisis bertujuan untuk memastikan dan mengkonfirmasi bahwa metode analisis tersebut sudah sesuai untuk peruntukannya. Validasi biasanya diperuntukkan untuk metode tidak baku, metode baku yang dimodifikasi, metode baku di luar ruang lingkup, dan metode pengembangan. Sedangkan untuk metode yang memang telah tersedia dan baku/kompendial (misal dari AOAC, ASTM, dan lainnya), namun metode tersebut baru

pertama kali akan digunakan di laboratorium tertentu, biasanya tidak perlu dilakukan validasi, namun hanya verifikasi. Verifikasi metode uji adalah konfirmasi ulang dengan cara menguji suatu metode dengan melengkapi bukti-bukti yang obyektif, apakah metode tersebut memenuhi persyaratan yang ditetapkan dan sesuai dengan tujuan. Verifikasi sebuah metode uji bermaksud untuk membuktikan bahwa laboratorium yang bersangkutan mampu melakukan pengujian dengan metode tersebut dengan hasil yang valid.

Karakteristik metode validasi

1. Selektivitas/Spesifitas

Merupakan kemampuannya yang hanya mengukur zat tertentu saja secara cermat dan seksama, dengan adanya komponen lain yang mungkin ada dalam sampel. Dilakukan untuk menguji interferensi/gangguan pelarut, matriks sampel, senyawa hasil degradasi, senyawa sejenis, cemaran dan zat pengganggu lainnya terhadap analit. Disebut Selektif jika Pelarut/Plasebo tidak menghasilkan puncak dengan waktu retensi sama dengan analit dan Puncak analit terpisah dari puncak lainnya ($R_s \geq 1,5$).



Gambar 2.6. Kromatogram placebo dan sampel pada uji selektivitas

2. Linearitas dan Rentang

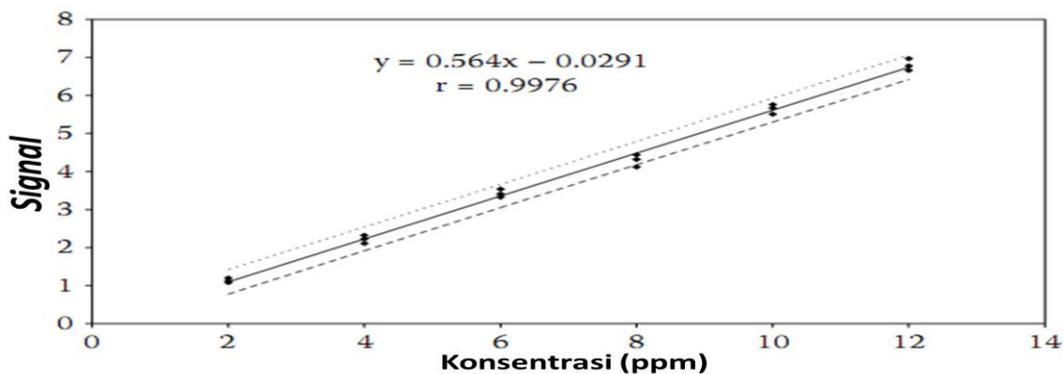
Linearitas adalah kemampuan metode analisis yang memberikan respon yang secara langsung atau dengan bantuan transformasi matematik yang baik, proporsional terhadap konsentrasi analit dalam sampel. Syarat koefisien korelasi (r) : $r \geq 0,9990$.

Disarankan menggunakan minimum 5 macam konsentrasi analit. Disarankan terhadap sampel yang **independen**, bukan dari sampel hasil pengenceran. Dapat digunakan larutan baku hasil pengenceran dan/atau larutan spike.

Cara Pengujian:

- Buat larutan analit sebanyak minimal 5 macam konsentrasi yang berbeda (misal pada level 80%, 100% dan 120%).
- Ukur respon alat/instrument masing-masing minimal tiga kali pengukuran.
- Buat kurva antara respon alat/instrumen terhadap konsentrasi analit dan hitung persamaan garis regresi.
- Hitung linearitas melalui analisis statistik regresi linier ($y = mx + b$)

$$r = \frac{\sum (x_i - \bar{x})(y_i - \bar{y})}{\{(x_i - \bar{x})^2 (y_i - \bar{y})^2\}^{1/2}}$$



Gambar 2.1. Kurva Kalibrasi dan linieritas

Rentang adalah pernyataan batas terendah dan tertinggi analit yang sudah ditunjukkan dapat ditetapkan dengan kecermatan, keseksamaan, dan linearitas yang dapat diterima.

Kriteria rentang; Untuk Uji Zat Obat & Produk Obat 80-120% dari uji Konsentrasi, Untuk Uji Keragaman Konten 70-130% dari uji Konsentrasi, Untuk Metode Uji Disolusi $\pm 20\%$ di atas seluruh Rentang Spesifikasi, Untuk uji impurity 120% Spesifikasi Ketidakh murnian.

3. Akurasi/Kecermatan

Menunjukkan tingkat kedekatan hasil pengujian metode dengan nilai yang sebenarnya atau nilai yang dinyatakan benar. Umumnya dinyatakan dalam persen perolehan kembali (% recovery). Dapat dilakukan melalui perbandingan hasil analisis antara metode yang divalidasi dengan metode baku → harus tidak berbeda makna.

Dapat dilakukan metode adisi standar terhadap placebo atau sampel (metode adisi standar).

Cara Pengujian:

- a. Buat larutan analit sebanyak minimal 3 macam konsentrasi yang berbeda (misal pada level 80%, 100% dan 120%)
- b. Ukur respon alat/instrument minimal masing-masing tiga kali pengukuran
- c. Hitung % recovery

$$\% \text{ Rec} = \frac{\text{Kadar yang diperoleh}}{\text{Kadar sesungguhnya}} \times 100\%$$

4. Presisi/Keseksamaan

Keseksamaan adalah ukuran yang menunjukkan derajat kesesuaian antara hasil uji individual, diukur melalui penyebaran hasil individual dari rata-rata jika prosedur diterapkan secara berulang pada sampel-sampel yang diambil dari campuran yang homogen.

Keseksamaan diukur sebagai simpangan baku atau simpangan baku relatif (koefisien variasi). Meliputi:

a. Keterulangan (*repeatability*)

Kondisi sama pada interval waktu yang singkat, Satu larutan uji → disuntikkan berkali-kali pada hari yang sama, alat yang sama, analisis serta kondisi lain yang sama. Disebut juga *Intra-assay precision*

b. Presisi antara (*Intermediate Precision*)

Disebut juga “*within-laboratory variations*”. Berbeda hari, atau analis, atau instrument (dalam satu laboratorium). Sebagai bagian *Ruggedness* menurut USP.

c. Reprodusibilitas (*Reproducibility*)

Repeatability pada laboratorium yang berbeda. Berbeda analis atau instrument dari laboratorium yang berbeda

Pengujian presisi dianjurkan menggunakan 3 macam konsentrasi berbeda, misal 80, 100 dan 120 % dari konsentrasi target. Masing-masing konsentrasi dilakukan 3 replikasi. Dapat dilakukan pada satu konsentrasi dengan 6 kali replikasi dan dianjurkan juga dilakukan pada hari yang berbeda dan analisis yang berbeda.

Kriteria penerimaan: tergantung kategori analisis atau konsentrasi analit

Contoh: RSD < 2% (kategori I)

5. Limit Deteksi (LOD) dan Limit Kuantitasi (LOQ)

Limit of Detection (LOD) adalah Konsentrasi terendah analit dalam sampel yang masih dapat terdeteksi, tapi tidak perlu ditetapkan secara kuantitatif dalam kondisi percobaan yang telah dinyatakan. Sedangkan Limit of Quantification (LOQ) adalah Konsentrasi terendah analit dalam sampel yang dapat ditentukan dengan presisi dan akurasi yang diterima dalam kondisi percobaan yang ditetapkan.

LOD dan LOQ diperoleh berdasarkan:

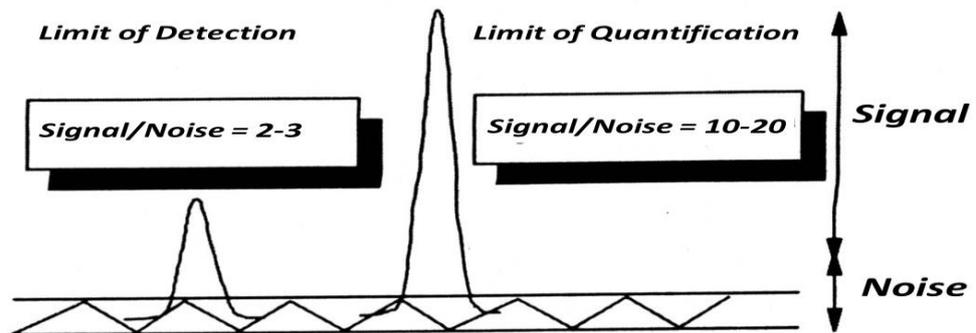
a. Berdasarkan pengamatan visual; Digunakan untuk metode non instrumental

b. Berdasarkan *Signal-to Noise-Ratio*;

$S/N \geq 3:1 \rightarrow$ Batas deteksi; $S/N \geq 10:1 \rightarrow$ Batas Kuantitasi

c. Berdasarkan SD dari respon atau slope

Menggunakan sampel konsentrasi rendah, dapat digunakan SD dari residual (Sy/x); SD intresep; SD blanko.



Gambar 2.8. Kriteria LOD dan LOQ

6. Ketegaran (Robustness)

Merupakan ukuran kemampuan metode yang tetap tak terpengaruh dan bertahan terhadap pengaruh kecil, yang dilakukan secara sengaja melalui variasi pada faktor tertentu yang berpengaruh. Metode disebut robust jika memberikan tetap memenuhi persyaratan selektivitas, presisi dan akurasi. Robustness dapat diuji pada saat pengembangan metode.

7. Ketangguhan (Ruggedness)

Ketangguhan metode adalah derajat ketertiruan hasil uji yang diperoleh dari analisis sampel yang sama dalam berbagai kondisi uji normal, seperti laboratorium, analisis, instrumen, bahan pereaksi, suhu, hari yang berbeda, dll.

Ketangguhan biasanya dinyatakan sebagai tidak adanya pengaruh perbedaan operasi atau lingkungan kerja pada hasil uji. Ketangguhan metode merupakan ukuran ketertiruan pada kondisi operasi normal antara lab dan antar analis. Ketangguhan metode ditentukan dengan menganalisis beningan suatu lot sampel yang homogen dalam lab yang berbeda oleh analis yang berbeda menggunakan kondisi operasi yang berbeda, dan lingkungan yang berbeda tetapi menggunakan prosedur dan parameter uji yang sama.

Derajat ketertiruan hasil uji kemudian ditentukan sebagai fungsi dari variabel penentuan.

Ketertiruan dapat dibandingkan terhadap keseksamaan penentuan di bawah kondisi normal untuk mendapatkan ukuran ketangguhan metode.

8. Efek Matriks

Efek matriks dilakukan apabila analisis menggunakan spektrometri massa. Karakteristik ini dilakukan untuk mengetahui proses ionisasi dari analit dan baku dalam pada detektor MS dengan adanya komponen-komponen lain di dalam matriks pada sampel. efek matriks menjadi perhatian utama karena secara negatif mempengaruhi keakuratan, reproduktifitas, dan sensitivitas. Senyawa dengan berat molekul besar, bersifat polar, dan senyawa dasar (*basic compounds*) adalah kandidat yang dapat menyebabkan efek matriks.

Efek matriks dievaluasi dengan cara membandingkan respon analit larutan baku (A) dengan respon blangko yang di *spiked* baku dengan konsentrasi yang sama (B). Jika efek matriks memberikan nilai 100% berarti tidak ada pengaruh matriks, tetapi jika kurang dari 100% berarti terjadi supresi ion. Sedangkan jika efek matriks lebih dari 100% berarti terjadi peningkatan ion.

$$EfekMatrik = \frac{B}{A} \times 100\%$$

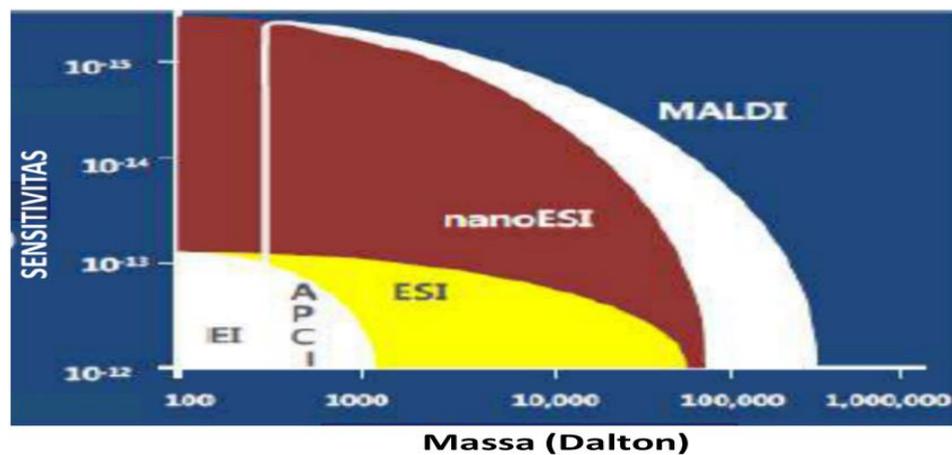
Apabila tidak tersedia blangko, efek matriks dapat dievaluasi dengan cara membandingkan respon analit dalam larutan baku dengan respon analit yang terdapat di dalam sampel. Sampel di *spiked* dengan larutan baku pada konsentrasi yang diketahui, karena tidak ada blangko sampel, respon senyawa dihitung melalui pengurangan respon sampel yang tidak di *spiked* dengan sampel yang di *spiked*.

BAB 3

SPEKTROMETER MASSA

A. SUMBER PENGION

Sumber pengion adalah bagian dari spektrometer massa yang mengionisasi bahan-bahan yang akan dianalisis. Ruang ionisasi biasanya juga diisi dengan gas nebulator sehingga analit yang sebelumnya berupa cairan akan diubah menjadi molekul gas bermuatan. Molekul gas bermuatan tersebut akan bergerak menuju penganalisis massa. Dalam KCKUT-SM/SM sumber pengion yang digunakan adalah fase padat (MALDI) dan fase cair (ESI, APCI, dan APPI)

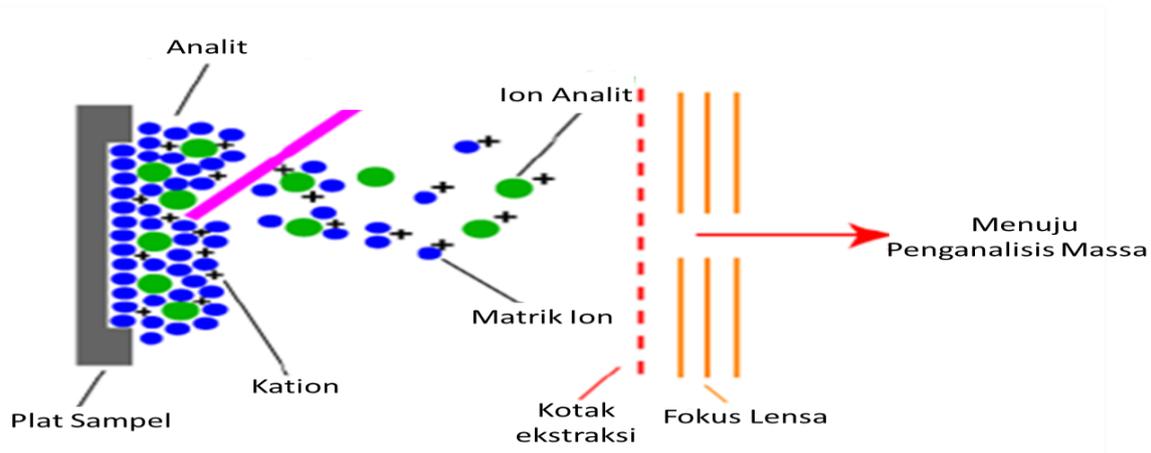


Gambar 3.1. Diagram sumber pengion berdasarkan massa senyawa dan sensitivitas (sumber: Jo-Seop Kang, 2012. Telah diolah kembali)

1. MALDI (*Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization*)

Ionisasi dengan MALDI melalui 2 tahap, pertama; senyawa yang akan dianalisis, dilarutkan dalam pelarut organik dengan molekul kecil yang disebut matriks. Molekul tersebut harus memiliki absorpsi yang kuat terhadap panjang gelombang laser. Campuran ini dikeringkan sebelum analisis dan pelarut cair yang digunakan saat preparasi harus dihilangkan. Hasilnya adalah deposit larutan padat dari matriks analit. Molekul analit berada dalam matriks sehingga molekul terisolasi satu sama lain. Tahap kedua dilakukan iradiasi gelombang laser yang intens dalam jangka waktu singkat dengan kondisi vakum, iradiasi ini memicu peningkatan suhu matriks kristal secara cepat oleh akumulasi energi dalam fase terkondensasi melalui eksitasi matriks molekul. Pemanasan secara cepat tersebut menyebabkan sublimasi secara lokal pada matriks ionl, dan penguapan matriks menjadi fase gas. Terjadi *photoionization* fase gas sehingga terjadi pembentukan ion. Ion dari fase gas kemudian diakselerasi oleh medan

elektrostatik menuju penganalisis massa. Gambar berikut menunjukkan diagram proses MALDI.



Gambar 3.2. Diagram Prinsip Ionisasi dengan MALDI (Paul JG, 2014. Telah diolah kembali)

Kebalikan dari sumber ionisasi lain yang menghasilkan sinar ion secara terus menerus, MALDI merupakan teknik getaran ionisasi yang menghasilkan beberapa ion dalam proses yang perlahan. Sifat getaran ionisasi MALDI sangat cocok dengan penganalisis massa *time-of-flight* (*ToF*). Selain itu, penganalisis massa *ToF* mampu menganalisa ion dengan rentang massa yang luas sehingga dapat menganalisis ion dengan massa besar yang dihasilkan oleh MALDI. Oleh karenanya ionisasi MALDI sering dikombinasikan dengan penganalisis massa *ToF* (spektrometer MALDI-*ToF/ToF*). Walaupun begitu, MALDI juga dapat dikombinasikan dengan penganalisis massa lain seperti *ion trap* atau *fourier transform mass spectrometers*.

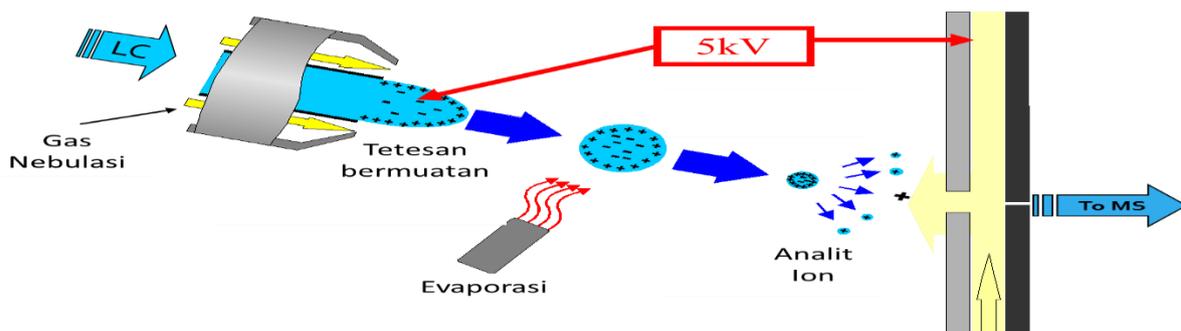
2. ESI (*Electrospray Ionization*)

Ionisasi dengan ESI melalui 3 tahap; produksi tetesan bermuatan, pengurangan ukuran tetesan bermuatan dan fase gas pembentukan ion.

Tahap pertama, analit bersama dengan eluen dari Kromatografi cair dipompa masuk menuju kapiler. Di dalam kapiler terdapat anoda (kutub negatif) pada *Taylor cone* dan katoda (kutub positif) pada kapiler. Kutub ini berfungsi agar muatan yang berkumpul pada *taylor cone* adalah muatan positif sehingga nantinya saat terjadi penyemprotan dan terbentuk *droplet* (tetesan) tidak bergabung menjadi tetesan yang lebih besar lagi. Didalam kapiler yang sangat sempit dan bertegangan tinggi akan terjadi nebulasi, analit berinteraksi dengan lapisan permukaan pelarut menghasilkan tetesan bermuatan positif/negatif.

Tahap kedua, tetesan bermuatan ini akan mengalami pengurangan ukuran karena menguapnya pelarut, meningkatnya kerapatan muatan pada partikel sehingga meningkatkan tegangan permukaan dan tetesan akan pecah menjadi tetesan-tetesan lebih kecil (a. Analit dengan satu muatan dan beberapa muatan (analit ion), b. Satu analit bersama solven yang diliputi muatan positif, c. Beberapa analit bersama beberapa solven diliputi beberapa analit).

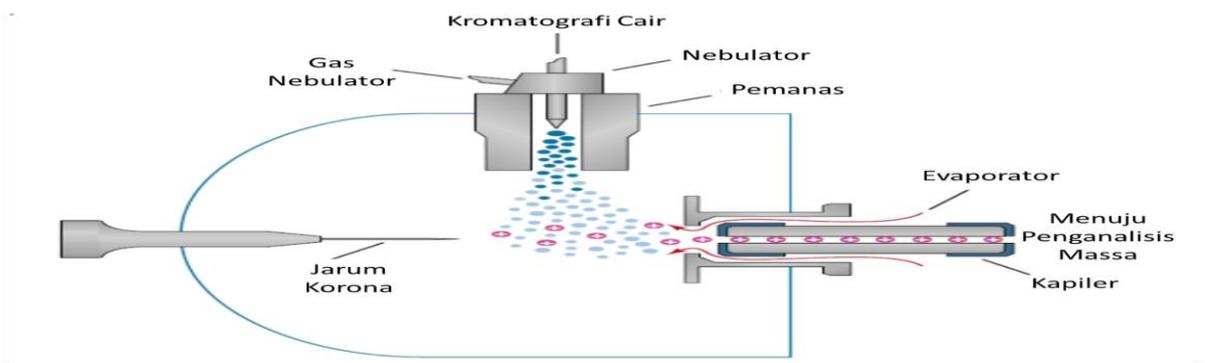
Tahap terakhir, analit ion akan masuk ke dalam *cone* dimana di sisi kiri dan kanannya sudah mengalir gas nitrogen, gas ini berfungsi agar analit yang terbentuk stabil dan tidak terganggu oleh gas oksigen. Tetesan tersebut ditransfer melalui lubang kapiler penganalisis massa.



Gambar 3.3. Diagram Prinsip Ionisasi dengan ESI (Manual Part Number, Agilent 6400, 2009. Telah diolah kembali)

3. APCI (*Atmospheric Pressure Chemical Ionization*)

Pada APCI, sampel yang berasal dari kromatografi cair diuapkan dengan cara dipanaskan oleh gas nebulator. Kemudian, komponen polar dari pelarut yang menguap diionisasi oleh lecutan bertegangan tinggi dari jarum korona sehingga bermuatan. Molekul pelarut kemudian mentransfer muatannya ke molekul analit yang terionisasi, molekul-molekul tersebut kemudian melewati lubang menuju ke penganalisis massa.



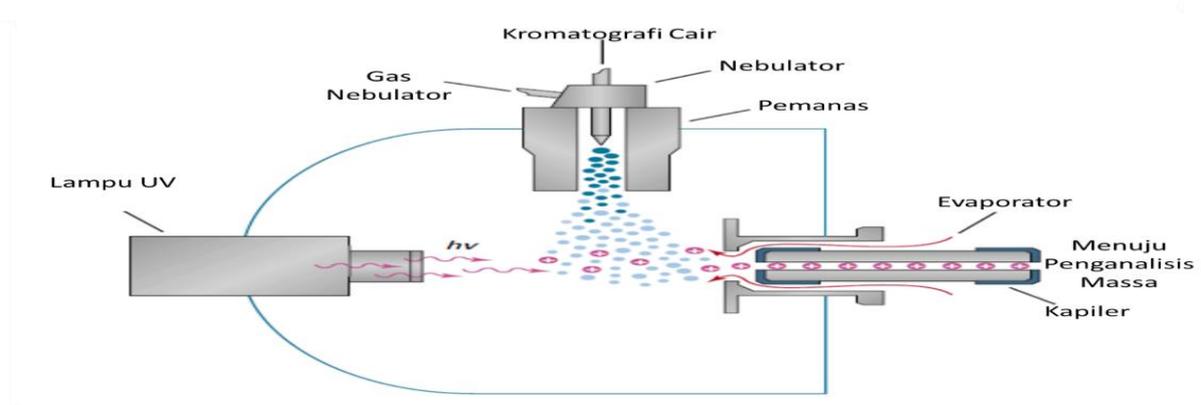
Gambar 3.4. Diagram Prinsip Ionisasi dengan APCI (Manual Part Number, Agilent 6400, 2009. Telah diolah kembali)

4. APPI (*Atmospheric Pressure Photo Ionization*)

Sampel dalam larutan diuapkan dengan pemanasan nebulizer mirip dengan metode pada APCI. Setelah penguapan, analit berinteraksi dengan foton yang dipancarkan oleh lampu pemancar. Foton ini memicu rangkaian reaksi fase gas yang mengarah pada proses ionisasi molekul sampel.

Perbedaan dari metode APCI adalah adanya penggunaan lampu pemancar foton. Manfaat dari metode ini adalah metode ini mempunyai potensi untuk mengionisasi senyawa yang tidak dapat diionisasi oleh APCI dan ESI, yakni senyawa yang non-polar. Analit dalam proses APPI mode positif diionisasi dengan fotoionisasi langsung atau pertukaran muatan atau transfer proton. Ionisasi langsung dan pertukaran muatan memungkinkan ionisasi non-polar tersebut dimana pada APCI dan ESI tidak dapat dilakukan.

Lampu UV pada umumnya digunakan untuk menghasilkan foton pada energi yang lebih tinggi dibandingkan potensial ionisasi dari analit namun lebih rendah dari gas atmosferik dan pelarut yang digunakan



Gambar 3.5. Diagram Prinsip Ionisasi dengan APPI (Manual Part Number, Agilent 6400, 2009. Telah diolah kembali)

B. PENGANALISIS MASSA (*ANALYSER*)

Bagian terpenting dari spektrometri massa adalah mass *analyser*, yang memisahkan ion-ion berdasarkan massanya yang dibagi sesuai muatannya, rasio m/z nya. Hal ini bisa menjadi molekul ion bermuatan positif, yang diadisi dari kombinasi ion molekul dan pelarut atau komponen fase gerak, ion fragmentasi dari ruang benturan/tumbukan (*collision chamber*), atau ion bermuatan negatif yang dihasilkan ketika polaritas diaktifkan pada ruang ionisasi dan dalam memanjangkan dan memfokuskan lensa. Tujuan dari analisa ini adalah untuk menahan ion, memilih ion massa tertentu karena frekuensi radio (RF) dan Arus searah (dc), dan memindahkan ion yang dipilih ke detektor untuk dianalisis.

Tabel 3.1. Tipe Penganalisis Massa pada Spektrometri Massa

Type Analyser	Lambang	Prinsip Pemisahan
Quadrupole	Q	m/z (stabilitas tranjektor)
Ion trap	IT	m/z (resonansi frekuensi)
Time-of-light	TOF	Velocity
Fourier Transform ion cyclotron resonance	FTICR	m/z (resonansi frekuensi)
Fourier Transform orbitrap	FT-OT	m/z (resonansi frekuensi)

Semua *mass analyser* menggunakan listrik statis atau dinamis dan medan magnet yang bisa bekerja sendiri atau gabungan. Perbedaan mendasar antara berbagai jenis *mass analyser* yaitu cara analisa untuk mencapai pemisahan. *Scanning analysers* mentransmisikan ion dengan massa yang berbeda berturut-turut sepanjang skala waktu. Alat ini merupakan salah instrumen sektor magnetik dengan *flight tube* di medan magnet, sehingga hanya ion yang memiliki rasio m/z yang bisa lewat pada waktu tertentu atau *quadrupole instrument*. Namun, analisa lainnya memungkinkan transmisi simultan dari semua ion, seperti analisa magnetik dispersif, TOF *mass analyser* dan *the trapped-ion mass analysers* yang cocok untuk perangkap ion, *the ion cyclotron resonance* atau *the orbitrap instruments*. *Analysers* dapat dikelompokkan berdasarkan sifat-sifat lainnya, misalnya ion beam versus jenis *ion trapping*, *continuous* versus *pulsed analysis*, energi kinetik rendah versus tinggi.

1. Quadrupole Analyser

Merupakan tipe pertama yang digunakan pada sistem LC/MS dan sejauh ini masih menjadi yang termurah dan paling banyak digunakan. Sistem ini digunakan untuk menggambarkan *analyser* dan operasi detektor. *Quadrupole* merupakan jantungnya spektrometri massa, yang terdiri dari empat batang kuarsa silinder yang dijepit pada sepasang klem keramik. Ruang hiperbolik antara batang berlawanan diagonal sangat penting untuk operasi spektrometri massa. Tahap pertama yaitu memindahkan ion-ion bermuatan dari ionisasi *interface* ke dalam area dalam *analyser* bervakum tinggi melalui lubang masuk. Muatan tegangan yang bervariasi pada lensa focus dengan polaritas yang sama dengan molekul ion menekan sinar ion menjadi arus intens ketika memasuki quadrupole.

Aliran ion yang memasuki *quadrupole* dipaksa menjadi *corkscrew*, gelombang sinus tiga dimensi dengan efek gabungan dari dc yang diterapkan pada batang dan sinyal RF yang menyapu batang *quadrupole*, menghasilkan medan elektromagnetik dari *analyser*. Kombinasi dc/RF yang diterapkan pada batang tersapu ke arah kekuatan medan yang lebih tinggi (atau

lebih rendah) dengan generator dc/RF yang dikendalikan komputer, mengganggu semua gelombang sinus tapi hanya fragmen massa tunggal pada frekuensi tertentu. Massa tunggal ini mengikuti jalur yang stabil di sepanjang *analyser* dan tercermin ke permukaan detektor oleh lensa *amu offset*. Beberapa fragmen ion yang tidak lewat pada frekuensi dc/RF yang diberikan mengikuti jalur perusakan yang tidak stabil dan akhirnya berbenturan dengan dinding batang *quadrupole*, mengambil elektron penetral muatan. Karena sinyal dc/RF naik hingga frekuensi yang lebih tinggi, massa yang lebih besar menggiring untuk menyambar *faceplate* detektor secara berurutan. Fragmen yang melewati *analyser* menyambar permukaan luar dari *detector ion* setelah diblokkan jauh dari jalur linear *analyser* dengan lensa yang disebut *amu offset*.

Ketika molekul ion menyambar permukaan detektor, menyebabkan elektron dengan cepat menuju permukaan bagian dalam *detector ion*. Elektron tersebut menyambar bagian dalam *horn*, menghasilkan pancuran elektron sekunder. Perkembangan kaskade elektron ini memantul menuruni sisi runcing dari *detector ion* yang akhirnya mencapai output terminal, menghasilkan sinyal sangat kuat, yang kemudian menyebabkan converter A/D memberikan sinyal ke sistem komputer. Sinyal ini discan pada rentang melebihi 35.000 poin per detik dan dikombinasikan dengan sinyal dc/RF untuk menghasilkan spektrum dan sinyal arus ion dari spektrometri massa, yang kemudian akan menghasilkan total ion kromatogram. Pemeriksaan spektrum pada waktu tertentu akan memberikan informasi tentang berat molekul senyawa atau fragmentasi ion yang ada dalam pemisahan pada waktu itu.

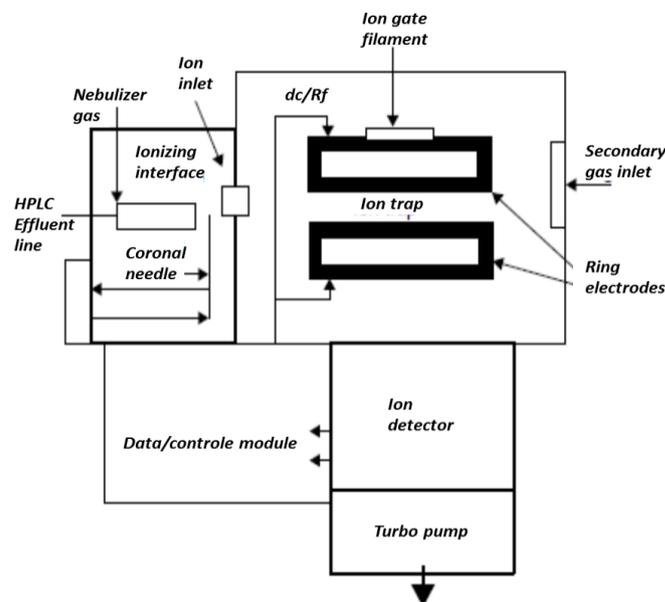
2. Ion Trap Analyser

Spektrometri massa perangkat Ion (ITDs, ITMSs, dan sistem perangkat ion linear) banyak digunakan di laboratorium analitis. Mereka mengklaim bahwa *analyser* ini 10 sampai 100 kali lebih sensitif dari *quadrupole*. Dengan ini dapat dengan mudah beralih antara APCI, CI, dan mode EI, mudah dalam perawatan, dan memiliki potensi untuk digunakan pada studi MS/MS.

Detektor ion trap (ITD) dan spektrometri massa perangkat ion *floor-standing* (ITMS) bervariasi dalam ukuran dan punya tambahan fungsi yang lebih dari pada teori pengoperasiannya. ITMS dirancang dapat digunakan untuk pengoperasian dengan MS dan MS/MS. ITD merupakan unit yang praktis dengan perangkat dan sistem pompa yang lebih kecil, yang dirancang untuk pengoperasian GC/MS atau LC/MS.

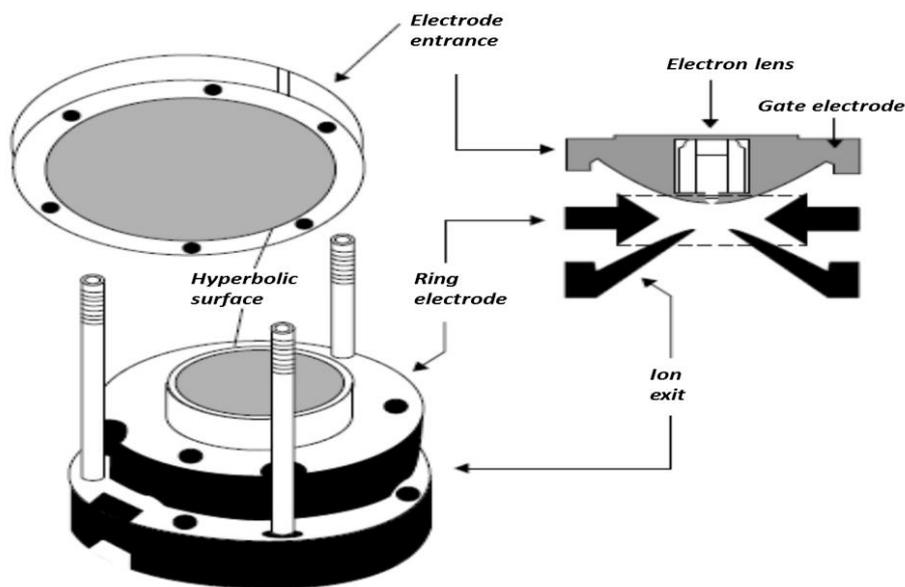
Molekul yang dimasukkan ke dalam perangkat ion ITD dari sumber ionisasi atmosfer benar-benar diproses dalam perangkat ion. Molekul-molekul terionisasi masuk ke dalam perangkat dari lubang kecil di sisi cincin elektroda dan diproses dalam segmen bola orbit stabil

tiga dimensi antara elektroda dengan tegangan perangkat dari sumber dc/RF. Molekul-molekul tersebut kemudian dielusasi dalam peningkatan massa (m/z) dengan meningkatkan tegangan dc/RF pada cincin elektroda. Keadaan ini mendorong setiap ion fragmen ke dalam orbit yang tidak stabil, yang menyebabkannya keluar melalui salah satu dari tujuh lubang pada jalan keluar elektroda dan menuju ke dalam detektor *multiplier dynode* elektron, yang akan mengirimkan sinyal ke sistem data. *Detector horn* berada langsung di bawah jalan keluar elektroda. Pompa turbo dipasang langsung di bawah dan melekat pada bagian perangkat ion oleh *Viton O-ring gasket*, yang diapit dalam *manifold* vakum panas. Pada manifold juga terdapat pelengkap untuk katup gas kalori (*cal gas valve*), suatu jalan masuk untuk gas ionisasi kimia, dan terminal efluen (*port exhaust*) agar baling-baling dapat memutar pompa mekanik. Susunan perangkat ion memungkinkan untuk penambahan gas kolisi, seperti karbon dioksida, metana, atau amonia. Benturan dari ion molekul terionisasi tertentu yang terperangkap antara cincin elektroda dengan gas ini dapat menyebabkan fragmentasi untuk membantu dalam identifikasi struktur molekul ion target.



Gambar 3.6. Perangkat ion tiga dimensi

Hanya volume sampel terbatas yang bisa masuk perangkat ion tanpa *overloading* dan menyebabkan penurunan kinerja. Kolom kapiler *narrow-bore* dengan aliran 1 mL/menit dapat langsung dihubungkan, atau kolom pemisah dapat digunakan untuk mengalihkan bagian dari aliran LC untuk detektor sekunder. Setelah sampel terperangkap, jika belum terionisasi dalam sebuah *interface* tekanan atmosfer, dapat diionisasi dengan elektron 70-V dari gerbang ion dalam jalan masuk elektroda di bagian atas perangkat.



Gambar 3.7. Elektroda perangkap ion

Filamen elektroda panas yang diposisikan di atas pelat perangkap cincin elektroda dapat memberikan elektron termionik untuk ionisasi lebih lanjut saat menginduksi fragmentasi. Antara filamen dan filamen bagian yang tidak terpakai terdapat pelat *repeller* yang mendorong elektron menuju ruang penahanan perangkap ion. Di bagian dasar elektroda ionisasi terdapat gerbang elektron dengan muatan bervariasi. Ketika pintu gerbang memiliki muatan negatif tinggi, elektron menetap pada elektroda; ketika pintu gerbang bermuatan positif, elektron dipaksa ke dalam ruang penyimpanan dan mengionisasi molekul dari sampel.

Cincin elektroda di sekitar ruang penahanan memiliki variabel tegangan sinyal RF yang konstan. Tegangan penyimpanan 125 V ac diterapkan untuk menjebak semua ion dengan massa sama dengan atau lebih besar dari 20 amu. Pada tegangan ini, ion yang terbentuk akan membentuk segmen orbit hiperbolik yang digambarkan menyerupai jahitan pada bola bisbol.

Sekitar 50% dari semua ion yang terbentuk diperkirakan terjebak dan akhirnya mencapai detektor. Hal ini sebanding dengan ion tunggal pada waktu tertentu yang mencapai detektor pada *quadrupole*; sebagian besar ion berakhir dengan benturan dengan batang *quadrupole* dan tidak teranalisa. Hasil peningkatan ion ini menjelaskan peningkatan sensitivitas dari detektor perangkap ion. Beberapa peningkatan stabilitas *analyser* perangkap ion berasal dari kurangnya akumulasi sampel pada elektroda, meskipun hal ini akan bervariasi antara satu sampel dengan sampel lainnya. Pembuatan gas helium biasanya ditambahkan dari garis benturan gas dan berperan penting dalam menstabilkan ion dalam orbitnya. Seringnya terjadi benturan antara

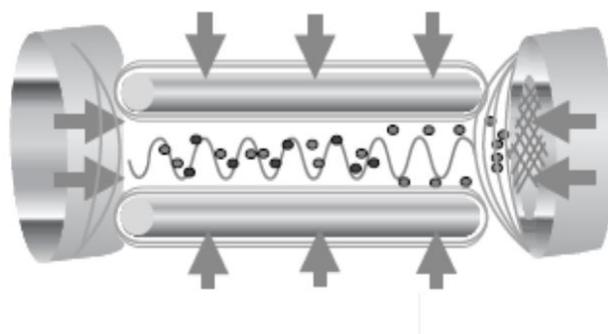
molekul gas kecil yang bergerak cepat dan ion bermuatan akan meredam gerakan molekul-molekul tersebut, yang menyebabkannya jatuh ke dalam pusat perangkap. Stabilitas orbital ion juga ditingkatkan dengan menerapkan modulasi aksial, yang merupakan tegangan antara elektroda ionisasi dan elektroda yang keluar pada frekuensi sekitar satu setengah dari tegangan cincin elektroda. Kondisi Ini memiliki efek pada pergerakan ion menjauh dari pusat perangkap, di mana tegangan adalah nol. Hal ini membantu dalam pelepasan ion dari perangkap dan mempertajam resolusi massa secara drastis pada detektor.

Analisa dilakukan secara bertahap dengan meningkatkan tegangan scanning cincin elektroda. Hal ini dapat mengganggu orbit ion dengan meningkatnya massa, yang menyebabkannya keluar melalui lubang jalan keluar elektroda dan menyambar permukaan *dynodes*. Pemindaian dilakukan dalam empat segmen pada kisaran pemindaian penuh. Hal ini memungkinkan untuk memanipulasi tinggi *peak* massa dan modifikasi *tune*. Dengan alat ini, *tune* dapat disesuaikan untuk memenuhi persyaratan rasio *peak* tertentu. Fragmen perangkap Ion memindai menggunakan empat segmen *scanning* yang dapat digunakan dalam mencari *database library* yang ada untuk mengidentifikasi senyawa.

Detektor perangkap ion adalah multiplier elektron *dynode* yang telah kita lihat sebelumnya menggunakan sistem *quadrupole*. Adanya ion positif menyebabkan permukaan katoda kaca oksida melepaskan elektron dari permukaan dalamnya, yang memantul ke dinding bagian bawah, kemudian melepaskan elektron pada setiap kontak. Sebanyak 100.000 dari kontak positif tunggal akan mencapai bagian anoda dan mengirim sinyal ke sistem data.

Linear Ion Trap Analyser

perangkap ion linear mengkombinasikan kemampuan pemisahan dari *analyser quadrupole* dengan kemampuan perangkap ion MS/MS. Cincin penjebak elektroda ditambahkan ke setiap ujung batang *quadrupole* untuk menciptakan perangkap ion linear.



Gambar 3.8. Perangkap ion Linier

Analyser dapat dijalankan dalam mode pemindaian *quadrupole* normal untuk pemisahan dan deteksi massa ion, atau elektroda dapat diaktifkan untuk mempertahankan ion tertentu dalam perangkat untuk berbenturan dengan gas peredam dan fragmentasi yang dapat dibantu dengan tambahan resonansi tegangan eksitasi. Fragmen *daughter ion* kemudian dapat dilepaskan menuju detektor ion secara berurutan dengan memindai tegangan dc/RF pada batang *quadrupole* sekaligus menggunakan tegangan resonansi tambahan pada elektroda yang terperangkap. Keuntungan dari perangkat ion linear dibandingkan dengan perangkat ion melingkar adalah kapasitasnya. Perangkat ion normal menjebak ion-ion dalam segmen berbetuk bola di antara cincin elektroda. Perangkat linier memiliki volume perangkat yang membentang seperti sosis di bagian tengah batang kutub *quadrupole*, sehingga dapat meningkatkan kapasitas perangkat ini. Beberapa laporan menyatakan bahwa peningkatan ini dapat mencapai 10 sampai 70 kali lipat dari perangkat ion melingkar. Ini berarti bahwa peningkatan sensitivitas analisis komponen minor dari efluen HPLC untuk menganalisa *trace* metabolit atau fragmen kecil dari sekuensing protein. Perangkat ion linier saat ini cukup mahal, instrumen penelitian berdiri sendiri, namun perbaikan dan penyederhanaan teknik tampaknya menjadi potensi besar untuk menghasilkan desktop LC/MS/MS yang murah.

3. Time-of-Flight Analyser

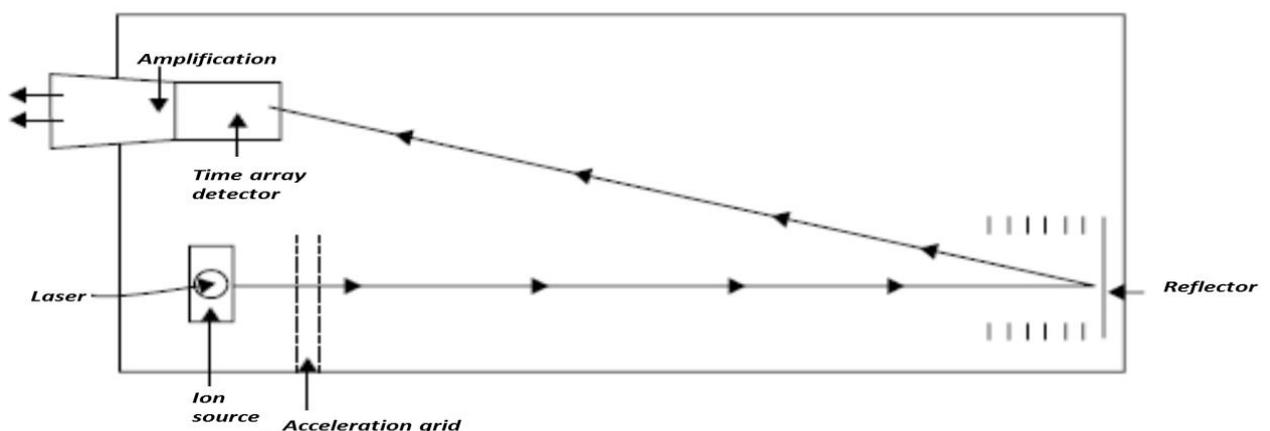
Time-of-Flight Analyser dapat menganalisis molekul biologis yang sangat besar. Sistem LC/MS *Time-of-Flight* biasanya ditemukan dalam penentuan struktur protein di mana sistem LC/MALDI-TOF/MS digunakan untuk analisis protein, peptida, dan polinukleotida. Aliran cairan dari HPLC dikumpulkan pada sumur pelat *spotter*, dicampur dengan kromofor seperti amino acid krotonat yang akan menyerap cahaya dari tembakan laser intensitas tinggi dalam sumber spektrometri massa. Molekul target ini kemudian meledak, melemparkan protein yang menyertainya ke fase gas sambil mengionisasinya secara kimia. Karena kelompok amino bebas pada rantai samping memberikan situs ionisasi beberapa kali lipat, kelipatan ion molekul bermuatan tersebut terbentuk untuk protein.

Interface terdiri dari sistem plat *spotter* otomatis yang mengambil efluen HPLC, mencampurnya dengan matriks sampel seperti asam α -siano-4-hydroxycinnamic, kemudian campurannya dikeringkan. Spot-spot ini kemudian ditembakkan dengan laser respon cepat getar pendek dalam injektor spektrometri massa untuk desorpsi ionisasi ke dalam *flight tube*. Spektrometri massa *Time-of-Flight* menggunakan laser UV untuk menembak-ionisasikan sampel dari GC pada sumbernya. Fragmen-fragmen tersebut menuju ke *flight tube* melalui lensa fokus. *Flight time* dari setiap fragmen tergantung pada rasio m/z-nya. Fragmen yang lebih

ringan tiba di detektor lebih dahulu. Untuk mendeteksi fragmen m/z , setiap elemen detektor berarus dioda diaktifkan hanya untuk jendela tertentu, yang memungkinkan pemilihan hanya pada massa tunggal per ledakan. *Flight time* sangat cepat, pada angka 90 ns untuk 2-m *flight tube*.

Susunan elemen detektor diode diatur untuk mengambil sampel arus *flight* mencapai detektor pada waktu yang berbeda. Dengan menggunakan teknik ini, seluruh pola ledakan fragmen dapat dianalisis untuk setiap aktivitas, yang sangat meningkatkan sensitivitas sistem. Penjumlahan waktu yang dihasilkan memungkinkan peningkatan 10.000 kali lipat sensitivitas. Susunan-susunan tersebut dibatasi oleh gangguan yang melekat pada susunan dan terbatasnya jumlah elemen susunan yang tersedia untuk melakukan sampling. Susunan 50 x 50 yang memberikan 2.500 poin sampel. Untuk rentang deteksi 0-800 amu memberikan resolusi 0,3 amu. Resolusi *quadrupole* yang khas adalah 0,1 amu atau lebih baik.

Pelipatan tabung menggunakan "cermin" listrik untuk mencerminkan dan mempercepat aliran *flight* fragmen kembali ke *flight tube* untuk menyambar detektor (Gambar 15). Fragmen yang bergerak menuju *flight tube* dan dipisahkan pada massa m/z -nya. Analisis ion molekul dari protein tunggal yang dibedakan dengan ukuran muatannya, z , memungkinkan perhitungan berat molekul protein asli. Muatan sebesar 20 sampai 50 kali lipat pada ion radikal memungkinkan ukuran enzimatik protein (MW = 25 sampai 60 kDa) untuk dipisahkan dari spektrometri massa *Time-of-Flight* dengan rentang pemisahan dari 0-2000 Amu.



Gambar 3.9. Reflectron TOF-MS

4. Fourier Transform Analyser Design

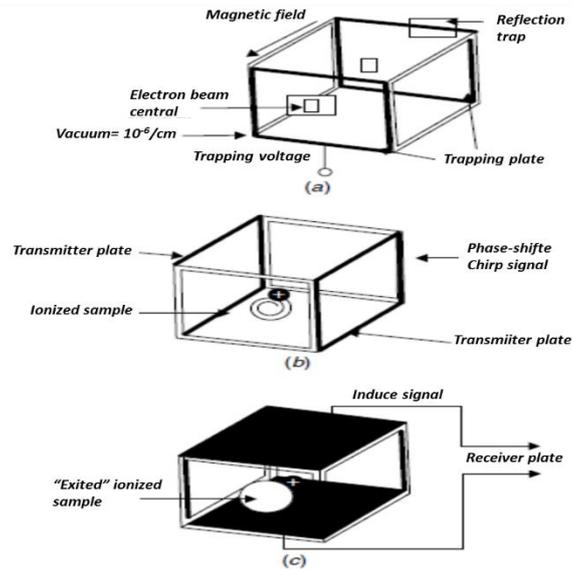
Spektrometri massa *Fourier Transform* membutuhkan komputer yang dapat mengkonversi on-line volume besar frekuensi data spektral dengan cepat. Sistem LC/MS

menggunakan *Fourier transform analyser* menghasilkan spektrum massa menggunakan resonansi ion siklotron. Sampel terionisasi dan pelarut dihilangkan oleh *interface* penyemprot ion dan menuju ke dalam sel analisis, yang terjadi pada medan magnet konstan pada sepasang pelat perangkap. Setiap fragmen akan mengikuti orbit melingkar dengan karakteristik frekuensi siklotron nilai m/z -nya.

Untuk mendeteksi keberadaan fragmen, sinyal frekuensi penuh “*chirp*” diterapkan dari sepasang pelat transmitter perpendikuler sampai pelat penjebak. Ion-ion mengabsorpsi energy dari *chirp* pada frekuensi siklotroniknya dan didorong menuju orbit yang lebih tinggi. Pelat detektor perpendikuler sampai bidang ketiga sel menghitung kompleks sinyal yang mengandung semua frekuensi fragmen yang menarik.

Software *Fourier Transform* mengkonversi cuplikan frekuensi ion menjadi spectrum nilai m/z yang ada pada sampel. Seperti detektor susunan spasial, setiap fragmen dianalisa untuk setiap tembakan ionisasi. Instrumen yang paling umum menggunakan spectrometer massa *fourier transform* adalah instrument hibrida yang menggunakan *fourier transform analyser* untuk menghitung massa *daughter ion* dari sel kolisi.

Analyser ini dapat mengkombinasi kecepatan penghitungan dan sensitivitas sesuai keinginan. Penghitungan dapat dilakukan dalam satuan milisekond dan digunakan untuk memonitor reaksi fase gerak yang sangat pendek. Karena fragmen ion tidak dihancurkan dalam sel, beberapa pengukuran dari waktu ke waktu dapat dirata-ratakan untuk menghasilkan pengukuran yang sangat akurat, resolusi tinggi, dan dengan sensitivitas yang baik. Sinyal tersebut cenderung sangat stabil dan tidak bergantung pada optic ion atau variasi detektor. Komputer modern dapat dengan mudah memberikan perhitungan transformasi yang cukup cepat untuk memberikan *real-time* data.

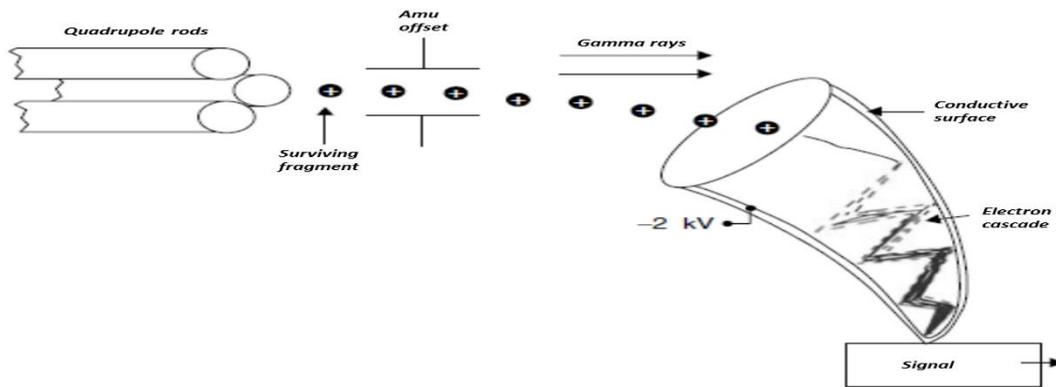


Gambar 3.10. *Fourier transform analyzer: (a) pulse; (b) eksitasi chirp; (c) resonan sinyal frekuensi*

C. DETEKTOR

Detektor ion yang paling umum digunakan oleh sistem dan perangkat ion menggunakan mode deteksi *impact/cascade/multiplier*. Ketika ion bermuatan menyambar/menumbuk permukaan membran detektor menyebabkan elektron akan dilepas dari sisi lain. Elektron ini kemudian menyambar dinding pelapis detektor, melepaskan beberapa elektron pada masing-masing tumbukan. *Multiplier* elektron ini menguatkan sinyal kontak untuk ditransfer ke sistem data. Dalam sistem data, data yang diterima dikonversi ke dalam kekuatan sinyal kromatogram berbanding waktu sebagai total ion kromatogram (TIC).

Spektrometri massa juga dapat mengetahui nilai m/z dari setiap titik waktu dari sinyal RF yang menyapu sinyal yang dikirim ke analyzer. Data ini dikombinasikan untuk sejumlah *scan* dan berat molekul ion. Nilai m/z yang ditentukan untuk masing-masing *peak* mungkin ditampilkan di atas *peak*, tapi ini tergantung pada sistem perangkat lunak yang digunakan. Dalam kondisi lain, tabel yang dihasilkan menampilkan m/z berbanding waktu retensi berbanding kekuatan sinyal ion total.



Gambar 3.11. Detektor Ion

Pada penganalisis massa *Time-of-flight* menggunakan ionisasi *interface* tekanan atmosfer standar dan sel perangkat untuk memberikan semburan ion pada *flight tube* untuk pemisahan dan deteksi oleh detektor ion. Ion-ion molekul yang menyambar permukaan detektor menginduksi *multiplier* elektron dalam bagian detektor yang memperkuat sinyal fragmen tunggal, mengirimkan sinyal kuat ke detektor. Sinyal ini dapat diperkuat lagi dengan tabung *multiplier* elektron, untuk memberikan sinyal yang cukup kuat bagi sistem pengolahan data. Penganalisis massa *Time-of-flight* umumnya menggunakan detektor susunan dioda (*diode-array impact*), dengan masing-masing elemen dalam susunan tersebut diaktifkan untuk mendeteksi pada waktu tertentu. Sinyal ini dapat dikonversi ke sinyal berbanding massa dengan perbandingan standar kalibrasi *flight times*.

Data dan Sistem Kontrol

Sistem Data mencatat kekuatan sinyal semua ion yang dilepas ke detektor ion pada waktu tertentu. Suatu sistem data menyimpan semua informasi spektrum dari kromatografi yang dijalankan pada blok data tiga dimensi. Ion kromatogram atau total ion kromatogram merupakan plot dari jumlah kekuatan sinyal dari semua ion yang ada berbanding waktu. Untuk sistem *interface* IS, akan menjadi massa tunggal untuk ion molekul. Dalam sistem perangkat ion kita dapat membaca ion molekul, memenuhi *chamber* dengan gas berat, fragmentasi ion molekul, dan kemudian membaca massa ion fragmen. Jika kita menampilkan data fragmentasi, spektrum akan menjadi *bar chart* dari semua massa fragmen dan kekuatan sinyalnya. Frekuensi sinyal RF/DC dikalibrasi dengan standar massa yang diketahui dan muatan untuk memperoleh nilai m/z . Hal ini memberikan informasi sebanyak yang diinginkan tentang fragmentasi suatu sampel saat pertama kali kita menjalankan kromatogram baru pada bahan yang tidak diketahui. Kita dapat mengatur spektrometri massa dalam mode scan untuk

memperoleh data dari rentang frekuensi dc/RF cukup luas untuk menutupi rentang nilai-nilai m/z yang diharapkan sekaligus meniadakan nilai massa rendah dari udara dan pelarut. Kita perlu mengatur tingkat penyampelan sinyal dan membiarkannya untuk jangka waktu lama untuk membuat kromatografi berjalan, dan semua data ini harus sesuai dengan ruang penyimpanan data yang tersedia. Semakin besar jumlah titik sampel, kita dapat merata-ratakan pada frekuensi m/z dan waktu tertentu, sehingga semakin yakin yang akan kita dapat pada data. Jika kita ingin memindai lebih luas berbagai m/z , kita mungkin harus menggunakan tingkat penyampelan yang lebih rendah dan mengurangi akurasi sinyal.

Sinyal yang datang dari detektor spektrometri massa adalah tegangan terus menerus yang berubah sesuai waktu merupakan sinyal analog. Pengolahan data di komputer bekerja dengan potongan-potongan data digital. Kita harus mengubah sinyal analog dari detektor ke dalam data digital untuk menggunakannya dalam sistem komputer. Proses konversi sinyal melibatkan pengukuran perpindahan vertikal serangkaian durasi waktu yang diketahui menggunakan kartu mikroprosesor konversi A/D.

Nilai durasi waktu dan nilai-nilai perubahan intensitas sinyal disimpan sebagai perangkat data. Hal ini dianalogikan seperti penciptaan sebuah film. Gambar yang bergerak diproyeksikan pada layar yang dibuat dengan melihat serangkaian perubahan frame foto yang ekuivalen dengan waktu pengambilan data dari sinyal detektor massa analog. Foto-foto masih merupakan data digital yang digabungkan untuk menghasilkan analog *motion picture*. Data dari sinyal pengendali massa memilih rentang m/z yang berubah dengan waktu, dikombinasikan dengan tegangan detektor berbanding waktu database untuk memberikan informasi yang komputer butuhkan untuk menghasilkan ion kromatogram total, dan pada waktu tertentu, spektrum massa dihasilkan dari tegangan sinyal berbanding nilai m/z .

Deteksi dan Perhitungan *Peak*

Ketika mengoperasikan sistem LC/MS, biasanya kita mengatur sistem data sehingga kita bisa memantau arus total ion sebagai kromatogram pada layar display seperti yang dihasilkan. Setiap titik yang kita lihat pada kromatogram biasanya hasil penjumlahan dari delapan atau lebih scan dc/RF. Kita mungkin ingin mengambil dan menampilkan spektrum sebagai *peak* yang terlepas dan kita melihat *peak* yang diinginkan, untuk memeriksa berat molekul atau pola fragmentasi nya jika kita menjalankan penelitian dengan MS/MS. Informasi kualitatif dapat berasal dari spektrum seperti kita menganalisa sampel. Pola fragmentasi yang diinginkan dapat dikirim ke sistem data untuk perbandingan dengan *library* pola fragmentasi yang diketahui untuk memberikan identifikasi senyawa definitif diluar berat molekul.

Informasi kuantitatif dapat diperoleh untuk *peak* kromatografi HPLC baik dari total kromatogram ion atau dengan menggunakan sistem data untuk membandingkan informasi untuk kurva kalibrasi jumlah yang diketahui dari senyawa yang diinginkan berbanding tinggi atau area *peak*.

Dalam mendapatkan data untuk sampel yang diketahui, peningkatan sensitifitas sinyal dapat diperoleh dengan menggunakan mode pemantauan ion tunggal (*single ion monitoring/SIM*) dengan memilih satu frekuensi m/z saja dan mendapat data hanya pada point tersebut untuk menghasilkan kromatogram ion tunggal. Rentang pengambilan sampel tidak lagi harus tersebar di seluruh spektrum m/z , dan jumlah pengukuran dapat ditingkatkan untuk massa ion tunggal ini.

Kombinasi analyzer scanning yang cepat, *recovery* detektor yang cepat, dan sistem data kapasitas besar memungkinkan untuk memperoleh sekitar 25.000 poin data per detik. Ini berarti bahwa spektrum massa yang berjalan dalam mode scan 35 - 550 m/z dapat sekitar 8 sampai 10 scan dalam 1 detik. Berjalan dalam mode *single-ion*, spektrometri massa yang sama bisa menganalisis area massa 10 m/z dalam satu tahap scanning dan mendapatkan keuntungan yang luar biasa dalam sensitivitas dengan rata-rata jumlah poin yang jauh lebih tinggi di setiap 10 poin.

D. KONFIGURASI PENGANALISIS MASSA

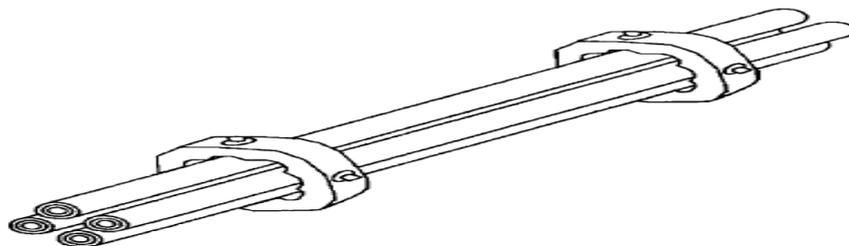
Ada empat jenis dasar sistem *analyzer* (penganalisis massa) pada UPLC-MS/MS yang umum digunakan dalam analisis laboratorium. Pertama dan yang tertua adalah penganalisis massa *quadrupole* atau yang sejenisnya, *octapole*, yang menggunakan sistim 4 batang logam dengan muatan berlawanan yang dihasilkan dari tegangan frekuensi radio (RF) dan arus searah (DC), digunakan untuk memisahkan dan memusatkan ion dari injektor pada detektor. Jenis sistem kedua adalah penganalisis massa *ion-trapping*, yang menggunakan elektroda bola tiga dimensi berbentuk seperti cincin atau *quadrupole* linier. Elektroda diberi muatan yang berasal dari tegangan RF dan DC dengan tegangan RF dibuat berubah-ubah, apabila RF naik maka orbital ion bermassa berat akan stabil, sedangkan ion yang ringan tidak stabil dan akan terjadi tumbukan dengan dinding elektroda, kemudian di keluarkan menuju detektor. Jenis sistim ketiga adalah penganalisis massa *time-of-flight*, yang menggunakan tembakan laser (laser UV) intensitas tinggi dalam sumber ion. Sampel sebelumnya dicampur dengan kromofor seperti asam amino krotonat yang akan menyerap cahaya laser tersebut. Fragmen-fragmen tersebut menuju ke *flight tube* melalui lensa focus, *flight time* dari setiap fragmen tergantung pada rasio

m/z dan memfokuskannya pada detektor. Jenis sistem keempat adalah penganalisis massa *Fourier transform*, yang memiliki volume perangkat yang dipenuhi dengan sinyal radio frekuensi, kemudian mendorong ion ke keadaan energi yang lebih tinggi dan kemudian hancur, menghasilkan modifikasi sinyal semua frekuensi yang terdeteksi dan teranalisis menggunakan *Fourier transform software* untuk memberikan intensitas yang dibandingkan dengan sinyal m/z .

Kombinasi dalam penganalisis massa dapat dilakukan pada satu jenis atau semua jenis sistem metode *analyzer* spektrometri massa dengan sel *collision* yang digunakan untuk memisahkan, memfragmentasi, dan mendeteksi dengan cara membedakan berat molekul *daughter ion* dengan *parent ion*. Kemampuan sistem MS/MS untuk menganalisis produk fragmentasi dari molekul ion memungkinkan analisis struktur untuk memastikan identifikasi suatu bahan yang dipisahkan oleh UHPLC lebih dari sekedar memberikan informasi mengenai berat molekul.

1. *Quadrupole*

Quadrupole memiliki empat batang logam silinder yang dijepit dalam susunan tabung, batang logam disusun secara presisi dan mengandung medan listrik yang berlawanan. Medan listrik berasal dari tegangan radio frekuensi (RF) dan tegangan arus searah (DC), dimana tegangan $RF > DC$. Ion difokuskan ke dalam rongga yang dibentuk oleh empat batang tersebut, hanya ion yang stabil dengan m/z tertentu yang akan sampai ke detektor. Jika m/z dan frekuensi tidak sesuai dengan kondisi yang diminta, ion akan beresilasi dengan jalur yang lebar yang menyebabkan ion berbenturan dengan dinding bagian dalam batang *analyzer quadrupole* tertarik oleh vakum dan hilang.

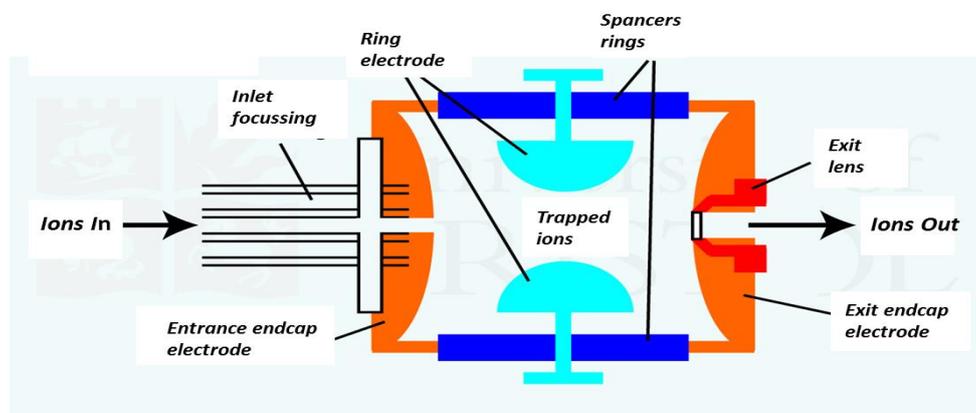


Gambar 3.12. Penganalisis massa *Quadrupole*

2. Ion-trapping

Ion trap (perangkap ion) menganalisis ion dengan cara menjebak ion pada ruang yang dapat di deteksi oleh elektroda berbentuk seperti cincin atau bias juga menggunakan batang *quadrupole* (*Linier ion trap*). Elektroda dihubungkan dengan tegangan RF dan DC. Tegangan RF diberikan berubah-ubah, apabila RF naik maka orbital ion bermassa berat akan stabil, sedangkan ion yang ringan menjadi tidak stabil dan akan terjadi benturan/tumbukan dengan dinding elektroda, kemudian di keluarkan menuju detektor ion.

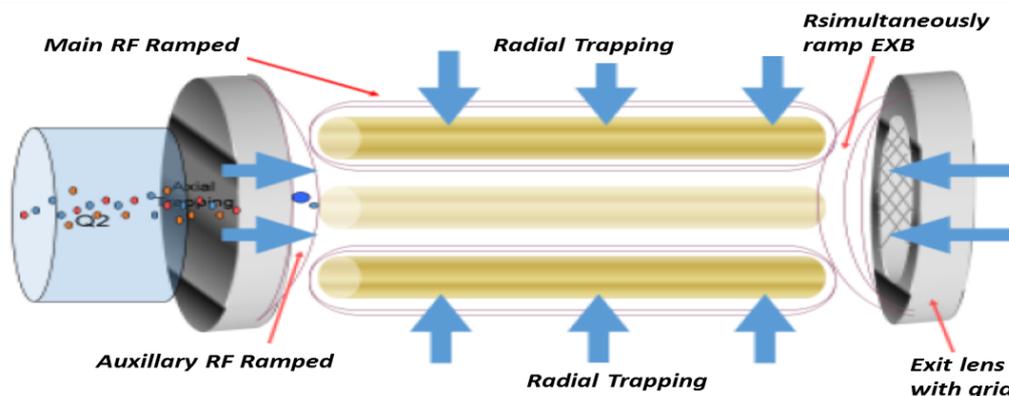
Salah satu keuntungan dari penganalisis massa perangkap ion adalah kemampuan untuk menjebak dan menahan ion spesifik antara pelat *analyzer* dan kemudian menginduksi benturan fragmentasi dengan gas yang dimasukkan ke dalam *chamber* perangkap, diikuti dengan perubahan frekuensi RF/DC untuk melepaskan ion fragmentasi ke detector ion. Hal ini memungkinkan *analyzer* untuk bertindak sebagai sistem MS/MS untuk studi struktur fragmentasi.



Gambar 3.13. Penganalisis massa *Ion Trapping*

Linier ion trap, elektroda pada penganalisis massa ini terbuat dari *quadrupole* linier yang dihubungkan ujung-ujungnya sehingga membentuk seperti donat. Penganalisis massa perangkap ini dapat menyimpan ion-ion dalam jumlah yang banyak, ketika tegangan RF naik maka ion yang ringan menjadi tidak stabil dan terjadi tumbukan dengan *quadrupole*, kemudian di keluarkan menuju detektor. Keuntungan dari perangkap ion linear dibandingkan dengan perangkap ion melingkar adalah kapasitasnya. Perangkap ion normal menjebak ion-ion dalam segmen berbentuk bola di antara cincin elektroda. Perangkap linier memiliki volume perangkap yang membentang seperti sosis di bagian tengah batang kutub *quadrupole*, sehingga dapat meningkatkan kapasitas perangkap ini. Beberapa laporan menyatakan bahwa peningkatan ini dapat mencapai 10 sampai 70 kali lipat dari perangkap ion melingkar. Ini berarti bahwa

peningkatan sensitivitas analisis komponen minor dari efluen HPLC untuk menganalisa *trace* metabolit atau fragmen kecil dari sekuensing protein.



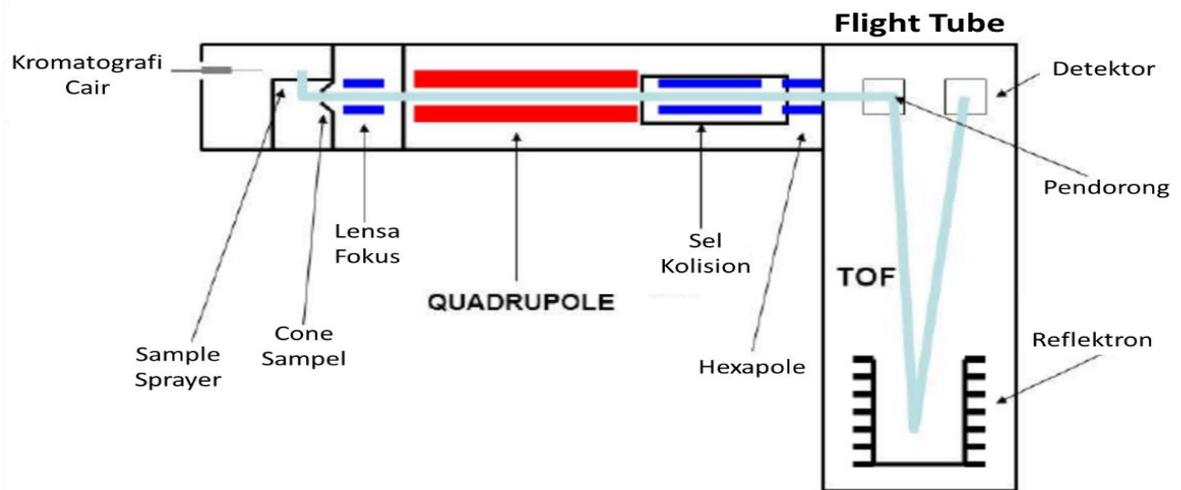
Gambar 3.14. Penganalisis massa *Linier Ion Trapping*

3. *Time-of-flight*

Time-of-flight menganalisis ion dengan cara mengumpulkan hasil kromatografi cair pada sumur pelat *spotter*, kemudian sampel dicampur dengan kromofor seperti asam amino krotonat yang akan menyerap cahaya dari tembakan laser (menggunakan laser UV) intensitas tinggi dalam sumber ion. Molekul target ini kemudian meledak, menjadi fase gas sambil mengionisasinya secara kimia. Fragmen-fragmen tersebut menuju ke *flight tube* melalui lensa fokus. *Flight time* dari setiap fragmen tergantung pada rasio m/z -nya. Fragmen yang lebih ringan tiba di detektor ion lebih dahulu. Untuk mendeteksi fragmen m/z , setiap elemen detektor berarus diode diaktifkan hanya untuk m/z tertentu, yang memungkinkan pemilihan hanya pada massa tunggal per ledakan. Dengan menggunakan teknik ini, seluruh pola ledakan fragmen dapat dianalisis untuk setiap aktivitas, yang sangat meningkatkan sensitivitas sistem. *Time-of-Flight* biasanya digunakan dalam penentuan struktur protein di mana sistem LC-TOF digunakan untuk analisis protein, peptida, dan polinukleotida.

Susunan elemen detektor diode diatur untuk mengambil sampel arus *flight* mencapai detektor pada waktu yang berbeda. Dengan menggunakan teknik ini, seluruh pola ledakan fragmen dapat dianalisis untuk setiap aktivitas, yang sangat meningkatkan sensitivitas sistem. Penjumlahan waktu yang dihasilkan memungkinkan peningkatan 10.000 kali lipat sensitivitas. Susunan-susunan tersebut dibatasi oleh gangguan yang melekat pada susunan dan terbatasnya jumlah elemen susunan yang tersedia untuk melakukan sampling. Susunan 50 x 50 yang memberikan 2.500 poin sampel. Untuk rentang deteksi 0-800 amu memberikan resolusi 0,3 amu. Resolusi *quadrupole* yang khas adalah 0,1 amu atau lebih baik.

Pelipatan tabung menggunakan "cermin" listrik untuk mencerminkan dan mempercepat aliran *flight* fragmen kembali ke *flight tube* untuk menyambar detektor (Gambar 15). Fragmen yang bergerak menuju *flight tube* dan dipisahkan pada massa m/z -nya. Analisis ion molekul dari protein tunggal yang dibedakan dengan ukuran muatannya, z , memungkinkan perhitungan berat molekul protein asli. Muatan sebesar 20 sampai 50 kali lipat pada ion radikal memungkinkan ukuran enzimatik protein (MW = 25 sampai 60 kDa) untuk dipisahkan dari spektrometri massa *Time-of-Flight* dengan rentang pemisahan dari 0-2000 Amu.



Gambar 3.15. Penganalisis massa *Time-Of-Flight*

4. *Fourier transform*

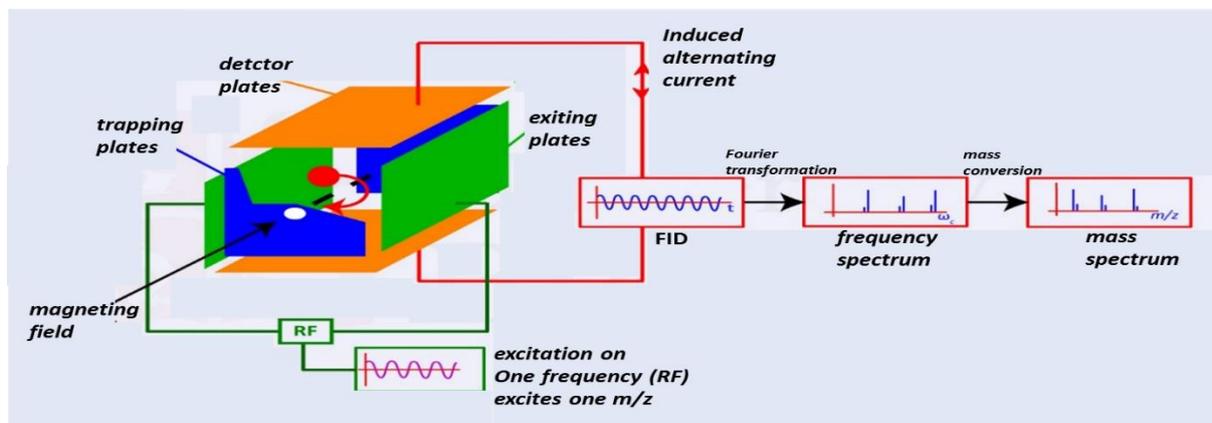
Fourier transform menganalisis ion dengan cara membawa ion yang telah diionisasi menuju ke dalam sel analisis pada medan magnet konstan dari sepasang pelat perangkap. Setiap fragmen akan mengikuti orbit melingkar dengan karakteristik frekuensi siklotron nilai m/z -nya. Untuk mendeteksi keberadaan fragmen, sinyal frekuensi "chirp" diterapkan dari sepasang pelat transmitter perpendikuler sampai pelat penjebak. Ion-ion mengabsorpsi energi dari *chirp* pada frekuensi siklotroniknya dan didorong menuju orbit yang lebih tinggi. Pelat detektor perpendikuler sampai bidang ketiga sel menghitung kompleks sinyal yang mengandung semua frekuensi fragmen yang sesuai m/z -ya.

Penganalisis massa *Fourier Transform* membutuhkan komputer yang dapat mengkonversi sinyal frekuensi menjadi data spektrum dengan cepat. Sistem penganalisis massa *Fourier transform* menghasilkan spektrum massa menggunakan resonansi ion siklotron. Sampel terionisasi dan pelarut dihilangkan oleh *interface* penyemprot ion dan menuju ke dalam sel analisis, yang terjadi pada medan magnet konstan pada sepasang pelat perangkap. Setiap

fragmen akan mengikuti orbit melingkar dengan karakteristik frekuensi siklotron nilai m/z -nya.

Software *Fourier Transform* mengkonversi cuplikan frekuensi ion menjadi spektrum nilai m/z yang ada pada sampel. Seperti detektor susunan spasial, setiap fragmen dianalisa untuk setiap tembakan ionisasi. Instrumen yang paling umum menggunakan spektrometer massa *fourier transform* adalah instrument hibrida yang menggunakan *fourier transform analyser* untuk menghitung massa *daughter ion* dari sel penumbuk (*cell collision*).

Analyser ini dapat mengkombinasi kecepatan penghitungan dan sensitivitas sesuai keinginan. Penghitungan dapat dilakukan dalam satuan milisekeden dan digunakan untuk memonitor reaksi fase gerak yang sangat pendek. Karena fragmen ion tidak dihancurkan dalam sel, beberapa pengukuran dari waktu ke waktu dapat dirata-ratakan untuk menghasilkan pengukuran yang sangat akurat, resolusi tinggi, dan dengan sensitivitas yang baik. Sinyal tersebut cenderung sangat stabil dan tidak bergantung pada optik ion atau variasi detektor. Komputer modern dapat dengan mudah memberikan perhitungan transformasi yang cukup cepat untuk memberikan *real-time* data.



Gambar 3.16. Penganalisis massa *Fourier transform*

KOMBINASI PENGANALISIS MASSA

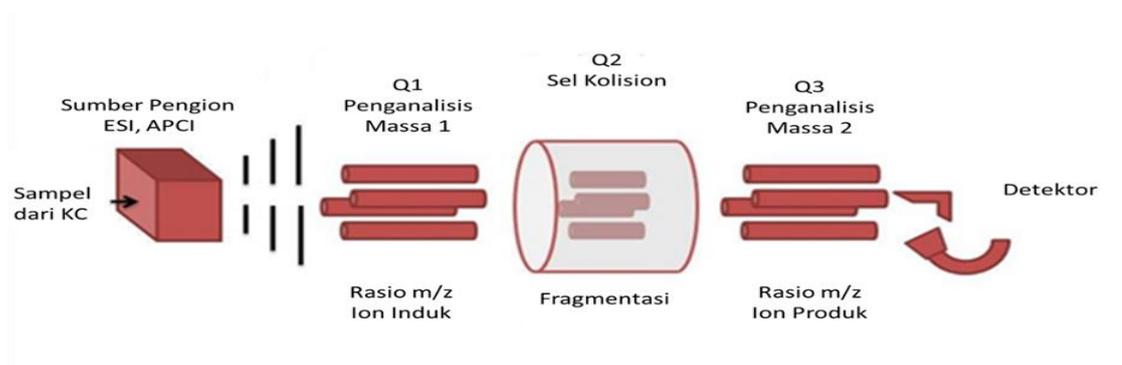
Penganalisis massa dapat di kombinasikan atau di tandem baik terhadap sistim penganalisis massa yang sama atau berbeda. Penganalisis massa tandem biasanya mengkombinasikan dua *analyser* spektrometri massa dengan adanya sel tumbukan (*cell collision*). Pada dasarnya, tandem spektrometer massa dapat dipahami dalam dua cara, yaitu; tandem-*in space* dan tandem-*in time*.

Tandem-*in space* adalah manifestasi dari MS/MS, di mana penganalisis massa selektif digunakan untuk memilih *parent ion* (ion induk/prekursor) untuk proses pemisahan dan penganalisis massa selektif kedua digunakan untuk menganalisis *daughter ion* (ion

produk/pecahan) yang dihasilkan dari disosiasi. Kedua penganalisis massa ini ditempatkan di sisi berlawanan dari tempat ion-disosiasi/*cell collision*, dan dengan demikian terhubung satu sama lain dengan *cell collision*. Spektrometer massa tandem-*in space* bisa juga digunakan untuk melakukan analisis ion produk dan untuk melakukan analisis ion *netral-loss*. Instrumen untuk tandem-*in space* dirancang menggunakan proses selektif untuk memilih ion prekursor yang diberikan pada himpunan koordinat dalam ruang, kemudian mentransfer ion ke koordinat untuk disosiasi ion, dan kemudian mentransfer produk dari yang disosiasi dalam ruang untuk analisis.

Spektrometer massa yang paling umum tandem-*in space* adalah *triple quadrupole* dan *quadrupole-TOF*. Pada *triple quadrupole* merupakan Konfigurasi QqQ, dimana Q menunjukkan penganalisis massa *quadrupole* dan q adalah *cell collision* sebagai sel penumbukan. pada *quadrupole-TOF*, di mana MS1 adalah *quadrupole* dan MS2 adalah Time-of-flight (TOF). Keuntungan dari susunan tandem-*in space* adalah kemampuan untuk mengendalikan tekanan dan jenis gas inert digunakan dalam sel tumbukan. Instrumen ini dapat menggunakan molekul N₂ atau Ne, Ar, Kr, atau atom Xe sebagai gas tumbukan, sehingga memberikan fleksibilitas dalam deposisi energi berdasarkan massa gas tumbukan. sebagai tambahan, tekanan dapat dengan mudah disesuaikan untuk mengontrol jumlah tumbukan selama proses disosiasi (*Collisionally Activated Dissociation/CAD*) pada *cell collision*.

1. *Triple Quadrupole (TQD)*



Gambar 3.17. Penganalisis massa *Triple Quadrupole*

Pada sistem spektrometri massa dengan penganalisis massa *triple quadrupole* mampu menganalisis rasio m/z ion induk (pada Q1) dan menganalisis rasio m/z ion produk (pada Q3), ion induk dapat di analisis setelah mengalami fragmen pada Q2 sebagai *cell collision*. Ion dari penganalisis massa pertama (Q1) sebagai ion induk akan dilanjutkan ke *sel collision* (Q2). Pada Q2 tegangan listrik hanya berasal dari radio frekuensi (RF) dengan energi yang

rendah. *Sel collision* mengandung gas netral pada tekanan 10^{-4} sampai 10^{-2} torr. Ketika gas netral berinteraksi dengan ion terjadi tabrakan, tabrakan akan mentransfer energi internal ke ion, dengan mengkonversi sebagian kecil dari energi kinetik menjadi energi internal. Ion kemudian mengalami reaksi unimolekular untuk membentuk ion produk/fragmen ion. Ion produk meninggalkan *sel collision* menuju penganalisis massa (Q3) untuk dianalisis

Tandem-*in time* adalah bahwa semua langkah analisis; seleksi ion prekursor, disosiasi ion prekursor, dan analisis ion produk berlangsung di posisi dan ruang yang sama, tetapi pada waktu yang berbeda. Tidak seperti tandem-*in space*, di mana ion terus lewat dari satu langkah analisis ke langkah analisis berikutnya, tandem-*in time* hanya berlaku proses tunggal (seleksi, disosiasi, atau analisis) untuk ion dalam interval waktu tertentu. Instrumen yang memungkinkan untuk analisis dengan MS/MS seperti ini adalah *Fourier transform ion resonansi* (Ftms), dan *quadrupole ion trap* (QIT). *Quadrupole Ion Trap* biasanya terbatas pada penggunaan gas He pada tekanan tetap (diperlukan untuk peredam amplitudo osilasi ion sehingga mereka akan tetap berada di masing-masing orbital). Jika instrumen tersebut digunakan, operator tidak dapat menyesuaikan tekanan atau memilih gas tabrakan yang berbeda dalam upaya untuk menyesuaikan tingkat disosiasi selama proses CAD .

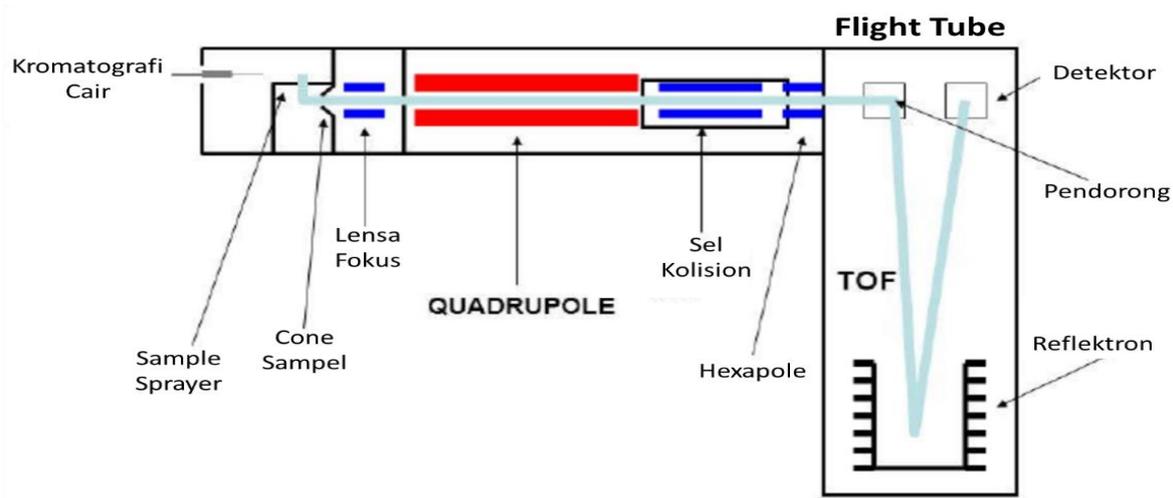
Salah satu perbedaan utama antara tandem-*in time* dan massa tandem-*in space* adalah apa yang disebut *cut off* bermassa rendah yang dianalisis dalam QIT. Ion produk yang memiliki nilai m/z kurang dari $1/3$ dari nilai m/z prekursor tidak efisien disimpan dalam QIT.

2. **Quadrupole-Time of Flight (QToF)**

Quadrupole-Time of Flight (QToF) menganalisis ion dengan penganalisis massa *quadrupole* untuk memperoleh rasio m/z ion induk dan *Time of Flight* untuk memperoleh rasio m/z ion produk. Ion-ion bermuatan hasil ionisasi dalam bentuk *droplet* (tetesan) menuju penganalisis massa pertama (*Quadrupole*) melalui lensa fokus, ion yang stabil dengan rasio m/z tertentu yang dapat melewati celah diantara 4 batang logam tersebut menuju detektor. Pada penganalisis massa *quadrupole* ion yang stabil dianalisis berdasarkan rasio m/z nya dan dikunci sebagai ion induk. Kemudian ion induk diteruskan menuju sel kolision dan menjadi fragmen-fragmen. Fragmen ion melewati lensa focus (hexapole) menuju *flight tube*. Fragmen-fragmen didorong (*Fusher*) menuju reflektorn yang menseleksi rasio m/z ion menuju detektor. *Flight time* dari setiap fragmen tergantung pada rasio m/z -nya. Fragmen yang lebih ringan tiba di detektor lebih dahulu. Untuk mendeteksi fragmen rasio m/z , setiap elemen detektor berarus diode diaktifkan hanya untuk m/z tertentu, yang memungkinkan pemilihan hanya pada massa tunggal. Dengan menggunakan teknik ini, seluruh pola ledakan fragmen dapat dianalisis untuk

setiap aktivitas, yang sangat meningkatkan sensitivitas sistem. Kelebihan TOF yaitu dapat diterapkan untuk semua ion pada waktu yang sama menyebabkan ion akan dipercepat menyusuri tabung penerbangan dimana ion yang lebih ringan tiba pada detektor paling awal sehingga fragmentasi ion ditentukan oleh waktu kedatangan mereka. Analisis massa memiliki kisaran luas dan sangat akurat sehingga TOF banyak menjadi pilihan dalam analisa metabolik. QTOF-MS memungkinkan analisis MS/MS dan menyediakan massa akurat untuk ion induk dan ion produk serta dapat mengidentifikasi massa lebih teliti dibandingkan penganalisa massa lain (Lacorte dan Alba. 2006). Kemampuan penganalisa massa QTOF, yaitu dapat mendeteksi berat molekul sampai dengan 4 desimal dengan menggunakan pendekatan rumus empiris berdasarkan pembacaan berat molekul secara akurat.

Quadrupole Time of Flight (QToF) adalah aplikasi metode spektrometri massa, penentuan berat molekul didasarkan pada rasio massa terhadap muatan (m/z) molekul dan *Flight time* di medan listrik. Kombinasi dengan kromatografi cair memberikan hasil analisa yang akurat dan berguna untuk penelitian terkait analisis protein, peptida, polinukleotida, proteomik dan metabolomik.

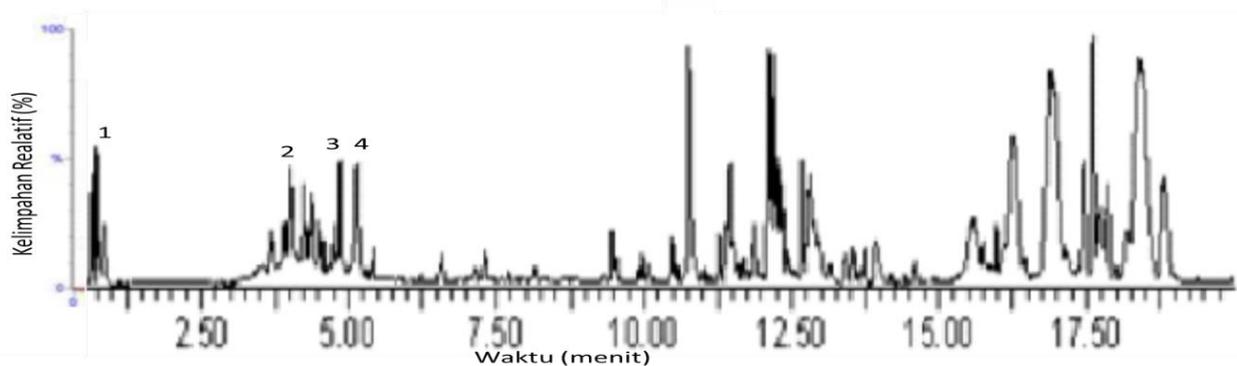


Gambar 3.18. Diagram skema KCKUT-SM/SM Quadrupole-Time of Flight (QToF) (sumber: Manual Part Agilent 6545, 2014. Telah diolah kembali)

Contoh identifikasi komponen kimia ekstrak metanol daun Tabat Barito

Kondisi analisis; ekstrak dilarutkan dalam metanol kemudian disaring dengan saringan milipore yang berukuran 0.45 mikron. Selanjutnya sebanyak 5 μ L filtrat diinjeksikan ke instrument UPLC-QTOF-MS/MS. Spektrometri massa menggunakan sumber ionisasi ESI dan penganalisa massa QTOF, system Xevo G2-S TOF dengan mode ionisasi negatif. Kondisi MS

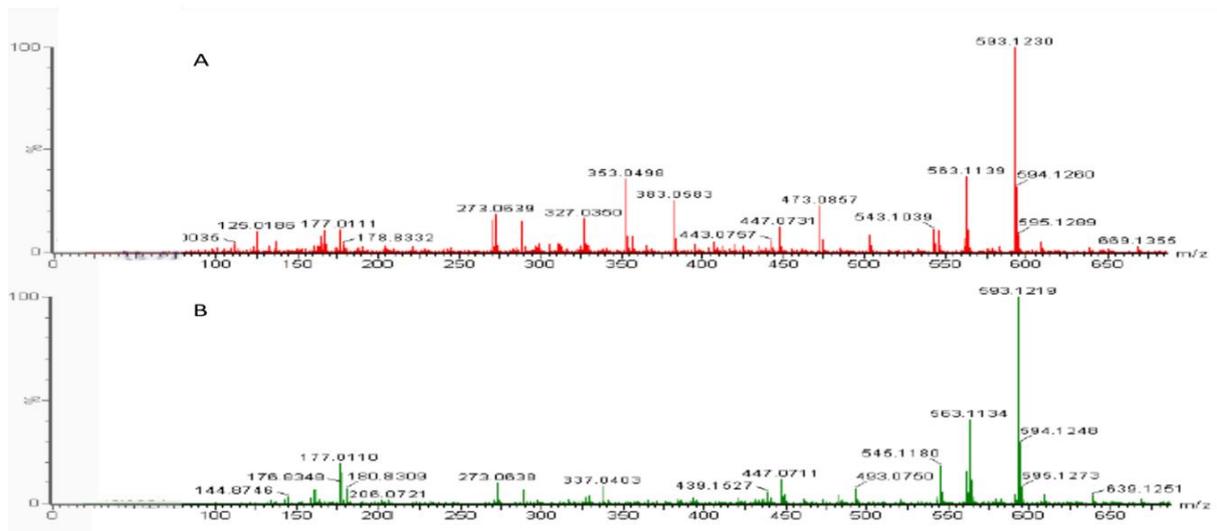
: suhu kapiler 120 °C, gas pengalir 50 L/Jam, sumber tegangan +2.9 kV, modus full scan dari m/z 100-1000 pada suhu 41°C, kolom Acquity UPLC HSS C18 1.8 µm x 2.1x150 mm dengan eluen 5mM ammonium format (A) dan 0.1 % asam format dalam asetonitril (B), laju alir eluen 0.4 mL/menit, sistem elusi isokratik pada menit 0-0.5 dengan perbandingan 95:5, menit ke 0.5-15 elusi linier gradien eluen A dari 95% hingga 5%, menit 15-17 elusi isokratik dengan perbandingan 5:95 dan menit 17-20 elusi linier gradien eluen A dari 5% hingga 95%.



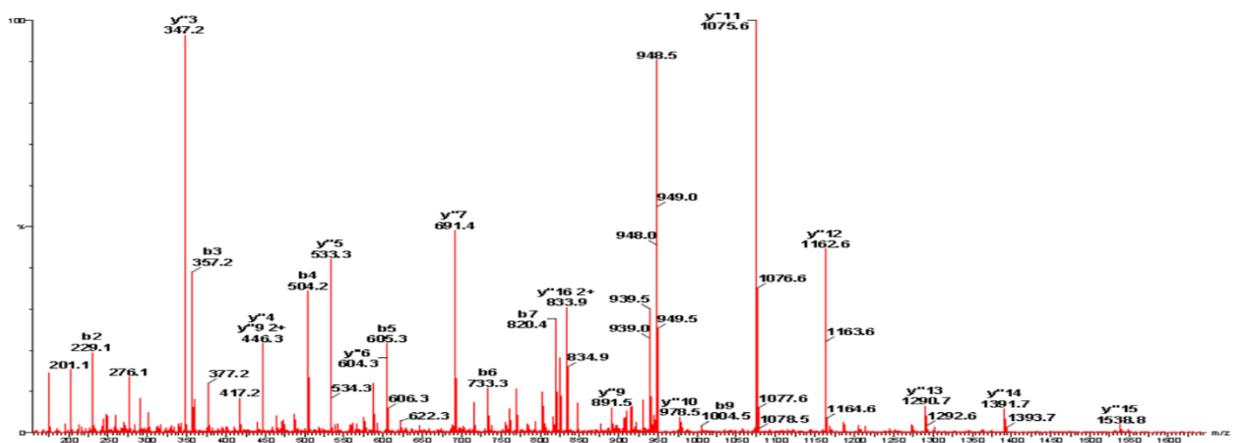
Gambar 3.19. Profil kromatogram ekstrak tabat barito menggunakan *Liquid Chromatography-Quadrupole-Time of Flight* (UPLC-QToF) (Nurmaida, 2016. Telah diolah kembali)

Data yang diperoleh dari masing-masing kromatogram merupakan data yang berukuran sangat besar dengan sistem tiga dimensi yaitu, waktu retensi, massa terhadap muatan (m/z) dan intensitas puncak/kelimpahan relatif. Selanjutnya tiap metabolit dilakukan konfirmasi dengan fragmen yang dihasilkan dari MS. Langkah berikutnya, konfirmasi menggunakan pola fragmen pada MS/MS dan dibandingkan dengan literatur.

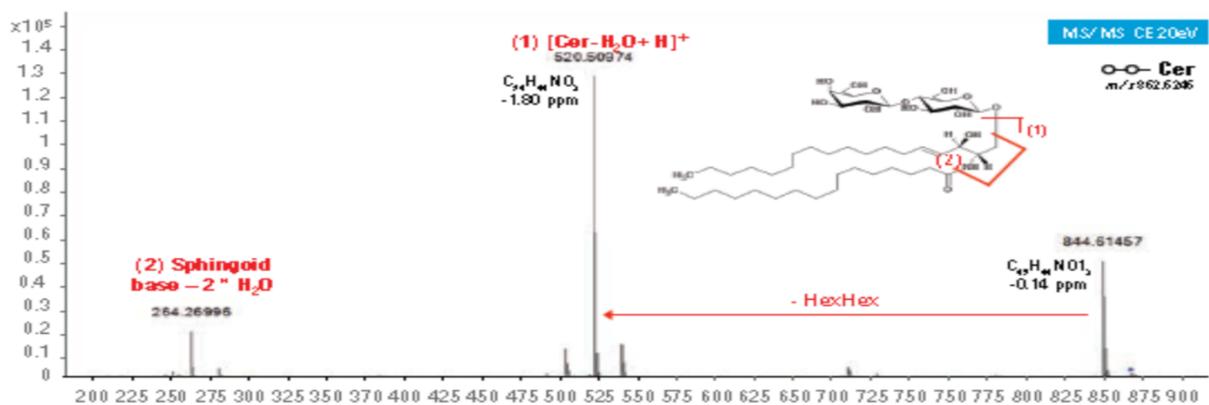
Untuk Puncak no 2 dikarakterisasi [M-H]⁻ pada m/z 593 dengan ion fragmen m/z 503 ([M-H-90]⁻) dan m/z 473 ([MH-120]⁻), menurut literatur menunjukkan teridentifikasinya apigenin-6,8-C-diglukosida (vicenin-2). Selain itu fragmentasi yang khas dari C-glukosilflavon ditunjukkan dengan puncak MS/MS m/z 383 (apigenin + 113) dan m/z 353 (apigenin + 83). Perbandingan intensitas relatif diamati sinyal fragmen dengan m/z 383 lebih tinggi dari m/z 473. Hal ini menandakan adanya aglikon apigenin.



Gambar 3.20. MS/MS dari puncak 2 ekstrak daun tabat barito (A) dan standar vincenin-2 (Han et al. 2008) (B) menggunakan *Liquid Chromatography-Quadrupole-Time of Flight* (UPLC-QToF) (Nurmaida, 2016. Telah diolah kembali)



Gambar 3.21. Spektrogram massa pembentukan ion Peptida (BM 948) menggunakan Quadrupole-Time of Flight (QToF) (Ragnar S, 2004)

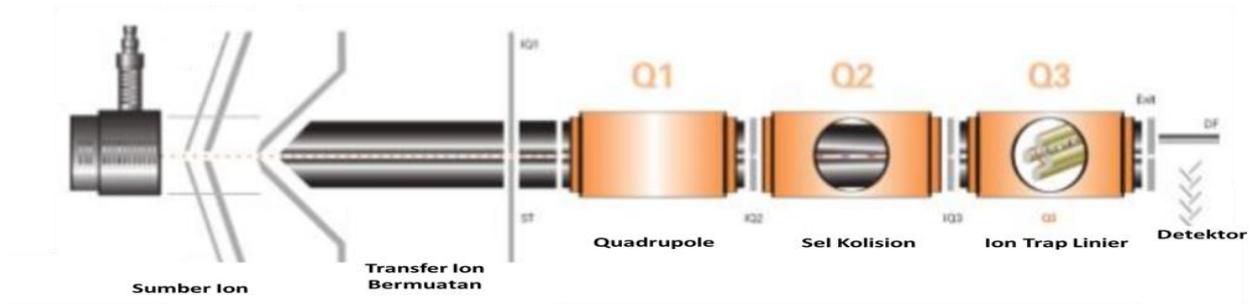


Gambar 3.22. Spektrogram massa pembentukan ion Peptida (BM 862,6) menggunakan Quadrupole-Time of Flight (QToF) (sumber: Manual Part Agilent 6545, 2014.)

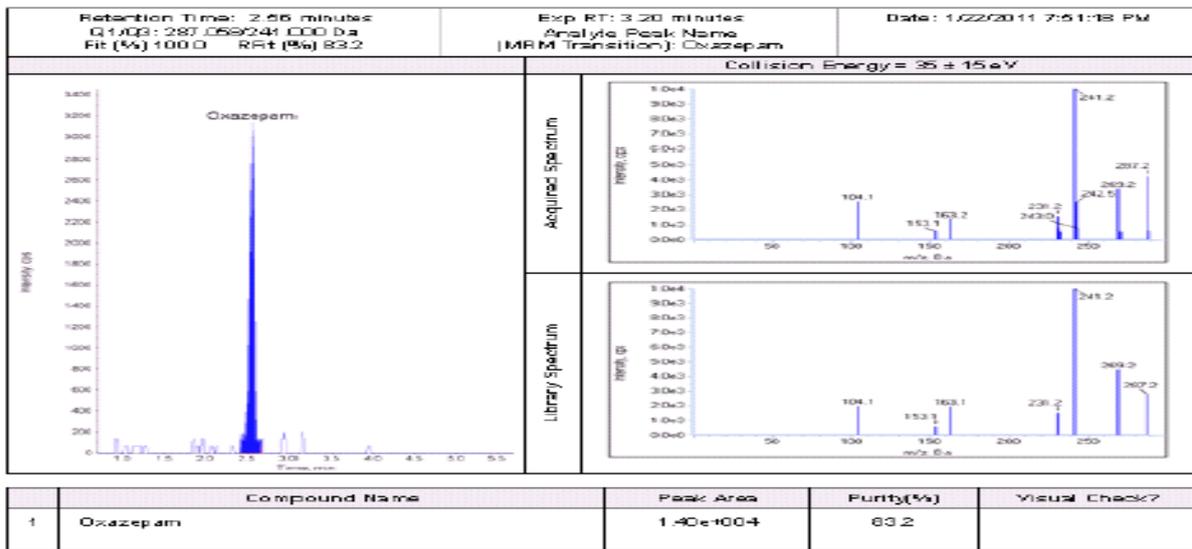
3. **Quadrupole-Ion Trap (QIT)**

Sistim Quadrupole-Ion Trap (**QIT**) adalah spektrometer massa Triple Quadrupole / Linear Ion. Berbeda dengan quadrupole konvensional (TQD), QIT dapat bekerja sebagai penganalisis massa dengan sensitivitas lebih tinggi daripada perangkat ion 3D tradisional. Spektrometer massa QIT adalah spektrometer tandem yang mampu berfungsi sebagai spektrometer massa TQD untuk alur kerja kuantitatif atau sebagai spektrometer massa ion trap linier sangat sensitif untuk alur kerja kualitatif. Kinerja yang sangat baik secara kuantitatif dan kualitatif membuat spektrometer massa QIT menganalisis sampel dalam bidang berikut; lingkungan, penelitian makanan dan minuman, penelitian proteomik, terutama proteomik kuantitatif yang ditargetkan, metabolomik seperti identifikasi metabolit, riset klinis, penemuan dan Litbang obat.

Quadrupole-Ion Trap (**QIT**) menganalisis ion dengan penganalisis massa tandem quadrupole dan ion trap linier. Ion-ion bermuatan hasil ionisasi menuju penganalisis massa pertama quadrupole, ion yang stabil dengan rasio m/z tertentu yang dapat melewati celah diantara 4 batang logam tersebut menuju sel kolision dan menjadi fragmen-fragmen. Fragmen-fragmen ion menuju penganalisis massa kedua ion trap linier. Ion trap linier (perangkap ion) menganalisis ion dengan cara menjebak ion pada ruang yang dapat di deteksi oleh elektroda berbentuk seperti cincin atau batang *quadrupole (Linier ion trap)*. Elektroda dihubungkan dengan tegangan RF dan dc. Tegangan RF diberikan berubah-ubah, apabila RF naik maka orbital ion bermassa berat akan stabil, sedangkan ion yang ringan menjadi tidak stabil dan akan terjadi benturan/tumbukan dengan dinding elektroda, kemudian di keluarkan menuju detektor. Analisis dengan QIT dapat dilakukan dengan mode scan multi-target; Multiple Reaction Monitoring (MRM), Information-Dependent Acquisition (IDA), Enhanced Product Ion (EPI) full-scan MS/MS (MRM-IDA-EPI). Mode MRM untuk menganalisis analit dengan konsentrasi yang rendah, seperti multikomponen dalam matrik biologis. Mode IDA menganalisis secara otomatis. Mode EPI untuk mengkonfirmasi identifikasi analit secara komprehensif dengan *full scan*. Keuntungan QIT menggunakan mode scan multi-target adalah; selektifitas dan sensitifitas yang tinggi, memiliki *library* untuk mengkonfirmasi hasil analisis, mampu menganalisis multikomponen sampel. Sedangkan kelemahannya analisa terbatas pada senyawa target yang terdaftar dalam *library*.



Gambar 3.23. Diagram skema KCKUT-SM/SM Quadrupole-Ion Trap (QIT) (sumber: Manual Part Agilent 6545, 2014. Telah diolah kembali)



Gambar 3.24. Spektrogram massa pembentukan ion oxazepam (BM 287) menggunakan Quadrupole-Ion Trap (QIT). Kiri: Mode MRM, kanan: Full-scan konfirmasi library (sumber: Michael J, 2001)

4. MALDI-TOF

Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization)-Time of Flight (MALDI-ToF) adalah spektrometer massa untuk menentukan berat molekul/molekul relatif dengan resolusi, presisi dan sensitivitas yang tinggi. Proses ionisasi analit dengan MALDI menghasilkan ion analit dengan cepat pada energi yang rendah, penganalisis massa ToF mengukur rasio m/z ion berdasarkan waktu yang dibutuhkan ion mencapai detektor.

Analisis dengan MALDI-ToF; sampel dilarutkan dalam pelarut organik (matriks). Campuran ini menghasilkan deposit larutan padat dari matriks analit. Kemudian Target diiradiasi dengan gelombang laser yang intens dalam jangka waktu singkat pada kondisi vakum, irradiasi ini memicu peningkatan suhu matriks secara cepat oleh akumulasi energi dalam fase terkondensasi melalui eksitasi matriks molekuler. Pemanasan secara cepat tersebut menyebabkan sublimasi

secara lokal pada matrik ion, dan penguapan matriks menjadi fase gas. Terjadi *photoionization* fase gas sehingga terjadi pembentukan ion bermuatan. Ion bermuatan dari fase gas kemudian diakselerasi oleh medan elektrostatis menuju penganalisis massa ToF. Ion bermuatan melewati lensa fokus menuju *flight tube*. Ion didorong (*Fusher*) menuju reflektron yang menyeleksi rasio m/z ion menuju detektor. *Flight time* dari setiap ion tergantung pada rasio m/z -nya. Ion yang lebih ringan tiba di detektor lebih dahulu. Untuk mendeteksi fragmen rasio m/z , setiap elemen detektor berarus diode diaktifkan hanya untuk m/z tertentu, yang memungkinkan pemilihan hanya pada massa tunggal.

Berbeda dengan ESI, mayoritas ion yang dihasilkan oleh MALDI hanya membawa satu muatan tunggal; Jadi penganalisis massa *Time of Flight* (ToF) paling banyak digunakan dengan MALDI, terutama karena rentang massanya yang besar, resolusi tinggi dan prosedur pengukurannya juga ideal untuk ionisasi MALDI. MALDI-TOF MS dapat memberikan analisis cepat biopolimer penting dengan berat molekul sampai 350 kDa dalam sampel biologis. Karena kesederhanaan status muatan molekuler, spektrum MALDI lebih mudah ditafsirkan daripada spektrum ESI.

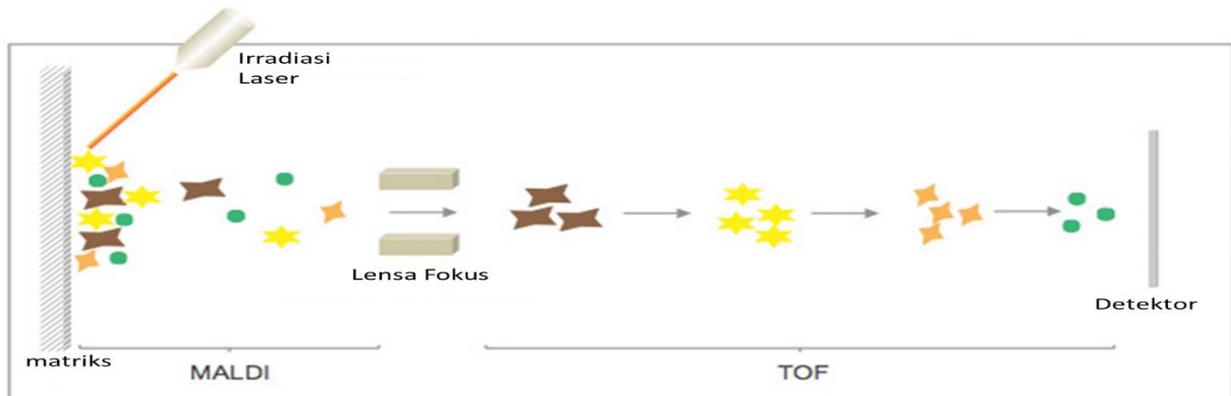
Matrik yang digunakan merupakan senyawa organik atau asam organik lemah turunan asam sinamat dan asam dihidroksibenzoat. Misalnya: asam sinapinat (10Da), menyerap cahaya maksimum dari laser pada panjang gelombang (λ) 337nm.

Sensitivitas maksimal pada analisis jika sampel diencerkan dengan konsentrasi tertentu. Peptida dan protein memberikan spektrum terbaik pada 10 pmol, terutama glikoprotein. Sedangkan untuk Oligonukleotida spektrum yang lebih baik pada 10 – 100 pmol, dan untuk Polimer 100 pmol. Untuk konsentrasi sampel yang tidak diketahui, rangkaian pengenceran mungkin diperlukan untuk memperoleh sensitivitas terbaik.

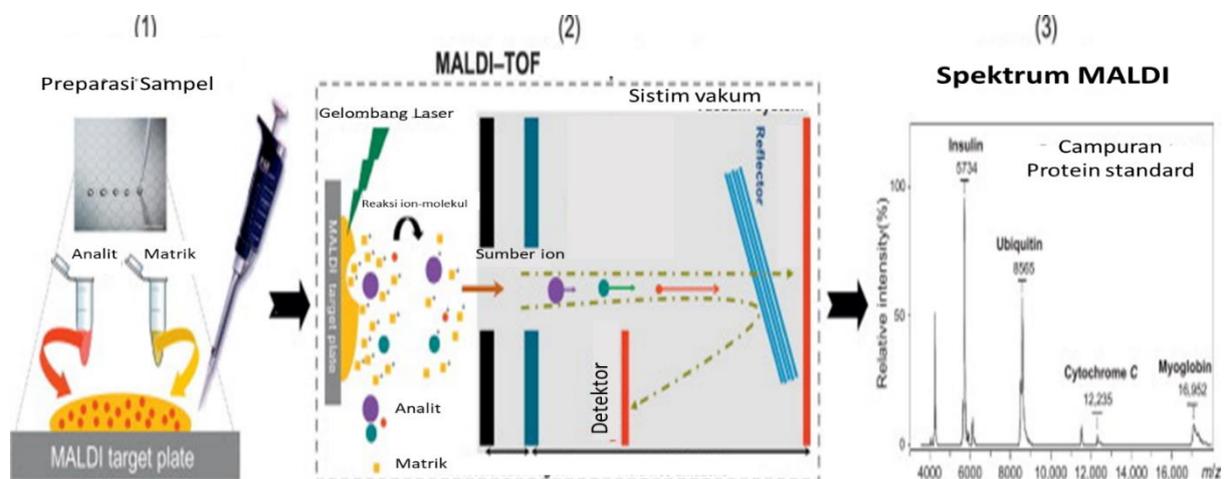
Reflekton merupakan cermin ion untuk memberikan resolusi lebih tinggi, meningkatkan panjang jalur keseluruhan ion, mengoreksi adanya variasi terkecil dalam penyebaran energi ion dari massa yang sama, memiliki medan listrik berbeda sehingga ion dengan rasio m/z terpilih yang akan menembus medan ini, sebelum pembalikan arah ion.

Keuntungan MALDI-ToF; teknik Ionisasi sederhana, untuk senyawa dengan berat molekul besar, dapat dilakukan untuk senyawa yang tidak mudah menguap, sensitivitas pada konsentrasi rendah (pmol), penggunaan matrik yang luas, jangkauan berat molekul senyawa tak terbatas (Makromolekul $M_r > 400.000$ dapat diukur secara akurat, Semua ion terdeteksi sekaligus termasuk ion bermuatan rendah, analisis yang sangat cepat (per 10 detik), resolusi analisis yang tinggi.

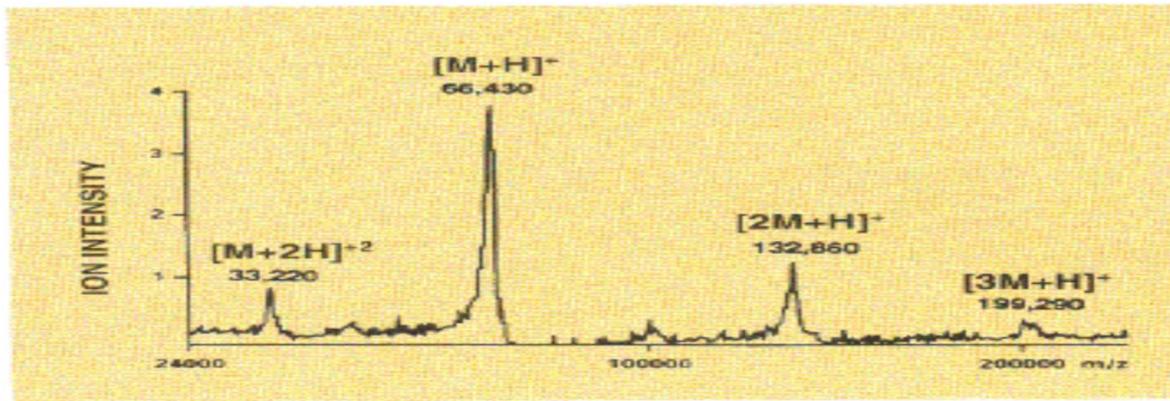
Bidang aplikasi; proteomik (finger print Massa Peptida), lipidomik, metabolomik, biomolekul (Penentuan urutan dan berat molekul), mikrobiologi (identifikasi spesies mikroorganisme seperti bakteri atau jamur)



Gambar 3.25. Diagram skema MALDI-TOF (sumber: Creative proteomic. Telah diolah kembali)



Gambar 3.26. Diagram skema MALDI-TOF (sumber: Yi-ZhuCo et al, 2015. Telah diolah kembali)



Gambar Gambar 3.27. Spektrogram massa bovine serum albumin (BM 1967) menggunakan MALDI-Time of Flight (MALDI-ToF) (sumber: American society for MS)

E. PEMELIHARAAN SPEKTROMETER MASSA

Penganalisis massa pada spectrometer massa harus dioperasikan pada lingkungan bervakum tinggi, hal ini karena bila terjadi benturan dengan molekul udara dapat mengganggu aliran ion dari sumber detektor, yang menyebabkan sinyal menjadi hilang. Ion-ion yang diinduksikan dari *interface* atmosfer harus lewat melalui lubang kecil, bisa juga melalui tirai gas, yang didorong ke dalam Penganalisis massa dengan *repeller* dan lensa fokus. Penganalisis massa dengan tegangan RF/DC mampu memilih ion terpilih ke dalam permukaan detektor. Ion yang terpilih berdasarkan rasio massa terhadap muatannya (m/z) dinyatakan sebagai nilai spectrum m/z berbanding kekuatan sinyal. Nilai total sinyal ini akan dijumlahkan dan berbanding dengan waktu sebagai total ion kromatogram (TIC). Sinyal RF kemudian berlanjut ke tahap selanjutnya untuk memulai analisis ion berikutnya.

1. Pengoperasian Vakum tinggi

Vakum untuk spektrometer massa disusun dalam dua tingkat, pompa depan yang biasanya sebuah pompa vakum dengan rotary bertutup minyak (*oil-sealed rotary*), pompa vakum ini dapat memberikan vakum sebesar 10^{-3} torr, kemudian yang satunya adalah serangkaian difusi minyak atau pompa molekul turbo dengan tekanan 10^{-5} sampai 10^{-7} torr.

Tipe-tipe Pompa Vakum

a. Pompa vakum *rotary-vane*

Piston yang melekat pada poros penggerak berputar dalam ruang kompresi dan ditutup oleh baling-baling berpegas, memindahkan gas dari sisi *inlet* menuju ke saluran pembuang

(*port exhaust*). Keadaan vakumnya hanya dapat mencapai 10^{-3} torr karena tekanan uap minyak penegel. Pompa ini biasanya berkapasitas 50-150 L/menit.

b. Pompa difusi minyak

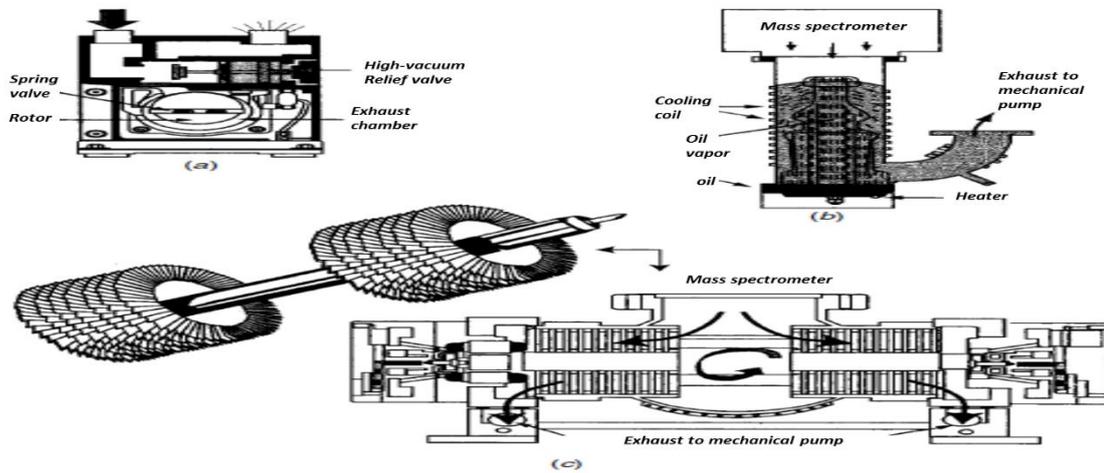
Pompa ini terletak antara *port inlet roughing pump* dan *outlet* vakum spektrometer massa. Vakum seharusnya berada dibawah 10^{-2} torr sebelum pemanas pompa difusi dinyalakan. Minyak panas menaikkan serobong pompa, memancar melalui jalur sirkular pada beberapa tingkat, berkondensasi pada kontak dengan dinding yang dingin, menjebak gas dari spektrometer massa dan menuruni sisinya, menguras gas tertahan, menuju *inlet roughing pump*. Pompa difusi dapat mencapai vakum sebesar 10^{-9} torr ketika didinginkan dengan nitrogen cair. Kapasitasnya mencapai 200-500 L/menit, yang menjadi penting dalam pemompaan sumber menggunakan gas tingkat tinggi untuk ionisasi kimiawi atau dalam menjalankan *interface* kromatografi cair *ion spray*. Beberapa sistem dengan pompa difusi minyak mempunyai katup kupu-kupu yang dalam sekejap menutup ketika kehabisan energi, untuk mencegah kontaminasi penganalisis massa. Meskipun pompa ini memberikan vakum yang baik, namun memerlukan pemeliharaan pada pompa minyak dan sistem pendinginnya. Pada laboratorium modern, pompa ini sebagian besar diganti dengan yang lebih kompak, yaitu pompa turbo.

c. Pompa turbo

Pompa turbo memiliki serangkaian baling-baling pada poros pisau yang berputar pada kecepatan sampai 60000 rpm diantara serangkaian alternatif tempat *stator* bercelah. Udara diambil dengan pisau, diputar melalui celah *stator*, dan kemudian diambil oleh pisah selanjutnya. Hanya udara dalam jumlah kecil dipindahkan oleh setiap putaran poros, tetapi jumlah pisau dan kecepatan tinggi *rotary* memindahkan udara dengan cepat dari *chamber* penganalisis massa menuju saluran pembuang ke dalam *rough pump*. Sebagian besar pompa turbo memiliki dua set baling-baling dan *stator* pada poros tunggal. Pompa turbo digunakan untuk menghilangkan bagian cincin elektroda penganalisis massa perangkat ion. Perangkat ion linear dengan penahan volume besar memerlukan sistem penggantian yang besar tetapi masih dapat menggunakan pompa turbo untuk memperoleh vakum yang terbaik.

Sebelum mematikan pompa turbo, penting untuk merubahnya ke dalam tekanan atmosfer terlebih dahulu. Uap minyak dapat terhisap ke dalam pompa turbo dari *roughing pump* jika ditinggalkan dalam keadaan vakum. Saat mematikan sistem ini, matikan pemanas pompa difusi, biarkan sampai mendingin dibawah 100°C , kemudian matikan pompa turbo. Sistem

pompa yang berbeda-beda ini penting jika menjalankan sumber ionisasi *ion spray*, dimana sumber tersebut akan bertekanan sangat tinggi.



Gambar 3.28. Pompa Vakum Spektrometer Massa: (a) pompa rotari-vane
(b) pompa difusi minyak (c) pompa turbo

2. Pengukuran Vakum

Vakum diukur pada satuan torr atau paskal. Torr yang setara dengan 1 mmHg atau 133,32 paskal, umumnya biasa dipakai di Amerika. Paskal yang setara dengan 7.5×10^{-3} torr (mmHg) umumnya digunakan di Eropa.

Tekanan vakum diukur dengan dua jenis ukuran. Vakum tingkat medium dapat diukur dengan termokonduktivitas, kawat panas terekspose pada garis vakum dan didinginkan dengan kontak dengan molekul. Semakin rendah tingkat kontakannya, semakin rendah penarikan arus dan semakin rendah pula vakumnya. Vakum berkekuatan tinggi dihasilkan dari pompa difusi minyak atau turbo yang membutuhkan penggunaan alat pengukur katoda panas. Aliran elektron dari katoda dihilangkan melalui kontak dengan molekul udara. Arus yang dihasilkan tersebut proporsional dengan konsentrasi molekul udara yang ada.

3. Pemeliharaan Pompa dan Penggantian Minyak

Roughing pump perlu pergantian minyak setiap 6 bulan sekali. Waktu penggantian tersebut dapat diketahui dengan melihat warna minyaknya, ketika menjadi coklat dan keruh, maka harus diganti. Pipa dari *roughing pump* harus diperiksa secara berkala terhadap keretakkannya. Ketebalan pipa dan diameternya menjadi titik kritis untuk kinerja vakum tersebut. Ketebalan pipa tidak boleh diganti dengan ukuran yang lain ketika perlu penggantian darurat.

Teknisi yang terlatih dari produsen harus memberikan pelayanan pompa difusi. Kebanyakan produsen memberikan beberapa tipe untuk pompa turbo, dan harus menjadi bagian dari persetujuan dalam kontrak pembelian. Ketika kinerja pompa mulai menurun, perbaikan harus dilakukan. Pompa-pompa ini beroperasi pada kecepatan yang sangat tinggi dengan toleransi kerusakan yang kecil. Ketika kinerjanya menurun, maka akan *down*. Maka dari itu penting untuk mempunyai program penggantian untuk meyakinkan bahwa sistem LC-MS/MS tidak gagal beroperasi sampai pompa dipasang kembali.

4. Pemeliharaan Perangkat Keras Spektrometer Massa

Dua masalah utama pada pengoperasian spektrometer massa yaitu kebocoran udara dan kontaminasi pelarut atau gangguan pembacaan massa yang kecil. Apapun instrumennya, kita harus membersihkan *interface*, sumber ion, dan penganalisis massa setiap saat. Seberapa seringnya bergantung pada jumlah penggunaannya, sampel yang dianalisa, dan frekuensi tertentu.

a. Diagnosa Masalah

Jika masalah yang terjadi adalah vakum sudah penuh tetapi filament menyala, periksa kebocoran udara dengan memindai m/z dari 0 sampai 50 amu. Lihat peak air, nitrogen, dan oksigen. Jika ada, kemungkinan ada kebocoran sekitar *interface* menuju penutup sumberion. Matikan *port* injeksi pada *interface* dan sambungan dari *interface* ke sumber ion spektrometer massa. Jika pemasangannya sempit, kemungkinan besar *ferrule* butuh diganti. Metode penentuan yang baik ketika membutuhkan pemeliharaan sumber ion adalah memonitor tinggi *peak* senyawa kalibrasi terkecil dari *auto tuning*. Ukur tingginya setelah *tuning* instrument yang baru atau baru dibersihkan. Atur ambang yang diterima, misalnya 10% dari tingkat pembersihan. Saat nilai target di bawah standar minimum, itu waktunya untuk membersihkan sistem. *Peak* kalibrasi dipilih karena *peak* yang lebih besar, lebih mudah untuk dipengaruhi oleh permukaan penganalisis massa yang kotor atau permukaan sumber ion yang berkarat.

b. Sistem Shutdown

Ketika sumber ion dibersihkan, penganalisis massa harus dilepas, energi dimatikan, dan pemanas pompa vakum harus didinginkan. Kemudian, pindahkan kolom dan *interface* dari spektrometer massa. Sumber ion yang terpasang dipindahkan dari penganalisis massa dan dilepaskan. Permukaan kontak filamen dan ion harus dibersihkan dan dikeringkan. Sumber ion dipasang kembali dan dimasukkan ke dalam penganalisis massa. *Interface* dan kolom dihubungkan kembali, penganalisis massa kembali dikosongkan, dan semua temperatur

kembali dipanaskan. Akhirnya, auto tuning dijalankan untuk menetapkan tinggi *peak* target kembali pada ambang kinerjanya.

Pembukaan dan pematian energi sekuens akan bervariasi antar instrumen. Penting untuk mengikuti prosedur panduan instrument. Kecepatan pompa turbo molekular perlu dimatikan dan dikosongkan melalui *roughing pump*. Pompa difusi minyak harus didinginkan sampai di bawah 100°C sebelum dibuka atau jika tidak akan mengalirkan minyak kembali ke penganalisis massa, mengkontaminasi permukaan *quadrupole*. Ketika didinginkan, pastikan temperature pompa difusi sudah cukup dingin untuk dimatikan. Saat *interface* dipindahkan, penting untuk melindungi permukaannya sampai dipasangkan kembali ke penganalisis massa.

c. Pembersihan Sumber Ion dan Penganalisis Massa

Sumber spektrometer massa pada LC-MS/MS mempunyai masalah yang lebih sedikit dengan kontaminasi bila dibandingkan dengan GC/MS, dimana kontaminasi tersebut disebabkan oleh pematangan filament dan pembakaran uap panas dari oven GC. Tapi sumber ion LC-MS/MS masih harus dibersihkan secara berkala, khususnya jika lensa *repeller* digunakan untuk mendorong sampel terionisasi dari *interface* atau jika filament digunakan untuk mengionisasi fragmentasi, dan prosedurnya kurang lebih sama. Penganalisis massa *quadrupole* LC-MS/MS lebih rentan terhadap kontaminasi oleh akumulasi sampel terkondensasi, khususnya jika *interface* ion *spray* dioperasikan pada laju alir HPLC yang tinggi. Keadaan ini akan meningkatkan kebutuhan pencucian penganalisis massa.

Untuk membersihkan sumber ion, pertama harus dilepaskan dahulu dalam area yang bersih. Hati-hati dengan bagian-bagian kecil agar tidak hilang. Pindahkan kabel kontrol *interface* dan koneksi elektrik ke filamen, *repeller*, dan berbagai lensa fokus. Buka dan pindahkan baut yang terpasang pada filamen dan *repeller*. Pada spektrometer massa **Hewlett-Packard 5972**, semua sumber ion yang terpasang sampai lensa fokus dapat dilepaskan sebagai satu bagian yang dapat dibersihkan. Bagian yang butuh dibersihkan adalah yang terkontak dengan arus ion; *repeller*, bagian dalam sumber ion, lensa fokus, dan permukaan lensa kontak masuk. Bagian sumber ion menunjukkan pembakaran setelah bersentuhan dengan filamen. Ini butuh dipindahkan dan lubang yang membawa ke bagian sumber ion membutuhkan pembersihan dengan pembesaran dengan bor yang baik. Beberapa teknik untuk pembersihan permukaan sumber ion adalah; teknik abrasif, kimiawi, sonik, dan *electroplating*. Teknik abrasif yang menggunakan serbuk halus ini efektif, memerlukan perlengkapan minimum, dan aman untuk permukaan sumber ion. Hewlett-Packard merekomendasikan pembersihan dengan serbuk aluminium oksida dan metanol untuk membuat pasta pembersih yang digunakan dengan Q-tips dalam penggosokan permukaan tersebut. Mereka juga menyediakan kertas

aluminium oksida yang dapat digunakan dalam pembersihan bagian dalam permukaan, dan membor sedikit dan pegangan untuk pelebaran lubang masuk. Para penyedia jasa perbaikan instrument menggunakan teknik pasir bertekanan tinggi dan percikan air untuk membersihkannya. Penggunaan batu abrasif dan roda karet dapat menyebabkan goresan pada permukaan yang dapat merubah daerah elektrostatik lensa. Ketika ini terjadi, elemen tersebut tidak dapat bekerja sebaik sebelumnya. Bagian yang terlalu kecil untuk alat dremel dapat ditempatkan pada gelas beker kecil, dan yang lebih besar ditempatkan di beker besar. Isi beker tersebut dengan air dan tambahkan sedikit tetes Alquinox (semacam sabun). Tempatkan beker dalam sonikator, dan jalankan sekitar 1 jam, kemudian angkat beker tersebut dan buang airnya hati-hati. Isi kembali beker dengan metanol untuk menghilangkan sisa air. Sonikasi kembali selama 5 menit. Angkat beker kemudian buang cairan metanolnya.

Prosedur pencucian lain disebut sonikasi dalam serangkaian pelarut. Setelah semua bagian permukaan dengan Q-tips dilap, direkomendasikan untuk disonikasi dalam beker selama 5 menit masing-masing dua kali dalam pelarut klorin seperti metilen klorida, kemudian aseton, dan terakhir metanol. Kemudian dikeringkan, tempatkan dalam beker, dan keringkan dalam oven pada suhu 100°C selama 15 menit. Hati-hati jangan membersihkan permukaan vespal secara abrasif, atau pelarut akan masuk ke permukaan, yang menyebabkan permukaan mudah rusak dan pelarut menyebabkannya mengembang, membuat pemasangan menjadi sulit. Biasanya mudah dikenali jika terjadi seperti itu akan membuatnya berwarna dan terlihat seperti plastik. Jika ragu, maka jangan membersihkan permukaan. Kedua jenis pembakaran berasal dari tempat yang sama, oksidasi bersuhu tinggi nitrogen yang mengandung senyawa organik. Ionisasi bertekanan atmosfer menghasilkan ion dingin yang relatif tidak menggunakan tabung pemanas untuk menghilangkan pelarut dan bahan volatile. Umumnya, filament tidak dinyalakan dan tidak menambah masalah pembakaran. Selanjutnya, sebar bagian atas kertas *lintless* dan periksa kebersihannya. Pada tahap ini harus memakai sarung tangan katun untuk mencegah terkena minyak dari jari-jari tangan. Jika sumber tersebut memiliki *spacer*, periksa keretakannya atau kepecahan. Ganti jika diperlukan.

Masalah lain yang mungkin terjadi pada *quadrupole* sehingga dapat mempengaruhi pengoperasiannya adalah akumulasi senyawa organik pada batang *quadrupole*. Ion yang tidak tahan dalam perjalanan melalui *quadrupole* berbenturan dengan batangnya, mengambil elektron, dan menjadi molekul netral. Jika itu adalah senyawa volatile kecil, akan tersapu dari batang oleh sistem vakum dan berakhir sebagai kontaminasi minyak dalam pompa vakum. Namun, ada akumulasi besar yang lambat, senyawa organik non volatile pada batang *quadrupole*. Ini harus dibersihkan secara berkala karena akan merubah daerah elektromagnetik

dan akhirnya akan mematikan penganalisis massa. untuk melepaskan batang dari *quadrupole* untuk dibersihkan, sebelumnya sistem harus dibuka dan sumber ion dilepaskan. *Spacer* antara sumber ion dan *quadrupole* dilepaskan, sambungan elektrik ke batang dilepaskan, dan rangkaian batang dilepas dari sumber ion. Batang-batang tersebut pada sebagian besar sistem dipasang sejajar hiperbolik dengan dua *Spacer* yang harus dilepaskan. Tidak akan ada yang dapat mematikan spektrometer massa lebih cepat daripada mengganggu kesejajaran batang. Minimalnya yang harus dilakukan adalah memperbaikinya dan mensejajarkannya kembali. Hal ini memakan waktu dan mahal dan tidak selalu berhasil.

Bagian empat batang *Quadrupole* yang diklem dengan *spacer* (kerah keramik) dibersihkan dengan menggesernya dengan hati-hati ke silinder ukur dan direndam oleh pelarut. Jangan sampai memecahkan batang ketika ditempatkan dalam silinder. *Quadrupole* terdahulu mempunyai rangkaian batang yang sangat besar dan dibersihkan dengan mengelap dengan handuk kertas *lintless*. Biasanya dicuci dahulu dengan pelarut nonpolar seperti heksan, kemudian dengan metilen klorida, dan terakhir dengan aseton kering. *Quadrupole* modern dapat diangin-anginkan, kemudian dikeringkan dalam desikator jika rangkaian batang cukup kecil untuk dimasukkan. Pemanasan dalam oven pada 100°C dapat menyebabkan batang bengkok karena perbedaan pemuai *spacer* dan batang, dan seharusnya dihindari. Bersihkan rangkaian besar batang dengan mengelap dan angin-anginkan.

d. Penggantian Detektor

Detector horn multiplier elektron mempunyai waktu pemakaian yang terbatas dan harus diganti ketika mulai menimbulkan kebisingan. Jalankan *repeller* pada nilai maksimal, kemudian lihat tegangan multiplier elektron (EM) untuk memilih kalibrasi kecil *peak* diatas nilai standar. Ketika tegangan EM melebihi 3500 V menandakan waktunya untuk mengganti detektor.

e. Sistem Reassembly dan Startup

Pemasangan kembali bagian sumber ion, termasuk insulator, di sekitar lensa fokus dan ion masuk. Masukkan bagian sumber ion ke dalam penganalisis setelah dipasang *repeller* dan filamen. Pastikan *spacer* antara sumber ion dan *quadrupole* tidak terikat. Sambungkan *repeller* dan filamen. Ketika sumber dipasang, harus dilakukan pengecekan listrik secara kontinu. Setelah ini, penganalisis massa siap dipasang kembali ke spektrometer massa.

Ketika *interface* dimasukkan, sambungkan listrik ke sistem kontrol LC-MS/MS. Umumnya, *interface* harus digeser agar cocok dengan *inlet* spektrometer massa. Kencangkan dan cocokkan, nyalakan pompa vakum, tetapkan pengoperasian vakum, dan jalankan pengecekan kebocoran udara dengan melihat *peak* udara dan air dengan pemindaian antara 0-59 amu.

Ganti wadah tempat penahanan vakum. Nyalakan *roughing pump* dan mulai pengosongan. Atur pemanas *interface* sesuai suhu operasi. Ketika angka menunjukkan 10^{-3} torr, nyalakan pompa turbo atau pendifusi minyak. Untuk pompa difusi, nyalakan pemanas dan sesuaikan temperaturnya. Pompa sampai mencapai nilai vakum normal yang tinggi, yang akan memakan waktu sekitar 2-4 jam pada Hewlett-Packard 5972 dengan pompa turbo, tapi akan bervariasi pada sistem lain.

Jika terjadi masalah dalam penetapan vakum *rough*, tekan bagian tutup penahan. Kondisi ini yang umumnya banyak terjadi. Jika masih terdapat masalah, hentikan vakum, periksa dan bersihkan *gasket* di sekitar bagian dalam penutup. Jika perlu, *gasket* dapat diganti.

Ketika vakum dalam keadaan penuh dan pengecekan kebocoran udara pada pemindaian di bawah 50 amu sudah dilakukan, harus diperiksa efektifitas prosedur pembersihan. Jalankan kembali prosedur *auto tuning* dan periksa tinggi *peak* kalibrasi target.

f. Sistem *Electrical Grounding*

Masalah *grounding* sistem listrik seharusnya sudah dipecahkan oleh produsen sebelum dan selama instalasi sistem dan seharusnya tidak berubah sampai sistem tersebut berjalan. Ketika dilakukan penggantian software pengendali dan *interface* dan menggantinya menjadi komputer modern, masalah *grounding* pun dapat terjadi.

Dalam beberapa kasus, terdapat masalah pada *peak* kalibrasi yang gagal terstabilkan. *Peak-peak* tersebut meloncat-loncat dari satu sisi ke sisi yang lain diluar yang diinginkan. Masalah akan hilang hanya jika kerangka spektrometer massa dan *interface* pengendali dihubungkan dengan pengikat *grounding* dan semua kabel energi listrik dan sistem komputer digabungkan melalui protektro gelombang (*surge protector*). Masalah yang umum tampaknya terjadi pada musim dingin, ketika laboratorium umumnya kering, yang diduga pelepasan listrik statis terlibat, karena terdapat beberapa masalah dengan tipe sistem analisa lain selama kekeringan musim dingin.

Masalah yang sama terdapat pada sistem yang dikejutkan dengan sambaran petir. Sistem ini mempunyai *interface* dan sistem komputer yang asli. Masalah kalibrasinya sama persis pada sistem yang didemonstrasikan dan telah diselesaikan dengan *grounding* ke spektrometer massa. Ketika ini terjadi, sistem harus dikalibrasi secara manual, tetapi tidak akan pernah menyelesaikan prosedur *auto tuning* yang cukup untuk studi analisa.

BAB 4

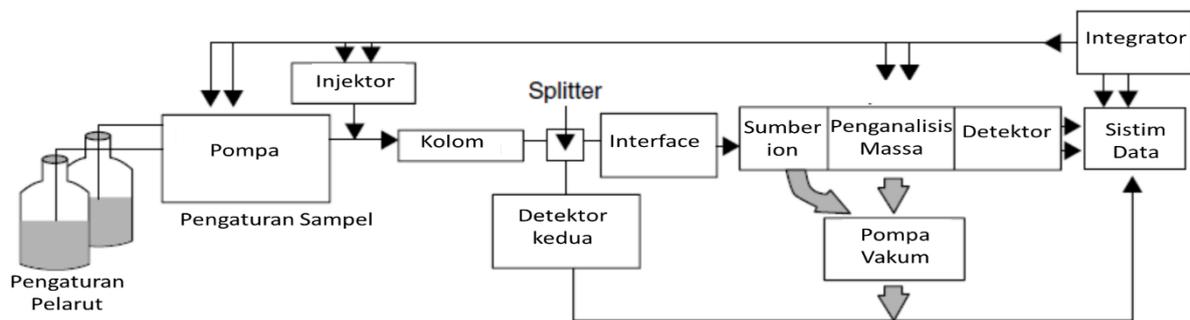
KROMATOGRAFI CAIR KINERJA ULTRA TINGGI TANDEM-SPEKTROMETER MASSA

Liquid chromatography-tandem mass spectrometry (LC-MS/MS) atau Kromatografi cair kinerja ultra tinggi-tandem spektrometri massa (KCKUT-SM/SM) adalah teknik analisis kombinasi dari kromatografi cair sebagai pemisah komponen-komponen analit dalam sampel, dengan spektrometri massa sebagai detektor. Merupakan teknik analisis kualitatif dan kuantitatif yang efektif dengan berbagai aplikasi, seperti aplikasi klinis, termasuk pemantauan terapi obat (TDM), toksikologi, endokrinologi, pediatri, mikrobiologi, dan proteomik.

Prinsip Tandem Spektrometri Massa didasarkan pada penggunaan dua spektrometer massa bersama-sama untuk menganalisis campuran sampel. Metode ini menggunakan dua penganalisis massa yang disusun secara berurutan dengan sel kolision (*collision cell*) di antara keduanya. Penganalisis massa digunakan untuk memilih rasio massa terhadap muatan (m/z) tertentu. Penganalisis massa pertama menganalisa rasio m/z dari ion induk, kemudian pada sel kolision ion induk bertabrakan dengan molekul gas dan terfragmentasi menjadi ion yang lebih kecil dan diperoleh rasio m/z pada penganalisa masa kedua sebagai ion produk.

Keuntungan KCKUT-SM/SM tidak lepas dari keunggulan tandem spektrometri massa yang memiliki selektivitas yang tinggi karena mampu mengenali dua sifat fisik analit yang dianalisa, yaitu rasio m/z dari ion induk dan ion produk. Penggabungan dengan kromatografi cair mampu mengidentifikasi analit dengan tepat berdasarkan waktu retensi sehingga dapat meningkatkan spesifitas. Sensitivitas dari tandem spektrometri massa menunjukkan fleksibilitas dalam mengembangkan analisa senyawa baru atau biomarker, karena mampu menghasilkan batas deteksi yang lebih rendah dibandingkan metode lain. Manfaat LC-MS/MS lainnya adalah kemampuan untuk melakukan analisis multikomponen secara simultan; mengidentifikasi dan mengukur beberapa analitik yang dianalisa secara bersamaan. Kemampuan menganalisa multikomponen dapat menurunkan biaya terutama dalam proses preparasi sampel dalam matriks biologis. Penyiapan sampel dapat disederhanakan dengan metode ekstraksi cair-cair atau pengendapan protein, dibandingkan dengan metode preparasi sampel yang memakan waktu dan mahal seperti ekstraksi fase padat atau derivatisasi. Derivatisasi atau modifikasi kimia senyawa polar pada awalnya diperlukan dalam metode lain seperti kromatografi gas (GC), karena senyawa ini harus cukup mudah menguap agar bisa

dianalisis. Namun, proses derivatisasi menambahkan waktu persiapan sampel, tenaga, dan biaya.



Gambar 4.1. Diagram skema Kromatografi cair kinerja ultra tinggi-tandem spektrometri massa (sumber: Marvin, 2005. Telah diolah kembali)

Kromatografi Cair

Instrumen kromatografi cair ultra tinggi (KCKUT) sama dengan instrumen pada Kromatografi cair kinerja tinggi (KCKT), terdiri atas pompa, injektor, kolom, detektor, komputer untuk analisis dan mengolah sinyal detektor, namun pada KCKUT terdapat *solvent reservoir system* yang berfungsi menyimpan pelarut selama proses analisis.

Solvent Manager

Solvent manager terdiri dari wadah fase gerak dan pompa fase gerak. Wadah fase gerak harus bersih dan inert. *Reservoir* ini dilengkapi dengan sistem penghilangan gas dan penyaring khusus untuk mengisolasi fase gerak dari pengaruh lingkungan. Pompa berfungsi untuk mengalirkan fase gerak dari *reservoir* secara konstan dan berkelanjutan ke dalam sistem. Pompa harus mampu menghasilkan tekanan 500 sampai 15000 psi dan menjamin penghantaran fase gerak berlangsung secara tepat, reproduibel, konstan dan bebas dari gangguan. Pompa tekanan tetap adalah jenis pompa yang paling umum digunakan karena harganya yang relatif tidak mahal dan dapat bekerja pada berbagai laju alir. Pompa ini terdiri dari kepala pompa (terdapat piston dan *seal*), badan pompa, Katup *check-valve* yang dilengkapi *inlet* dan *outlet* untuk memungkinkan fase gerak masuk dan keluar ruang pompa dan *cam-drive*.

Sample Manager

Sample manager terdiri dari tempat meletakkan vial sampel dan jarum injektor yang berfungsi untuk menyuntikkan sampel ke dalam kolom. Suhu di dalam *sample manager* dapat diatur sesuai kondisi yang diinginkan.

Injektor berfungsi memasukkan cuplikan ke dalam kolom, injektor dilakukan secara otomatis menggunakan *autosampler*. Injektor loop-katup adalah jenis yang paling umum digunakan. Sampel disuntikkan ke loop setidaknya lebihkan 20% tetapi dijaga tidak lebih dari 75% dari volume loop. Selanjutnya, injektor diaktifkan ke posisi inject.

Autoinjektor sampel umumnya menggunakan jenis susunan loop dan katup ini, dengan sistem menarik sampel ke dalam loop bukan mendorongnya. Autoinjektor menggunakan berbagai skema pencucian untuk menghindari kontaminasi dari sampel yang terbawa ketika bergerak dari vial ke vial untuk inject berikutnya.

Kolom

Kolom berfungsi untuk memisahkan masing-masing komponen di dalam senyawa yang dianalisis. Untuk menahan tekanan tinggi, kolom dibuat dari bahan yang kokoh seperti *stainless steel* atau campuran logam dengan gelas. Penghubung atau sambungan harus dirancang tanpa ruang kosong. Isi kolom harus homogen dan stabil secara mekanik. Diameter partikel pengisi kolom pada KCKUT berkisar pada ukuran 2,0 μm dan tekanan yang dihasilkan mencapai 15.000 psi, dengan panjang kolom umumnya berkisar antara 5-15 cm. Diameter ukuran kolom yang kecil dan tekanan yang mencapai 15.000 psi menyebabkan efisiensi pemisahan sampel pada kolom menjadi lebih baik dan meningkatkan sensitivitas. Semakin kecil ukuran partikel pada kolom, semakin pendek jalan difusi pada analit sehingga waktu yang diperlukan untuk analisis pada KCKUT lebih singkat. Fase diam pada kolom yang digunakan untuk KCKUT sudah dikembangkan dengan menjembatani matriks silika dengan gugus etena yang dikenal juga *bridged ethylene hybrid* (BEH), hal ini menghasilkan pemisahan yang lebih baik dan stabil secara mekanis. Efisiensi suatu kolom harus dinilai berdasarkan jumlah plat teoritis (N) dan HETP-nya untuk mengetahui kemampuan kolom. Pemilihan kolom dan fase gerak yang benar untuk pemisahan akan menghasilkan pemisahan yang diinginkan.

Ukuran partikel kolom BEH berkisar 2,0 μm dengan ukuran pori 130 – 300 Å menjadi salah satu faktor kunci teknologi KCKUT pada kromatografi fase terbalik dan hidrofilik dalam menganalisis molekul kecil hingga besar. Karena stabilitas kimiawi intrinsik dari teknologi partikel hibrida, rentang pH yang digunakan lebih luas, yaitu pada rentang pH 1-12, dan temperatur kolom dapat digunakan pada rentang 20-90 °C. Sehingga memungkinkan teknologi pemisahan yang serbaguna dan kuat untuk pengembangan metode.

Beberapa kolom pada KCKUT yang menggunakan teknologi BEH diantaranya; kolom C₁₈ dan C₈ BEH, merupakan kolom pemisahan kinerja tinggi serbaguna yang cocok untuk beragam analit. Kolom ini dapat digunakan pada rentang pH 1-12, sehingga dapat menggunakan kekuatan pH untuk mempengaruhi waktu retensi, selektivitas, dan sensitivitas

senyawa terionisasi dengan stabilitas rendah. Kolom HILIC (*Hydrophilic Interaction Chromatography*) BEH, fase diam ini memanfaatkan partikel BEH yang tak terikat untuk meningkatkan retensi spesies yang sangat polar serta menyediakan mode pemisahan ortogonal untuk campuran senyawa polar dan terionisasi. Kolom ini dioptimalkan dan diuji untuk menghasilkan pemisahan yang efisien, hal ini dapat mengatasi stabilitas kimia yang menjadi kelemahan utama fase diam HILIC. Kisaran pH yang luas (pH 1-8) juga mengatasi ketidakstabilan kimia ini dan menghasilkan umur kolom yang panjang. Kolom fenil BEH, fase diam ini menggabungkan ligan fenil-heksil yang terikat secara trifungsional untuk menyediakan stabilitas sehingga reproduktifitas analisis lebih baik. Kolom dirancang untuk memberikan selektivitas komplementer pada kolom alkil berantai lurus, terutama untuk analit yang mengandung cincin aromatik. Kolom Amida BEH, menggunakan fase amida yang stabil secara kimia, memungkinkan dimensi baru dalam stabilitas dan fleksibilitas untuk pemisahan HILIC. Dirancang untuk mempertahankan analit polar dan metabolit yang terlalu polar untuk dipertahankan dengan kromatografi fase terbalik. Kolom Amida BEH memfasilitasi penggunaan berbagai fase gerak pada pH 2-11 untuk memfasilitasi retensi kutub analit yang mencakup berbagai macam polaritas, kesatuan struktural dan pKa. Selain peningkatan retensi senyawa polar, kolom ini memberikan respon spektrometri massa yang meningkat, kompatibilitas langsung dengan persiapan sampel eluat (pengendapan protein, ekstraksi cair-cair dan ekstraksi fase padat) serta selektivitas ortogonal dibandingkan dengan bahan fase terbalik, menjadikan HILIC sebagai teknik pemisahan alternatif yang menarik.

Spektrometri Massa

Senyawa yang telah terpisahkan menjadi *peak* kromatografi yang berbeda, diteruskan ke spektrometri massa untuk dianalisis. Hal ini mencakup segala sesuatu yang keluar dari kolom yaitu; senyawa yang telah terpisah, eluen, dan reagen yang volatil. Komponen dari spektrometri massa adalah *ion source* (sumber ion), *mass analyzer* (penganalisis massa) dan detektor.

***Ion Source* (Sumber Pengion)**

Ada berbagai macam teknik ionisasi yang digunakan pada spektrometri massa. Hal yang harus dipertimbangkan dalam pemilihan teknik ionisasi antara lain energi internal yang dipindahkan pada saat proses ionisasi dan sifat fisikokimia dari analit yang dapat diionisasi. Metode ionisasi yang berkembang antara lain; *electrospray ionization* (ESI), *atmospheric pressure chemical ionization* (APCI), *Atmospheric pressure photo-ionization* (APPI), dan *matrix-assisted laser desorption/ionization* (MALDI).

Electrospray ionization dihasilkan dengan menerapkan medan listrik kuat dalam tekanan atmosfer pada cairan yang melalui tabung kapiler dengan aliran yang lemah (1-10 $\mu\text{l min}^{-1}$). Medan listrik diperoleh dengan menerapkan beda potensial sebesar 3-6 kV antara tabung kapiler dengan *counter electrode* yang dipisahkan dengan jarak 0,3-2 cm sehingga menghasilkan medan listrik dengan order 10^6 V/m. Medan ini memicu akumulasi muatan pada permukaan cairan di ujung pipa kapiler dan pecah membentuk droplet (butiran halus) dengan muatan tinggi. Kemudian butiran halus ini oleh gas inert yang telah dipanaskan dihilangkan molekul pelarut yang tertinggal, sehingga meningkatkan kerapatan muatan pada partikel yang mengakibatkan peningkatan tegangan permukaan, butiran terpecah kembali menjadi lebih kecil (analit ion dengan muatan), kemudian analit ditransfer melalui lubang kapiler menuju penganalisis massa. *Electrospray* mempunyai ciri yang khas yaitu mampu menghasilkan ion muatan ganda dari molekul besar, yang dapat berguna untuk meningkatkan sensitivitas detektor. Batas deteksi yang diperoleh mencapai rentang attomole (10^{-15} mol).

Atmospheric pressure chemical ionization (APCI) adalah teknik ionisasi yang menggunakan reaksi fase gas ion-molekul pada tekanan atmosfer. Secara umum digunakan untuk senyawa polar dan relatif non polar, dengan berat molekular sedang sekitar 1500 Da dan memberikan ion muatan tunggal. Analit dalam larutan dimasukkan ke dalam nebulizer, larutan dirubah menjadi uap tipis oleh nitrogen berkecepatan tinggi. Kemudian diteruskan ke korona dan terjadi ionisasi, ion-ion dari sumber ion bereaksi dengan analit dan mengionisasi melalui transfer muatan.

Atmospheric Pressure Photoionization (APPI) merupakan salah satu perkembangan terakhir dari sumber ion yang memanfaatkan tekanan atmosferik. Prinsipnya adalah dengan menggunakan foton untuk mengionisasi molekul fase gas. Sampel dalam larutan diuapkan dengan pemanasan nebulizer mirip dengan metode pada APCI. Setelah penguapan, analit berinteraksi dengan foton yang dipancarkan oleh lampu pelepas. Foton ini memicu rangkaian reaksi fase gas yang mengarah pada proses ionisasi molekul sampel. Perbedaan dari metode APCI adalah adanya penggunaan lampu pemancar foton. Manfaat dari metode ini adalah metode ini mempunyai potensi untuk mengionisasi senyawa non-polar, efisien untuk analisis senyawa kelas flavonoid, steroid, pestisida, hidrokarbon poliaromatik.

Mass Analyzer (penganalisis massa)

Setelah terbentuk ion fase gas, maka ion-ion dipisahkan berdasarkan massa masing-masing, sifat fisika ion yang diukur oleh *mass analyzer* adalah rasio massa terhadap muatan (m/z). Karenanya, untuk ion bermuatan ganda, nilai m/z adalah bagian faksional dari massa

aktual. *Mass analyzer* yang umum digunakan meliputi *quadrupole*, *ion trap*, *time-of-flight* (TOF).

Quadrupole analyzer terdiri dari empat *quad* (batang logam) yang sirkular atau idealnya hiperbolik, tersusun paralel secara berlawanan. Memisahkan ion dalam medan listrik yang divariasikan terhadap waktu, medan listrik dibuat menggunakan voltase frekuensi radio (Rf) dan voltase arus searah (dc) yang konstan dan diaplikasikan pada satu set (4 batang) logam yang dibuat secara presisi. Voltase Rf > Voltase dc, Pasangan batang AB dan CD dihubungkan dengan ujung sumber dc yang berlawanan sehingga ketika CD negatif maka AB positif. Ion yang masuk ke dalam ruang diantara batang hanya ion yang stabil dengan m/z tertentu yang sampai ke detektor. Jika m/z dan frekuensi tidak sesuai dengan kondisi yang diminta, ion beresilasi dengan jalur yang lebar yang menyebabkan ion bertubrukan dengan batang atau tertarik oleh vakum.

Ion trap menganalisis ion dengan menjebak ion pada ruang yang dapat di deteksi oleh elektroda berbentuk seperti cincin. Elektroda dihubungkan dengan voltase Rf dan dc. Tegangan Rf diberikan berubah-ubah, apabila Rf naik maka orbital ion bermassa berat akan stabil, sedangkan ion yang ringan tidak stabil dan akan terjadi tumbukan dengan dinding elektroda, kemudian di keluarkan menuju detektor.

Time-of-flight menganalisis ion dengan mengumpulkan hasil kromatografi cair pada sumur pelat *spotter*, kemudian sampel dicampur dengan kromofor seperti asam amino krotonat yang menyerap cahaya dari tembakan laser (menggunakan laser UV) intensitas tinggi dalam sumber ion. Molekul target ini kemudian meledak, menjadi fase gas sambil mengionisasinya secara kimia. Fragmen-fragmen tersebut menuju ke *flight tube* melalui lensa fokus. *Flight time* dari setiap fragmen tergantung pada rasio m/z-nya. Fragmen yang lebih ringan tiba di detektor lebih dahulu. Untuk mendeteksi fragmen m/z, setiap elemen detektor berarus diode diaktifkan hanya untuk m/z tertentu, yang memungkinkan pemilihan hanya pada massa tunggal per ledakan.

Detektor

Detektor berfungsi untuk merekam muatan yang diinduksi atau arus yang dihasilkan ketika ion lewat atau mengenai permukaan yang akhirnya menghasilkan spektrum massa. Macam-macam detektor yang tersedia meliputi *electron multiplier* (EM), *Faraday cup*, *negative-ion detector*, *post-acceleration detector*, *channelectron multiple array* (CEMA), *daly detector*, dan *array detector*.

A. MODE ANALISIS

Di dalam penganalisis massa, terdapat beberapa mode analisis yang dapat digunakan untuk menganalisis ion dalam instrument KCKUT-SM/SM, diantaranya:

1. *Full Scan atau MS Scan.*

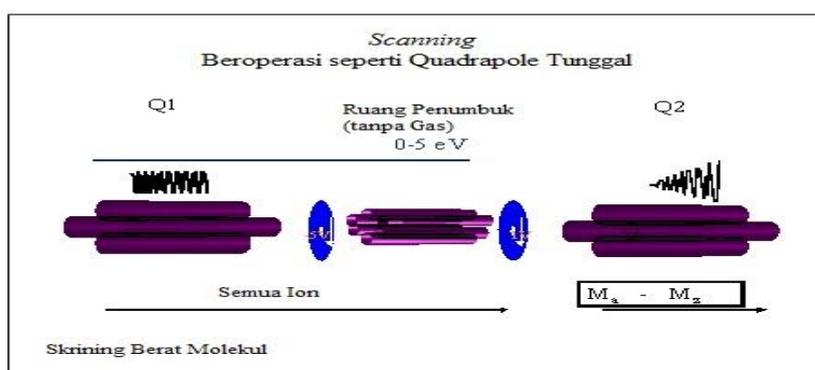
MS Scan bekerja menscan ion dari m/z yang diinginkan. Umumnya MS Scan berfungsi untuk mencari/menentukan ion parent/precursor ion. Ion masuk ke Q1 dan Ruang penumbuk dimana tidak ada scanning di dua bagian tersebut.

Q1: berfungsi hanya memfokuskan ion yang masuk, selanjutnya pada *cell Collision* tidak ada fragmentasi (sebab tidak ada gas collision dan tidak ada tegangan atau tegangan kecil).

Q2: berfungsi menscan ion dari m_a sampai m_z dan kemudian Ion dilanjutkan ke detektor.

MS scan akan menghasilkan kromatogram dan memberikan puncak-puncak pada tiap waktu retensi dan nilai S/N dari MS Scan mode akan lebih rendah dari fungsi mode lainnya.

Proses diatas dapat dilihat pada Gambar 4.2.



Gambar 4.2. Mode Analisis Full Scan/MS

2. *Selective Ion Reaction (SIR)*

SIR bekerja dengan cara memilih satu m/z yang diinginkan. Ion akan masuk ke Q1 dan Q1 akan mengunci m/z yang diinginkan dan dilanjutkan ke ruang penumbuk dan Q2.

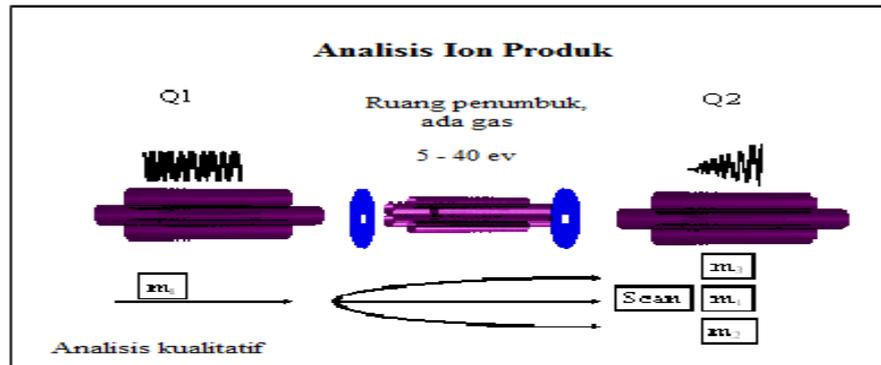
Q1: ion masuk dan mengunci m/z ion yang diinginkan, selanjutnya ion akan dilanjutkan ke ruang penumbuk, dimana tidak terjadi fragmentasi (tidak ada gas fragmentasi dan tidak ada tegangan/kecil).

Q2: ion akan dilanjutkan ke Q2 dimana Q2 berfungsi memfokuskan ion menuju detektor.

Nilai S/N pada SIR akan lebih besar dibandingkan dengan MS Scan, karena hanya ion yang dipilih saja yang dilewatkan ke detektor. Proses dapat dilihat pada Gambar 4.3.

4. *Product / daughter ion scan*

Pada Q1 ion masuk dan dikunci hanya m/z yang diinginkan (sama seperti fungsi SIR dan hanya di Q1). Q1 berfungsi untuk mengunci *parent ion/precursor ion*. Selanjutnya pada ruang penumbuk akan terjadi fragmentasi, Gas fragmentasi menyala dan ada nilai tegangan untuk memfragmentasi ion dari Q1. Ion-ion yang telah terfragment di ruang penumbuk akan masuk ke Q2 dan akan di scan pada Q2 ion fragmentasinya. (fungsi MS Scan pada Q2 untuk scanning ion fragmentasi). Proses tersebut dapat dilihat pada Gambar 4.5.

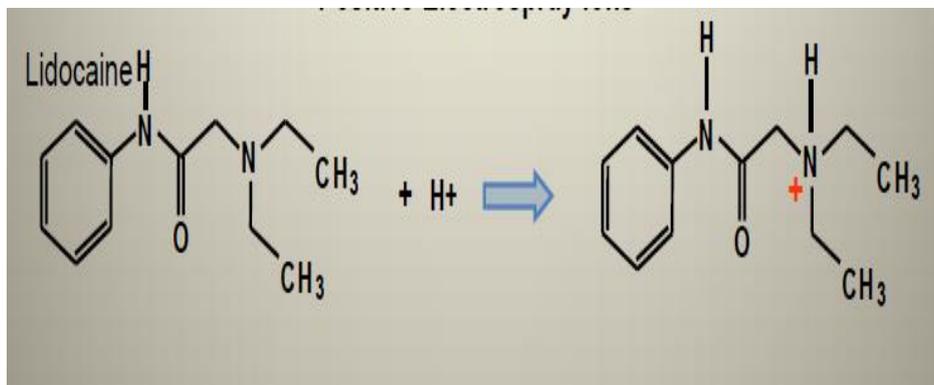


Gambar 4.5. Skema Analisis Ion Produk

B. JENIS DAN BENTUK ION

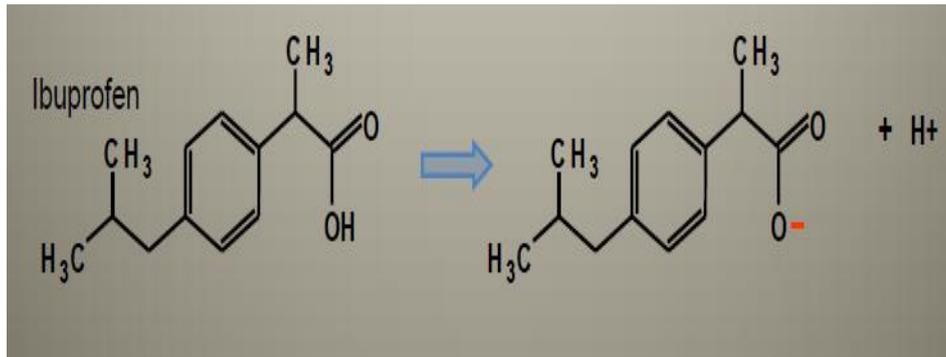
Mode ionisasi yang digunakan berdasarkan struktur dasar molekul

1. Basa => Mode Positif (ESI +), yaitu ionisasi dengan penambahan ion H^+ atau prinsip protonasi.



Gambar 4.6. Protonasi molekul

2. Asam => Mode Negatif (ESI -), yaitu ionisasi dengan pelepasan sebuah proton atau deprotonasi



Gambar 4.7. Deprotonasi molekul

C. CARA KERJA DAN PENYIAPAN SAMPEL

1. Menentukan rasio m/z analit yang akan dianalisa

a. Cara Auto Tune (Tunning Otomatis)

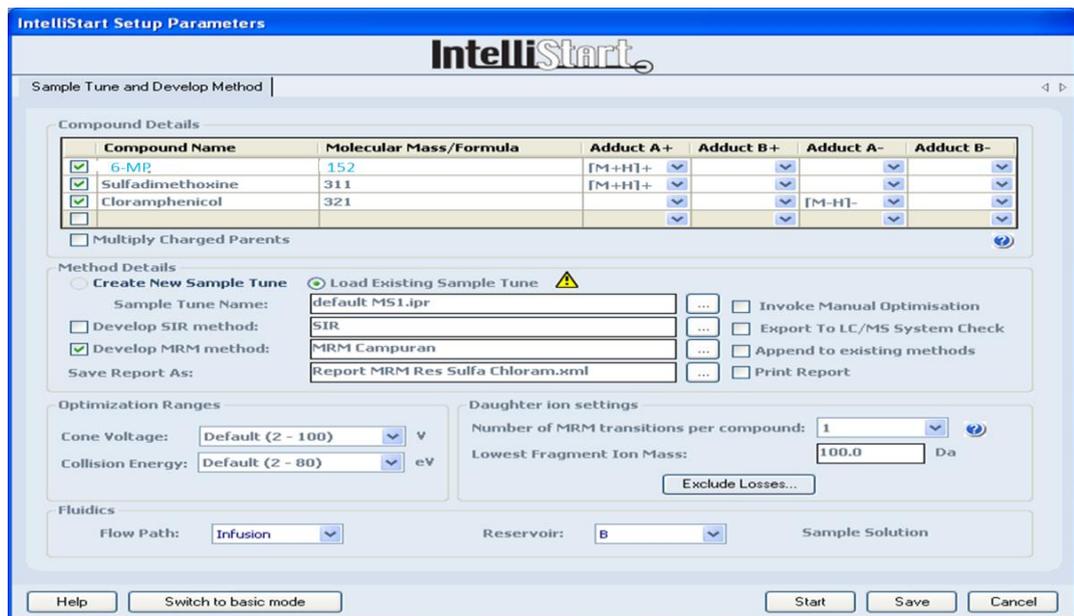
1. Isi botol tuning dengan larutan standard untuk tuning (konsentersasi 500-1000 ng/mL), lalu pasang pada tempatnya



2. Klik MS Console, dan Pilih TQD, Intellistart, maka akan muncul window berikut:

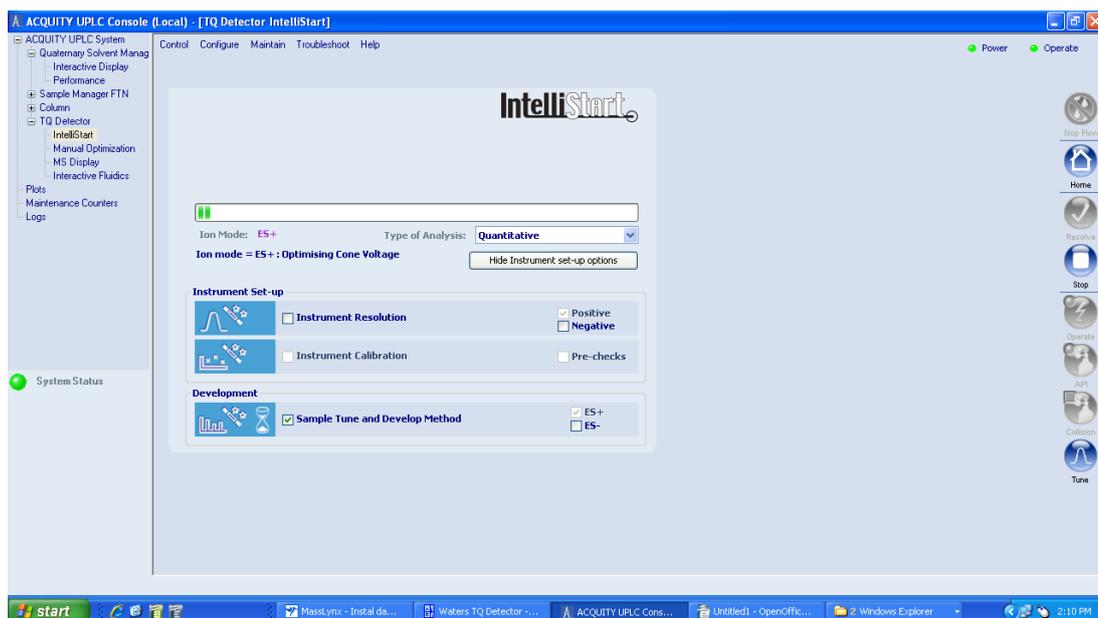


3. Pilih Type of analysis = Quantitative
4. Contreng Sample Tune and Develop Method (Jangan contreng ESI- kalau hanya mau ESI+)
5. Klik Start, maka akan muncul window berikut:



6. Isi Compound Name dan Molecular Mass dan Adduct A+ seperti di atas serta data lainnya seperti contoh di atas. (**Dapat Tunggal atau Multikomponen**)
7. Beri nama file untuk MRM method; misalnya MRM Campuran, maka setelah auto tune selesai, kita telah dibuatkan MS Methodnya secara otomatis. Beri nama file untuk hasil report dan tentukan folder kemana report akan disimpan

8. Klik Start, maka akan muncul window seperti berikut:



9. Tunggu sampai selesai, maka akan muncul report dengan tabel data Parent Ion, Product Ion, Cone Voltage dan Collision Energy berikut grafiknya. File tersebut akan tersimpan dengan format .html

10. Hasil Tuning

Method Development Report

MS1 Resolution	1.0
MS2 Resolution	0.75
Calibration Method	C:\MassLynx\IntelliStart.pro\AcquDB\Uncal.cal
Tune Method	C:\O6N7.PRO\ACQUDB\tamoxifen.ipr
Cone Voltage Range	2 - 100
Collision Energy Range	2 - 80
Lowest Fragment Mass	5.00
Excluded Losses	18.00, 44.00

Date: Generated on Mon 24 Oct 2016 at 12:12

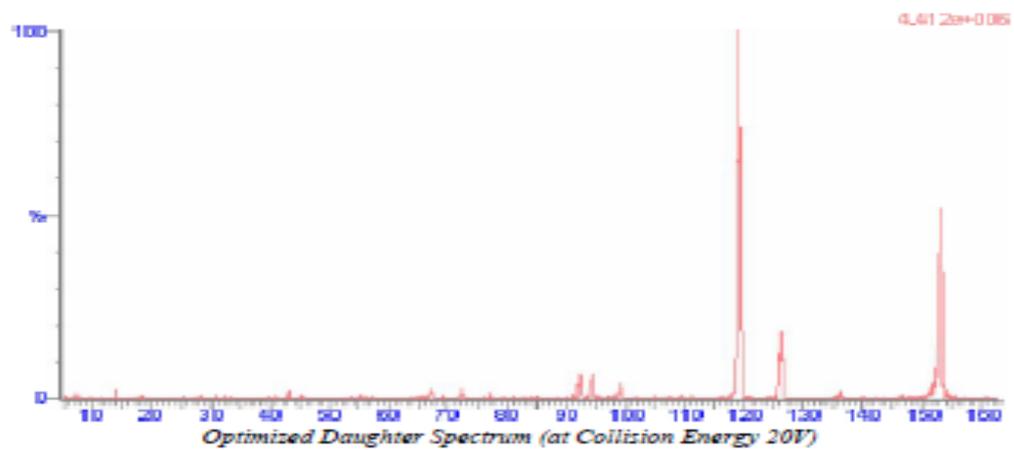
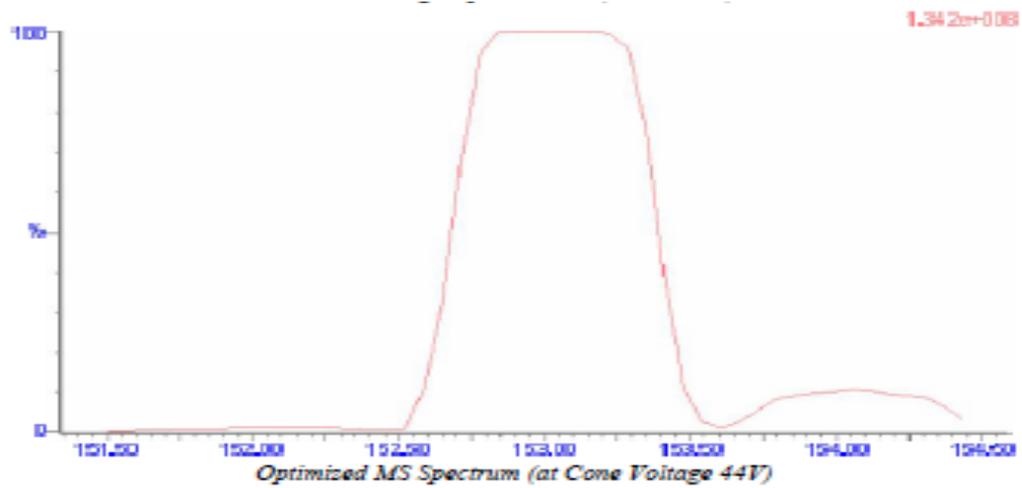
Results

IntelliStart generated the following experiments:

SIR Experiment	G:\4-OHCP in Vivo.PRO\ACQUDB\6-MP.exp
MRM Experiment	C:\O6N7.PRO\ACQUDB\6-MP.exp

IntelliStart found the following compounds:

Compound	Formula/Mass		Parent m/z	Cone Voltage	Daughters	Collision Energy	Ion Mode
6MP	152	1	153.03	44	119.10	20	ES+
		2	153.03	44	92.05	28	ES+
		3	153.03	44	126.00	20	ES+

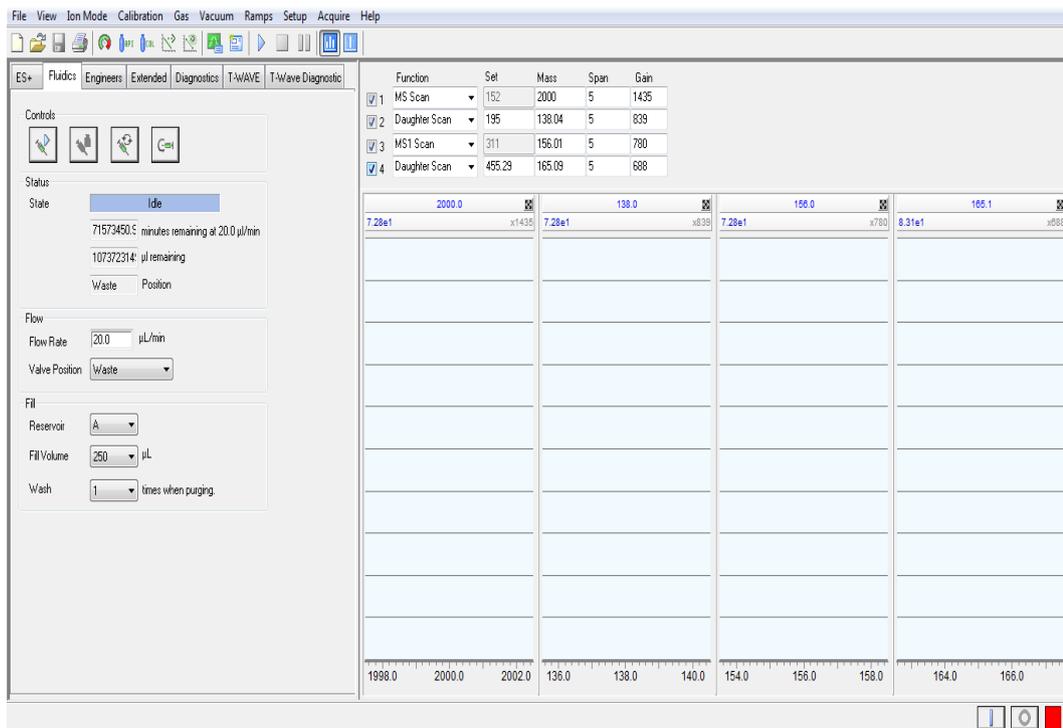


b. Cara Manual Tune (Tunning Manual)

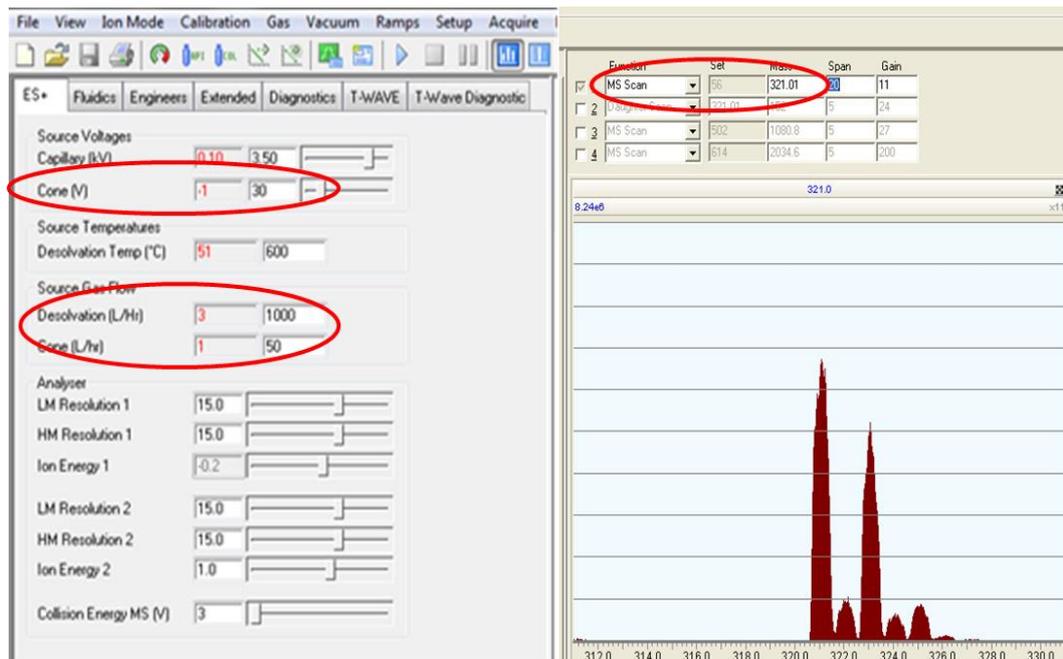
1. Isi botol tuning dengan larutan standard untuk tuning (konsentrasi 500-1000 ng/mL), lalu pasang pada tempatnya



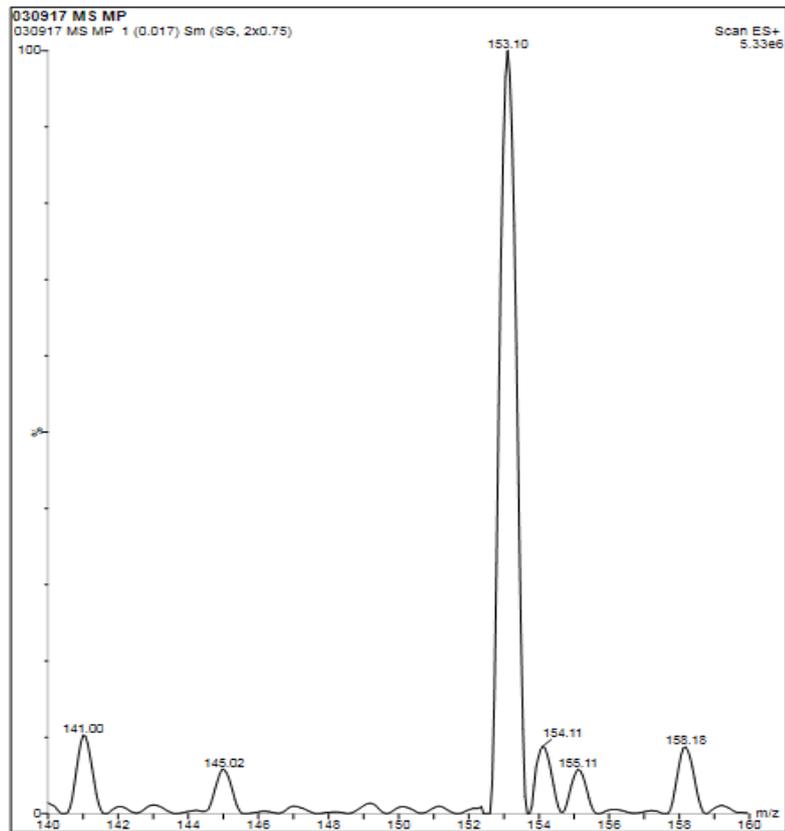
2. Klik icon Start Infusion



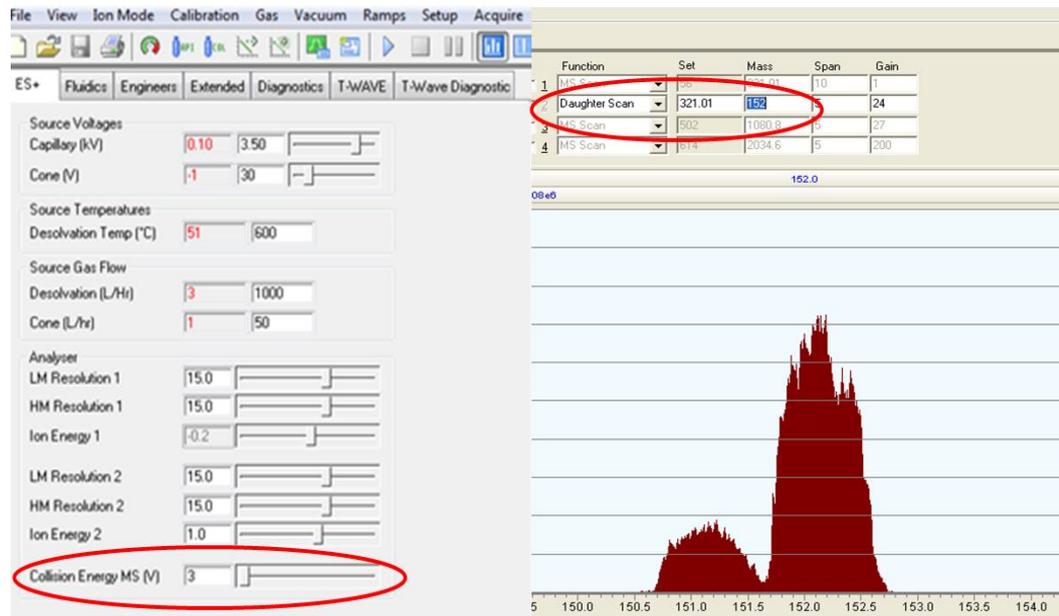
3. Klik ES+ (atur secara manual parameter Cone, Desolvasi dll)
Tentukan dahulu m/z untuk ion induk, pastikan collision gas nya off)



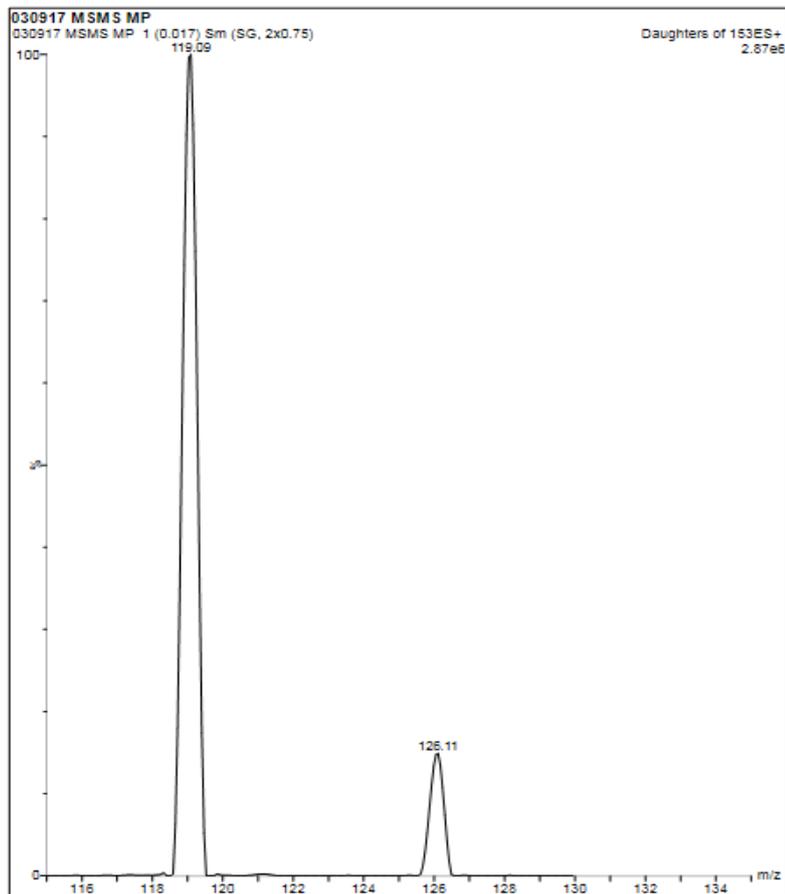
Hasil m/z ion induk



4. Tentukan m/z ion produk
Pastikan collision gas on, atur collision energy nya

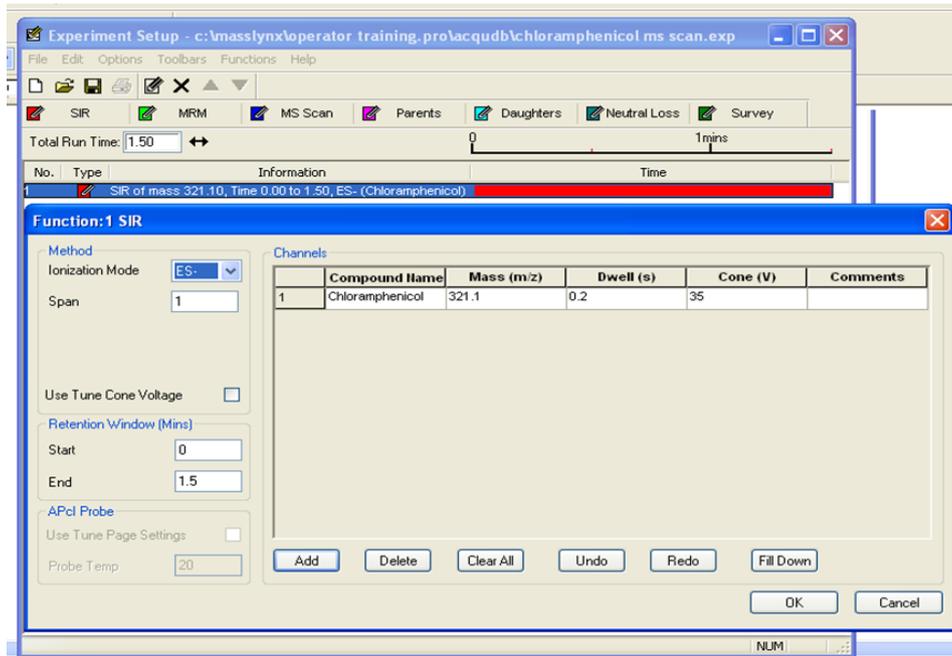


Hasil m/z ion produk



2. Membuat MS File

1. Dari Window utama MassLynx, klik MS Method
2. **Bila menggunakan SIR Mode**
klik SIR, pilih Ionization Mode, misalnya ES-.
Isi parameter lainnya seperti gambar dibawah.



3. **Bila menggunakan MRM Mode**

Klik MRM, pilih Ionization Mode, misalnya ES-.

Isi parameter lainnya seperti gambar dibawah.

a. Masukkan Start dan End timenya.

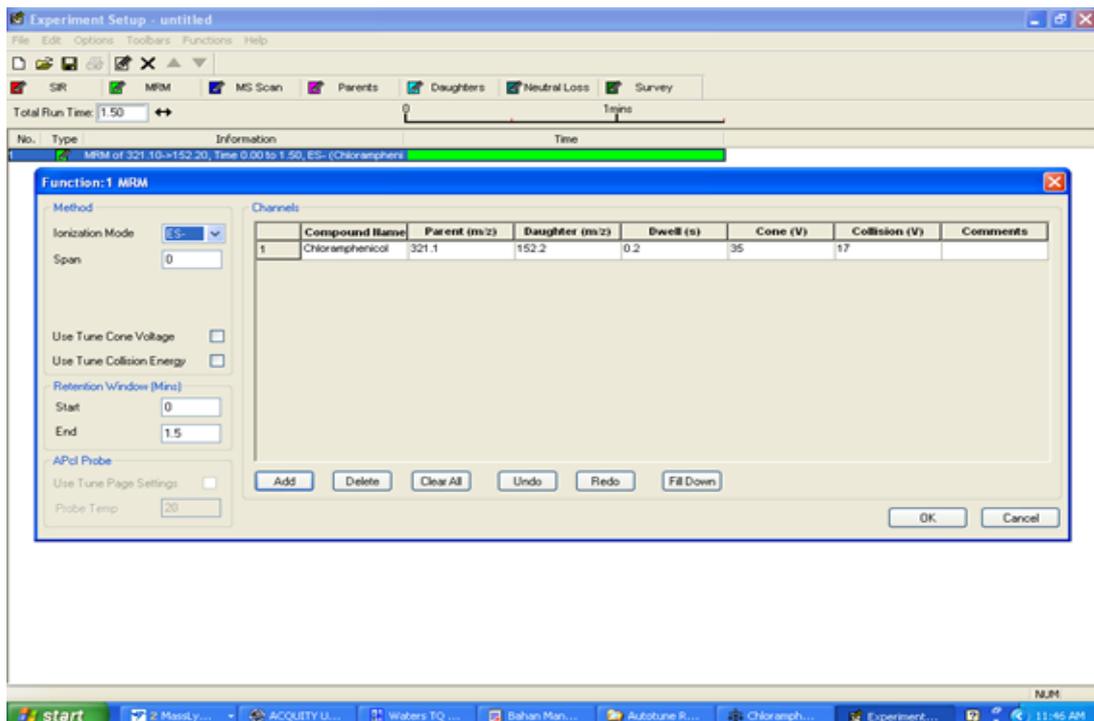
b. Ketik nama komponen.

c. Ketik m/z Parrent Ion dan Daughter Ion sesuai hasil tuning.

d. Masukkan Dwell Time = 0.2 atau auto dwell

e. Ketik Cone dan Collision sesuai hasil tuning.

f. Bila masih ada komponen yang lainnya, klik Add, lalu ulangi dari langkah b di atas.

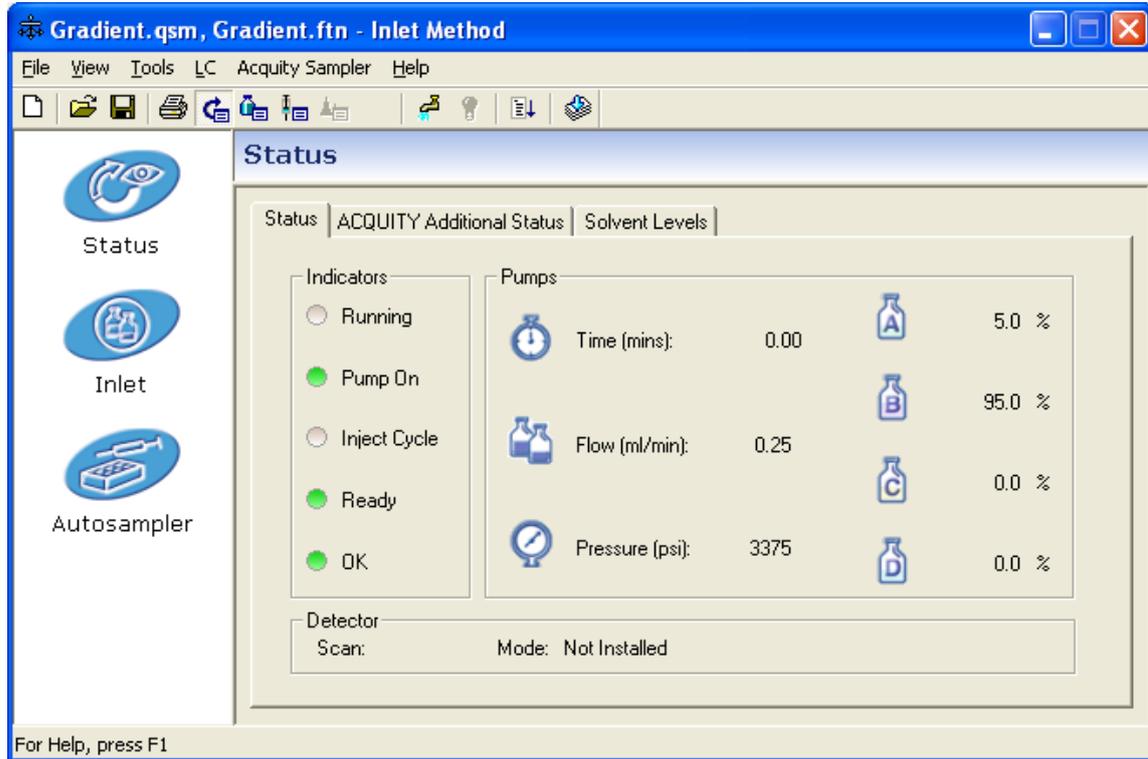


4. Klik OK,

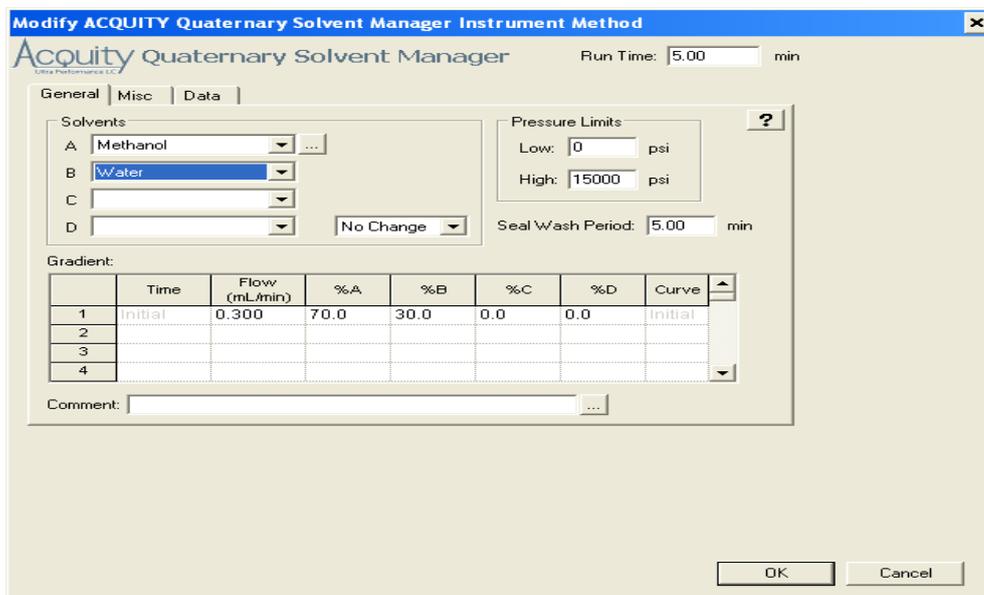
5. Klik File Save As, lalu beri nama file tersebut, mis Chloram ESINeg MRM, maka file akan disimpan dengan nama Chloram ESINeg MRM.EXP

3. Membuat Inlet Method

1. Dari Window MassLynx, Klik Inlet Method, maka akan muncul window berikut



2. Klik Inlet maka muncul window berikut
3. Masukkan Flow rate dan komposisi fasa gerak (Isokratik/gradien)
4. Masukkan Run Time, misalnya 5 menit.
5. Klik OK



6. Masukkan Temperatur column dan Temperatur Sample bila diperlukan.

Untuk menggunakan temperatur ruang, pilih off.

7. Klik OK.

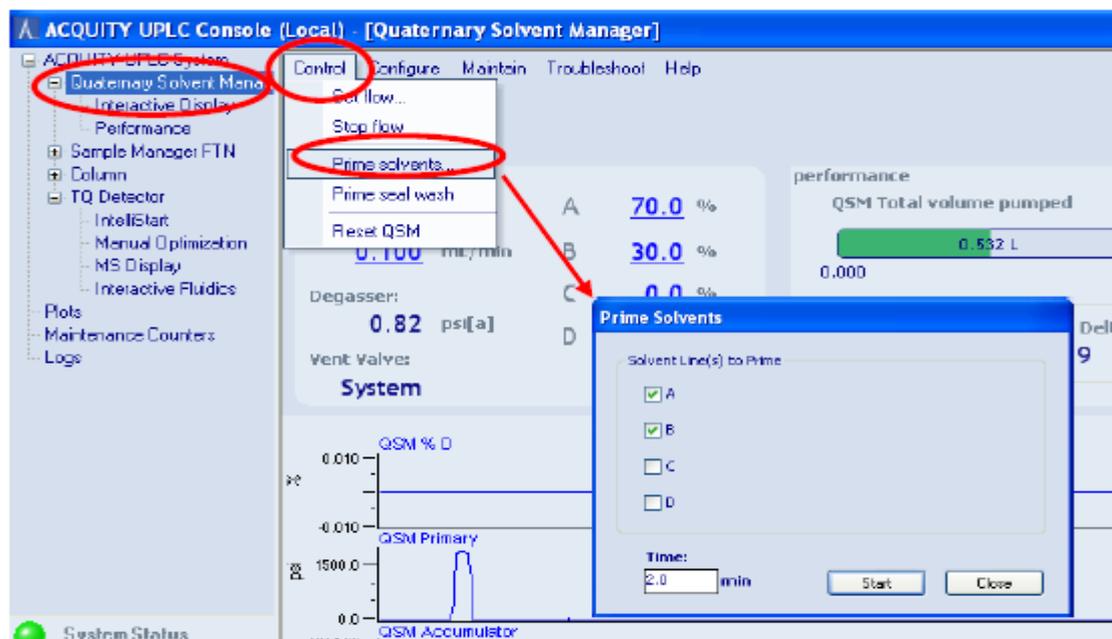
8. Simpan file dengan cara Klik File, Save As dan beri nama file tersebut.

4. Mengkondisikan QSM (*Quaternary Sample Manager*) dan SM FTN (*Sample Manager FTN*)

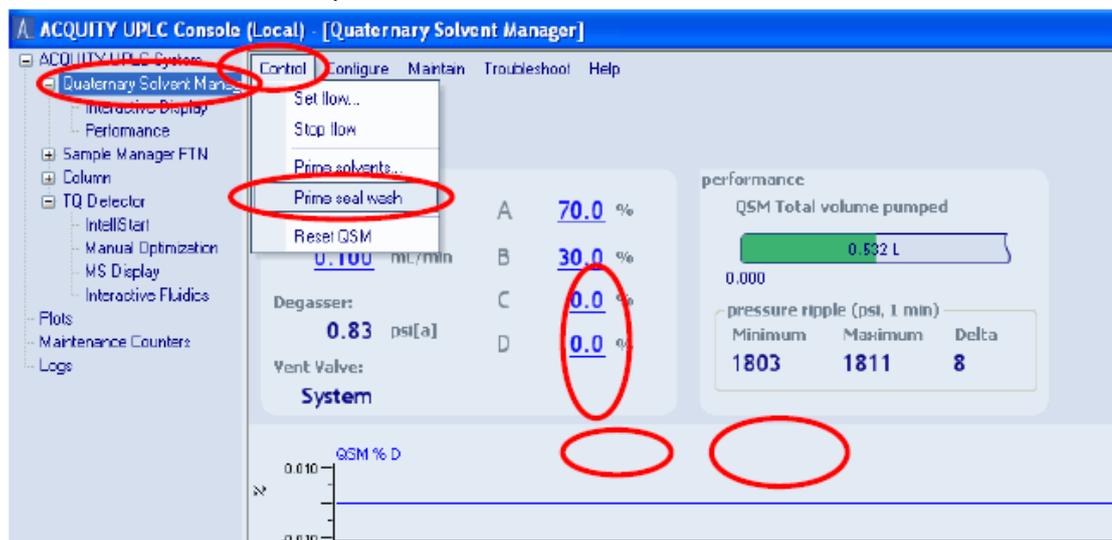
1. Siapkan semua solvent yang diperlukan untuk A, B, C, D, Purge Solvent (SM1)/Seal Wash (MeOH/H₂O 10/90) dan Needle Wash (50-100% MeOH).

2. Masuk Window MassLynx, kemudian klik Instrument, pilih MS Console, maka akan muncul window Acquity UPLC Console

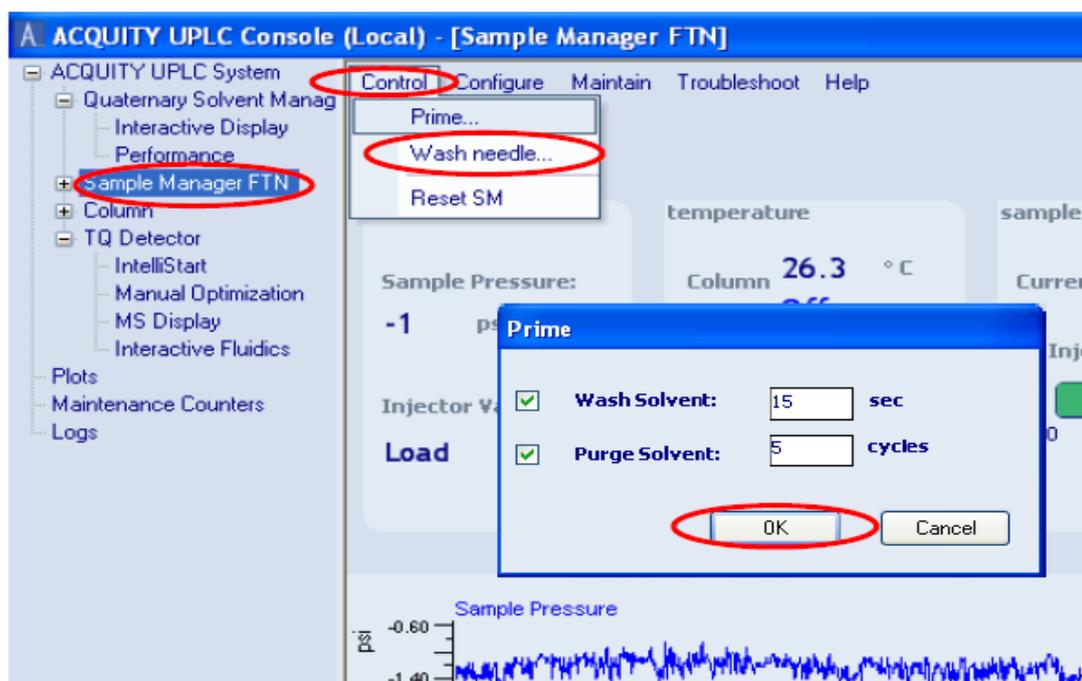
3. Klik Quaternary Solvent Manager, kemudian Klik Control, Prime Solvents, pilih A, B, C dan D, set waktunya 2-3 menit, lalu klik Start. Tunggu sampai priming selesai



4. Prime Seal Wash dengan cara Klik Control, Prime Seal Wash Klik Yes, dan tunggu 5 menit Setelah 5 menit, stop seal wash: klik Control, Seal Wash



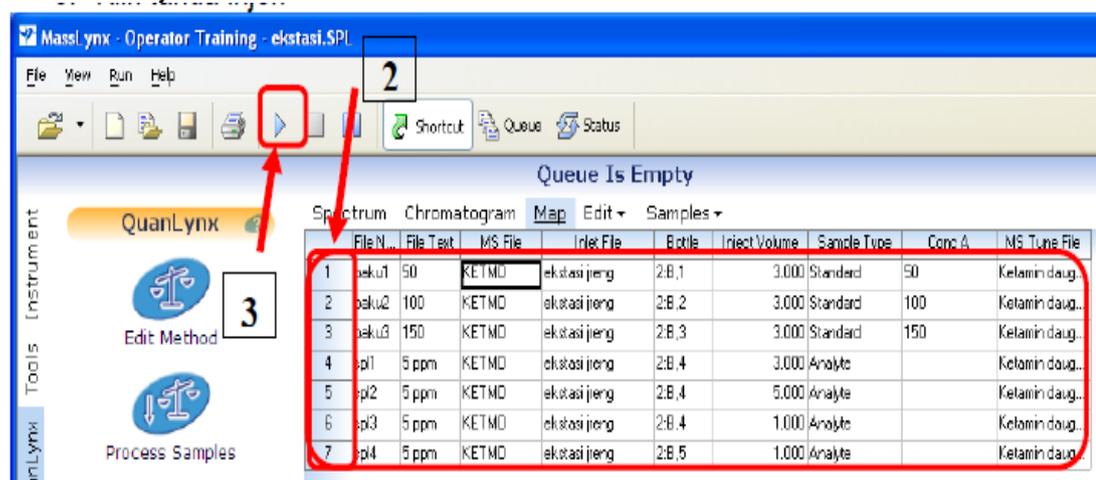
- Untuk Sample Manager-FTN, Lakukan Prime needle dengan cara Klik Sample Manager, Klik Control, Prime, maka akan muncul window berikut, Klik OK dan tunggu sampai proses prime selesai.



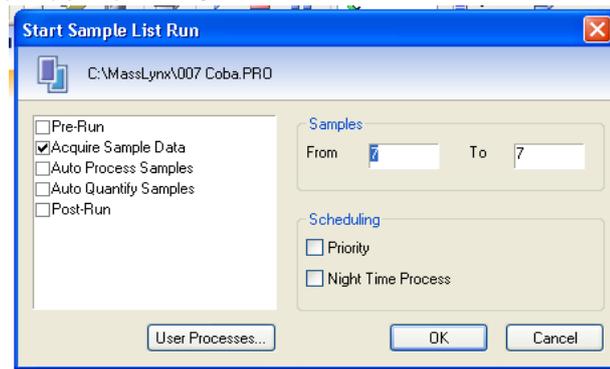
- Set Flowrate QSM = 0.3 ml/min dengan komposisi solvent sesuai prosedur analisa, misalnya A:B = 50:50
- Set suhu kolom dan suhu autosampler sesuai dengan prosedur analisa.

5. Injek Standard/Sampel

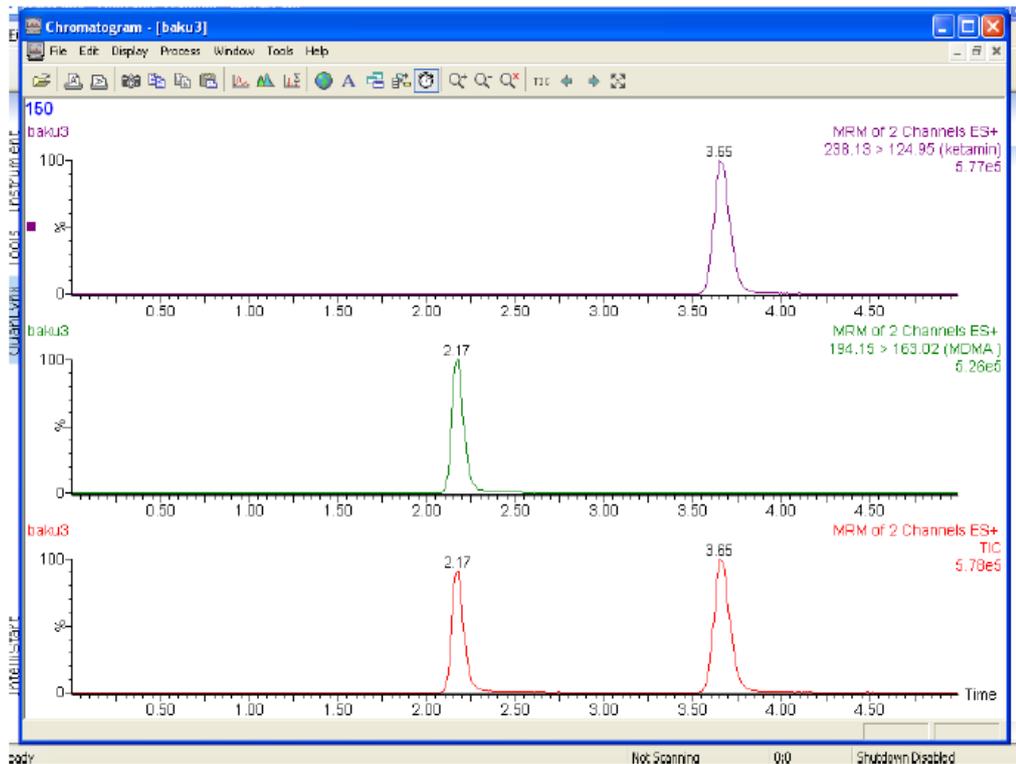
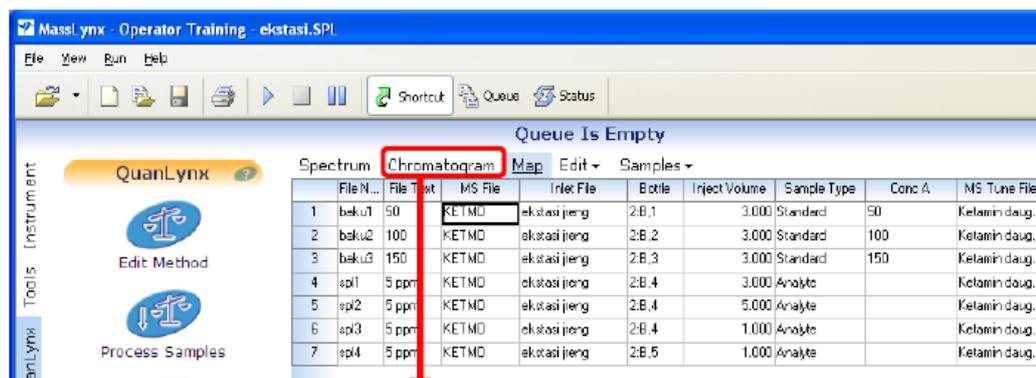
- Siapkan semua standard dari konsentrasi kecil sampai yang lebih besar, dan sample dalam vial, lalu tempatkan kedalam carousel di dalam Sample Manager sesuai dengan lokasi bottle yang telah diisi
- Setelah mengisi nama file name dan semua method, block pada nomor yang akan diinjek
- Klik tanda injek



4. Akan muncul window beriku: klik OK

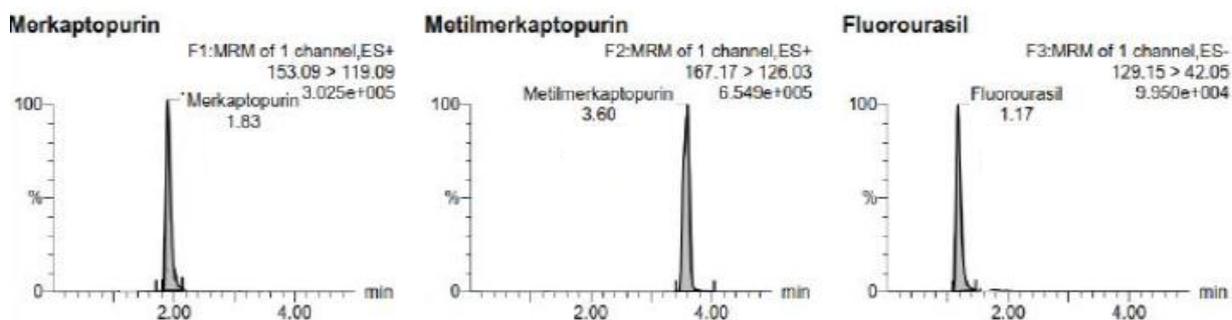


5. Untuk melihat kromatogram, klik chromatogram, maka akan muncul kromatogramnya



D. DATA KROMATOGRAM YANG DIPEROLEH

Hasil analisa LCMS/MS berupa kromatogram dari setiap analit dan juga baku dalam yang digunakan, kromatogram yang dihasilkan terpisah untuk setiap analit dan baku dalam sesuai dengan rasio m/z dari senyawa tersebut.



Kondisi analisis: kolom C18 BEH (2,1 x 100 mm) 1,7 μ m; laju alir 0,2 mL/menit; volume penyuntikan 10 μ L; deteksi MS nilai m/z 153,09 -> 119,09 untuk 6-MP, 167,17 -> 126,03 untuk 6-MMP, dan 129,15 -> 42,05 untuk 5-FU

Gambar 4.8. Kromatogram analit dan baku dalam dengan fase gerak gradien pada kolom C18

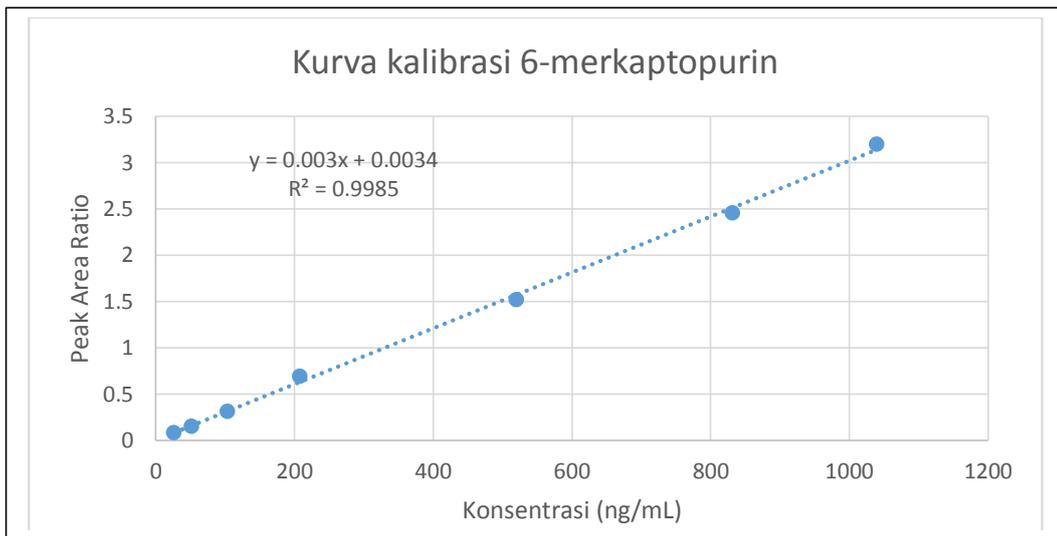
E. ANALISA KUALITATIF DAN KUANTITATIF

Hasil kromatogram memberikan data kualitatif dan kuantitatif dari analit, data kualitatif analit tergambar dari kromatogram yang dihasilkan pada waktu retensi tertentu yang spesifik berada di channel yang sudah ditentukan rasio m/z nya. Sedangkan data kuantitatif berdasarkan perbandingan area analit dengan baku dalam yang dihasilkan.

Contoh perhitungan kadar 6-merkaptopurin dan 6-metilmerkaptopurin dengan baku dalam 5-fluorourasil.

Tabel 4.1. Hasil kurva kalibrasi 6-merkaptopurin

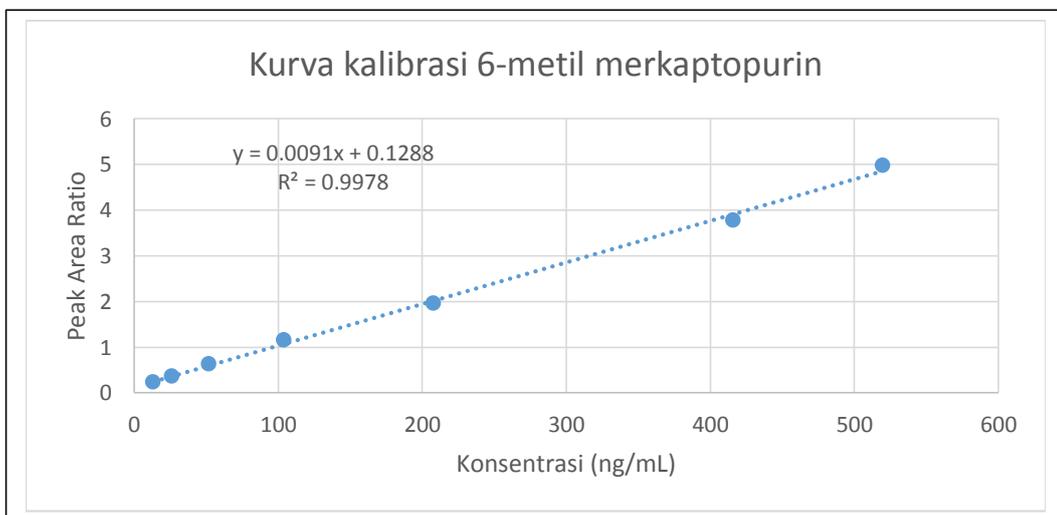
Konsentrasi sesungguhnya (ng/mL)	Area		PAR	Konsentrasi terukur (ng/mL)	%diff
	6-MP	5-FU			
0,0	0	7001	0	0	0
26,0	711	8798	0,0808	25,80	-0,77
52,0	1345	8968	0,1499	48,83	-6,09
104,0	2785	8929	0,3119	102,83	-1,12
208,0	6181	8894	0,6949	230,50	10,82
520,0	13684	8990	1,5221	506,23	-2,65
832,0	21345	8689	2,4565	817,70	-1,72
1040,0	28001	8757	3,1975	1064,70	2,37



Gambar 4.9. Kurva kalibrasi 6-merkaptopurin

Tabel 4.2. Hasil kurva kalibrasi 6-metilmerkaptopurin

Konsentrasi sesungguhnya (ng/mL)	Area 6-MMP	5-FU	PAR	Konsentrasi terukur (ng/mL)	% diff
0,0	0	7001	0	0	0
13,0	2097	8798	0,2383	12,03	-7,44
26,0	3187	8968	0,3553	24,89	-4,27
52,0	5583	8929	0,6253	54,56	4,92
104,0	10266	8894	1,1543	112,69	8,36
208,0	17589	8990	1,9565	200,85	-3,44
416,0	32778	8689	3,7724	400,39	-3,75
520,0	43605	8757	4,9794	533,03	2,51



Gambar 4.10. Kurva kalibrasi 6-metilmerkaptopurin

Tabel 4.3. Hasil Analisis Sampel

Sampel	Area			PAR		Konsentrasi (ng/mL)	
	6-MP	6-MMP	5-FU	6-MP	6-MMP	6-MP	6-MMP
1	2174	2592	9979	0,2178	0,2597	71,47	14,38
	2187	2562	10105	0,2164	0,2535	71,00	13,70
2	3270	3321	9984	0,3275	0,3323	108,03	22,36
	3192	3389	10273	0,3107	0,3352	102,43	22,68

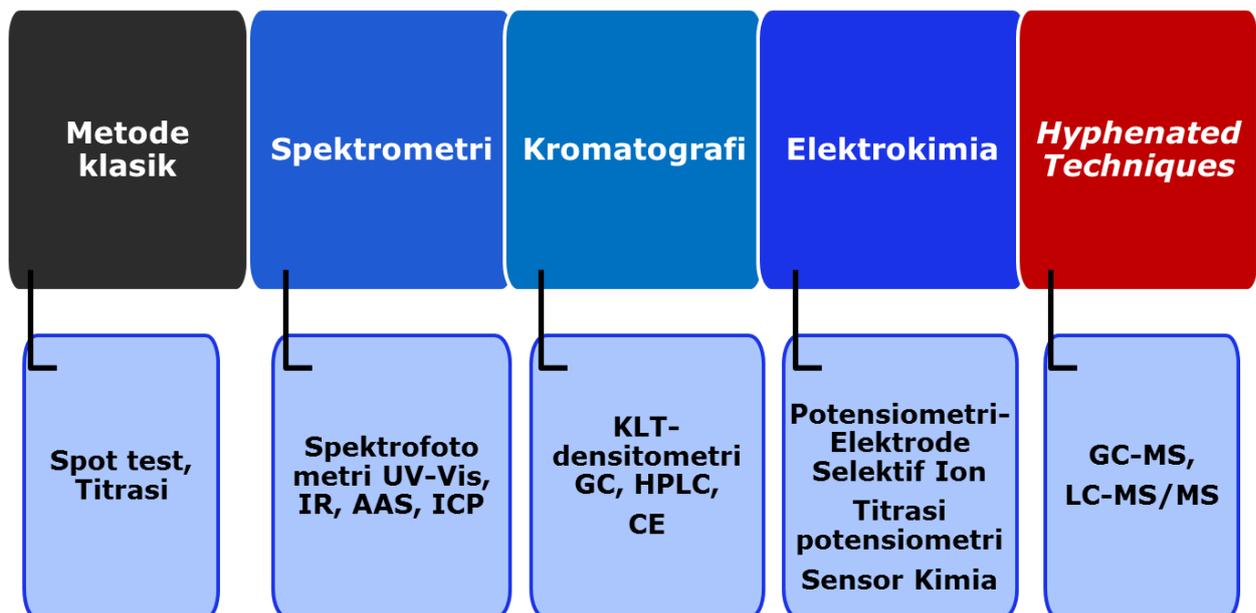
Hasil analisis sampel diperoleh kadar 6-merkaptopurin untuk sampel 1 adalah 71,47 ng/mL & 71,00 ng/mL, dan untuk sampel 2 adalah 108,03 ng/mL & 102,43 ng/mL. Sedangkan kadar 6-metilmerkaptopurin pada sampel 1 adalah 14,38 ng/mL & 13,70 ng/mL, dan untuk sampel 2 adalah 22,36 ng/mL & 22,68 ng/mL.

BAB 5

PEMANFAATAN KCKUT-SM/SM UNTUK ANALISA SEDIAAN OBAT

Obat adalah bahan atau paduan bahan, termasuk produk biologi yang digunakan untuk mempengaruhi atau menyelidiki sistem fisiologi atau keadaan patologi dalam rangka penetapan diagnosis, pencegahan, penyembuhan, pemulihan, peningkatan kesehatan, dan kontrasepsi untuk manusia. Sedangkan bahan obat adalah bahan baik yang berkhasiat maupun tidak berkhasiat yang digunakan dalam pengolahan obat dengan standard mutu sebagai bahan baku farmasi.

Analisa sediaan obat berarti menganalisa terhadap analit dan matriks sediaan. Analit adalah zat dalam sampel yang dianalisis (target analisis) dapat berupa zat tunggal atau campuran. Matriks sampel disebut juga plasebo, merupakan komposisi sama dengan sampel tetapi tidak mengandung analit.



Gambar 5.1. Perkembangan Metode Analisa

Dalam perkembangannya teknik analisa sediaan obat terus berubah dan berkembang, mulai dari metode klasik sampai *Hyphenated Techniques*. Hal ini untuk menjawab perkembangan zat aktif dan sediaan obat yang semakin kompleks sekaligus menghasilkan metode analisa dengan hasil yang cermat dan seksama.

Penggunaan *Hyphenated Techniques* seperti UPLC-MS/MS diperlukan untuk analisa sediaan obat yang mengandung zat aktif kompleks, seperti analisa penentuan vitamin yang larut dalam air pada sirup anak. Metode analisa vitamin larut air menggunakan kromatografi cair kinerja tinggi (KCKT) tidak dapat memisahkan dan menganalisa secara simultan kandungan zat aktif vitamin dalam sediaan. Metode KCKT ini memiliki beberapa keterbatasan termasuk pada saat analisis, diantaranya; beberapa vitamin memiliki kepolaran yang sama, keberadaan asam askorbat juga terdeteksi yang mungkin mengganggu analisis nikotinamida, yang memiliki waktu retensi paling awal. Analisa KCKT dengan pasangan ion tidak dapat mendeteksi kotoran atau degradasi vitamin dalam persiapan sirup anak seperti riboflavin dan nicotinamide.

UPLC-MS/MS dengan mode positif dapat menganalisis semua vitamin yang larut dalam air pada sirup anak dan memisahkan lisin dengan vitamin lain. Keuntungan lain dari UPLC-SM/SM adalah bahwa itu tidak memerlukan prosedur pembersihan sampel yang rumit. Vitamin yang larut dalam air memiliki struktur dan sifat kimia yang beragam dan kebanyakan dari mereka adalah senyawa polar dengan retensi kurang dalam kromatografi fase terbalik. UPLC-MS/MS merupakan metode yang sangat selektif dan sensitif yang dapat menentukan sampel dengan konsentrasi rendah, menggunakan rasio m/z pada ion induk dan rasio m/z pada ion produk. Metode UPLC-MS/MS telah digunakan untuk pengembangan metode simultan untuk menentukan 14 vitamin yang larut dalam air (tiamin, riboflavin, asam pantotenat, asam nikotinat, nicotinamide, pyridoxine, pyridoxal, biotin, asam folat, cyanocobalamin, asam askorbat, karnitin, kolin dan taurin) dalam formula bayi menggunakan ACQUITY UPLC® BEH Shield C18 kolom (2,1 mm x 100 mm; 1,7 μ m, Waters) dengan fase gerak metanol dan 10 mM amonium asetat. Identifikasi dan kuantifikasi dilakukan menggunakan Multiple Reaction Monitoring (MRM) dengan mode ionisasi ESI positif.

A. ANALISA MULTIVITAMIN DALAM SEDIAAN SIRUP

Vitamin mempunyai fungsi penting pada proses biokimia tubuh dan berperan pada proses utama tubuh manusia termasuk metabolisme, mempertahankan tingkat glukosa darah, regulasi pertumbuhan sel dan diferensiasi. Akhir-akhir terjadi peningkatan pertumbuhan produk vitamin yang dikombinasikan baik dengan vitamin maupun dengan makanan dalam satu produk, sehingga diperlukan metode penetapan kadar secara simultan produk kombinasi tersebut untuk menjamin kualitas dan pemenuhan persyaratan regulatori. Sehingga diperlukan metode penetapan kadar secara simultan multivitamin dari produk tersebut.

Berikut cara menentukan analisa multivitamin secara simultan dari sediaan sirup yang mengandung 7 vitamin; B1, B2, B3, B5, B6, B12, dan C menggunakan UPLC-MS/MS:

1. Optimasi Parameter Deteksi Massa

Optimasi ion dari analit yang akan dianalisis sangat penting untuk mendapatkan selektivitas dan sensitivitas dari analit yang dianalisis secara simultan dengan adanya analit lain dan juga matriks sediaan. Matriks sediaan sirup yang digunakan adalah sukrosa, gliserin, sorbitol, natrium CMC, natrium sitrat, asam sitrat, asam benzoate dan essence orange. Mode ionisasi yang digunakan adalah *electrospray ionization* (ESI) dengan mode analisis yang digunakan *multiple reaction monitoring* (MRM) sehingga akan diperoleh ion induk dan ion produk. Gas nitrogen digunakan untuk desolvasi larutan dan gas argon sebagai gas kolision.

Hasil optimasi deteksi massa dilakukan pada ionisasi ESI + dengan tegangan kapiler 3,0 KV, tegangan cone 40 volt, suhu source 150 oC, suhu desolvasi 500 oC, laju alir gas kolision 0,2 mL/menit, tegangan gas kolision 0,5 bar. Diperoleh rasio m/z dari analit pada tabel 5.1.

Tabel 5.1. Rasio m/z analit dengan mode *multiple reaction monitoring* (MRM)

Vitamin	Ion Induk	Ion Produk	Cone (V)	Collision energy (eV)
B1	265,15	122,00	20	20
B2	377,20	243,10	40	28
B3	123,00	80,10	35	20
B5	268,05	76,00	26	20
B6	170,10	152,00	25	17
B12	678,45	147,05	33	45
C	177,00	144,00	21	17

2. Kondisi Optimum Sistem Kromatografi

Selain optimasi rasio m/z, optimasi sistem kromatografi dilakukan. Parameter dioptimalkan, antara lain: jenis kolom, komposisi fase gerak (sistem gradien), pH fase gerak, laju alir, dan suhu kolom. Kolom yang dipilih adalah kolom kolom ACQUITY UPLC® Shield C8 RP (2,1 mm x 50 mm; 1,7 µm). Kolom C8 memiliki rantai alkil yang lebih pendek dari kolom C18. Kolom C8 lebih cocok untuk pemisahan senyawa polar. Komposisi fase gerak menggunakan ammonium format 10 mM dalam asam formiat 0,2% pH 2,8-metanol dengan elusi gradien. Optimasi suhu kolom pada 40 ° C. Laju alir yang

digunakan adalah 0,4 mL/menit, dengan volume injeksi 5 μ L. Suhu *autosampler* dipertahankan pada 4°C.

3. Larutan Standar

Standar asam askorbat (Vitamin C) ditambahkan langsung pada larutan sampel karena ketidakstabilan dalam larutan. Asam askorbat disiapkan setiap hari. Setiap larutan stok standar diambil dalam serangkaian tiamin hidroklorida (B1), riboflavin (B2), nikotinamid (B3), dexpanthenol (B5), piridoksin hidroklorida (B6), dan sianokobalamin (B12) dalam jumlah 1 mL; 50 mL; 1 mL; 1 mL; 5 mL dan 4 mL ke dalam 100 mL labu ukur coklat dan 25 mg asam askorbat ditambahkan dan diencerkan dengan air untuk mendapatkan konsentrasi masing-masing 0,0025 mg/mL; 0,025 mg/mL; 0,0025 mg/mL; 0,0025 mg/mL; 0,0313 mg/mL dan 0,025 mg/mL. Konsentrasi vitamin C adalah 0,25 mg/mL. Kurva kalibrasi untuk setiap vitamin terdiri dari minimal enam larutan standar dalam kisaran linier 1-100 ng/mL untuk B1, B3 dan B6, 10-1000 ng/mL untuk B2 dan B5, 100-10000 ng/mL untuk vitamin C, 12,5 - 312,5 ng/mL untuk B12.

4. Preparasi Sampel

Sampel ditimbang setara dengan 0,5 mg tiamin hidroklorida, dilarutkan dengan air 50 mL dan sonikasi 5 menit, ad hingga 100 mL. Larutan yang diencerkan dengan amonium format 10 mM dalam asam format 0,2% pada pH 2,8 untuk memperoleh konsentrasi tiamina hidroklorida 50 ng/mL, riboflavin 480 ng/mL, nikotinamida 50 ng/mL, hidroksi piridoksin 50 ng/mL, sianokobalamin 20 ng/mL, dexpanthenol 250 ng/mL dan asam askorbat 1,5 μ g/mL. Sebelum di injek pada UPLC-MS/MS larutan disaring menggunakan filter membran 0,2 μ m.

5. Validasi metode analisa

5.1. Linieritas dan Rentang

Kurva kalibrasi selama periode waktu enam bulan menunjukkan koefisien korelasi linier rata-rata (r) lebih besar dari 0,99 untuk semua vitamin, mengindikasikan korelasi positif yang kuat antara konsentrasi teoritis dan nilai-nilai yang dianalisis.

Tabel 5.2. Kurva Kalibrasi Analit Vitamin

Vitamin	Rentang Konsentrasi (ng/mL)	Korelasi (r)	n
B1	1-100	0,9982	8
B2	10-1000	0,9965	9
B3	1-100	0,9981	7
B5	1-100	0,9976	7
B6	10-1000	0,9991	9
B12	12,5-312,5	0,9963	6
C	100-10000	0,9917	6

5.2. Efek Matriks

Proses ionisasi analit dapat dipengaruhi oleh matrik atau pengganggu lain dari sampel, sehingga dapat mempengaruhi reproduibilitas, linieritas dan akurasi metode. Efek matriks dievaluasi dengan cara membandingkan respon analit larutan baku dengan respon bangko yang di spiked baku pada konsentrasi yang sama. Jika efek matriks kurang dari 100% berarti terjadi penekanan ion (*ion suppression*) tetapi jika efek matriks lebih dari 100% berarti terjadi peningkatan ion (*ion enhancement*).

Tabel 5.3. Efek Matriks Analit Vitamin

Vitamin	Efek Matriks (%)
B1	91,28
B2	99,58
B3	92,91
B5	90,14
B6	81,15
B12	115,49
C	92,16

Terjadi penekanan ion pada vitamin B1, B2, B3, B6, dan C, sedangkan peningkatan ion terjadi pada vitamin B12.

5.3. Presisi (Keseksamaan)

Presisi dilakukan untuk melihat keberulangan metode analisis dengan melakukan pengulangan analisis pada konsentrasi yang ditetapkan sesuai dengan jenis pengujian. Penetapan kadar dilakukan sebanyak 6 kali, kemudian dihitung nilai rata-rata (\bar{x}), simpangan baku (SD), simpangan baku relatif (SBR).

Keseksamaan terdiri dari 3 tingkat yaitu; Rিপিতাৰিতা yang merupakan presisi di bawah kondisi yang sama dengan interval waktu yang singkat (intra hari), Intermediat merupakan presisi yang menggambarkan variasi dalam-laboratorium (hari, analisis dan peralatan yang berbeda), Reprodusibilitas yang menggambarkan antara laboratorium (studi kolaboratif).

Tabel 5.4. Presisi Analit Vitamin

Vitamin	Ripitabilitas		Reprodusibilitas	
	Kadar rata2 (%)	RSD (%)	Kadar rata2 (%)	RSD (%)
B1	99,03	1,67	97,69	1,60
B2	98,68	1,54	99,64	1,31
B3	111,19	1,66	109,16	0,79
B5	103,52	0,82	102,42	1,35
B6	105,24	1,07	103,99	0,38
B12	98,09	1,51	99,19	1,17
C	98,16	1,30	79,68	3,38

5.4. Akurasi dan perolehan kembali

Akurasi adalah ukuran dari kedekatan hasil uji atau nilai rata-rata dari suatu set data terhadap nilai sebenarnya. Perolehan kembali merupakan nilai perolehan kembali dimana penambahan sejumlah tertentu analit yang diketahui kadarnya ke dalam suatu produk atau sampel yang telah ditetapkan kadarnya. Uji dilakukan pada konsentrasi 80%, 100% dan 120%.

Tabel 5.5. Perolehan kembali Analit Vitamin

Vitamin	Perolehan Kembali (%) n=3			Kriteria Keberterimaan (%)
	80 %	100 %	120 %	
B1	101,66	96,13	95,73	95-105
B2	98,28	99,24	98,07	95-105
B3	100,62	101,18	98,82	97-103
B5	102,30	102,12	95,42	95-105
B6	98,72	98,91	99,66	95-105
B12	102,23	93,24	95,57	80-110
C	101,38	100,94	101,30	97-103

5.5. Batas Deteksi (LOD) dan Batas Kuantisasi (LOQ)

Batas deteksi adalah konsentrasi terendah analit dalam sampel yang dapat dideteksi, tetapi tidak perlu kuantitatif dalam kondisi percobaan yang ditentukan. Uji batas semata-mata menunjang bahwa konsentrasi analit di bawah atau di atas aras tertentu. Batas kuantisasi adalah konsentrasi terendah analit dalam sampel yang dapat ditentukan secara kuantitatif dengan presisi dan akurasi yang dapat diterima dalam kondisi percobaan yang telah ditetapkan.

Batas deteksi dan batas kuantisasi dapat ditetapkan dengan menggunakan metode evaluasi visual berdasarkan “*signal to noise*” dan berdasarkan standar deviasi respon dan slope.

Tabel 5.6. LOD dan LOQ Analit Vitamin

Vitamin	Instrumental S/N	
	LOD (ng/mL)	LOQ (ng/mL)
B1	0,0830	0,2768
B2	0,0561	0,1871
B3	1,4423	4,8077
B5	0,3513	1,1710
B6	1,0323	3,4412
B12	3,9342	13,1141
C	9,0937	30,3122

5.6. Ketegaran (Robutsness)

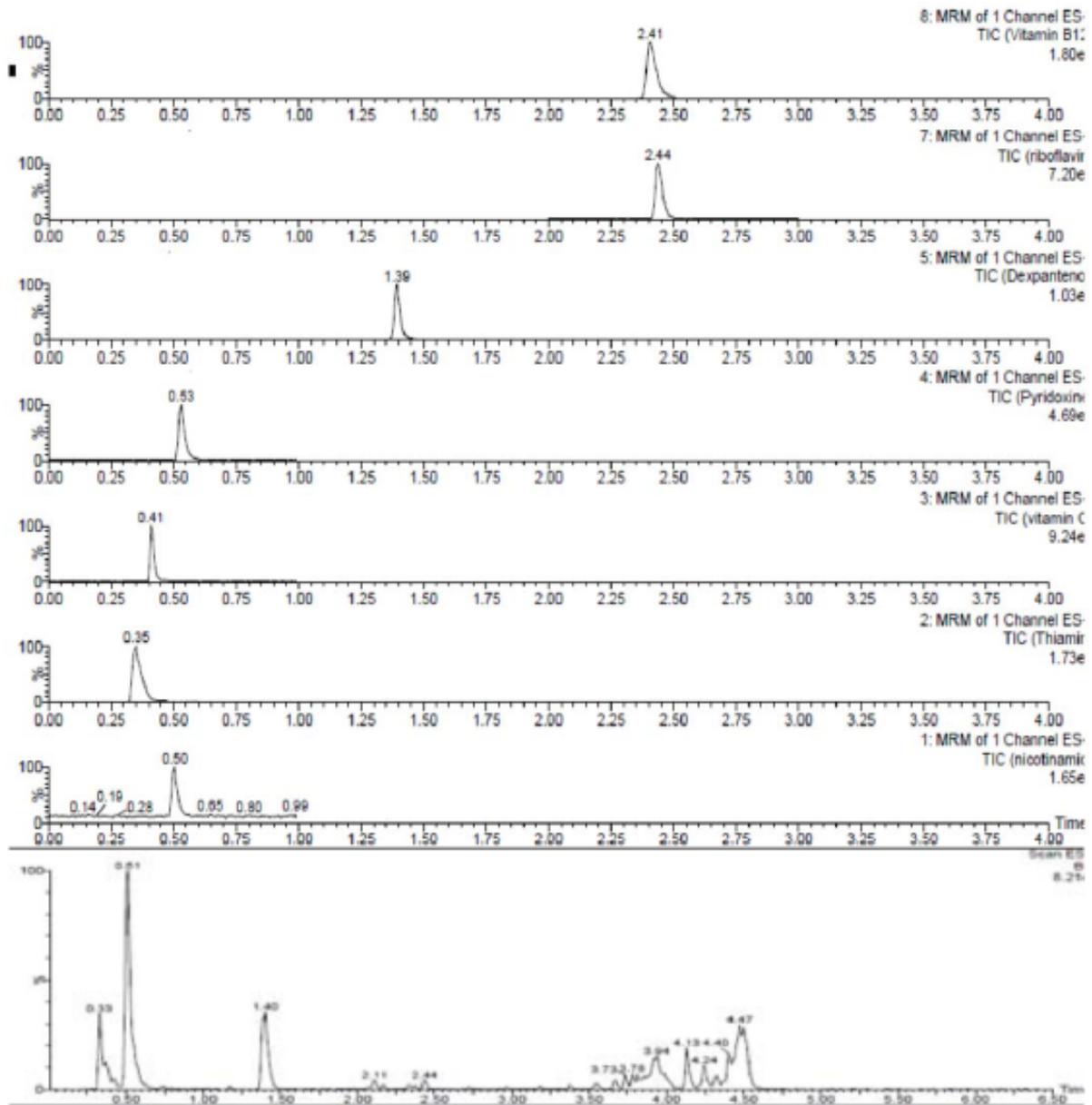
Uji ketegaran adalah ukuran kemampuan prosedur untuk tetap bertahan dan tidak terpengaruh oleh keragaman kecil yang disegaja pada parameter prosedur yang terdapat dalam dokumen. Yang harus diperhatikan dalam uji ketegaran adalah ketabilan larutan, perbedaan peralatan dan perbedaan analisis. Uji ketegaran dapat dilakukan dengan memberikan perubahan pH larutan dan suhu kolom.

Tabel 5.7. Penetapan kadar analit vitmin dengan modifikasi suhu dan pH

Vitamin	Kadar rata-rata (%) n=2					
	Suhu (°C)			pH Fase Gerak		
	38	40	42	2,7	2,8	2,9
B1	101,36	98,96	99,09	111,69	110,15	113,45
B2	118,67	120,41	123,17	101,22	103,93	101,12
B3	121,12	124,06	126,20	112,64	111,99	112,85
B5	109,11	109,80	109,14	110,67	109,80	110,87
B6	143,88	147,21	146,74	109,82	108,80	108,86
B12	143,88	147,2`	146,74	157,49	158,89	156,67
C	83,01	83,93	81,10	79,28	83,93	84,49

6. Hasil Analisa

Diperoleh bentuk kromatogram dari setiap analit yang dianalisa secara simultan dengan kondisi analisis terpilih. Penetapan kadar sampel menggunakan teknik preparasi dan kondisi analisis yang telah dioptimasi dan tervalidasi.

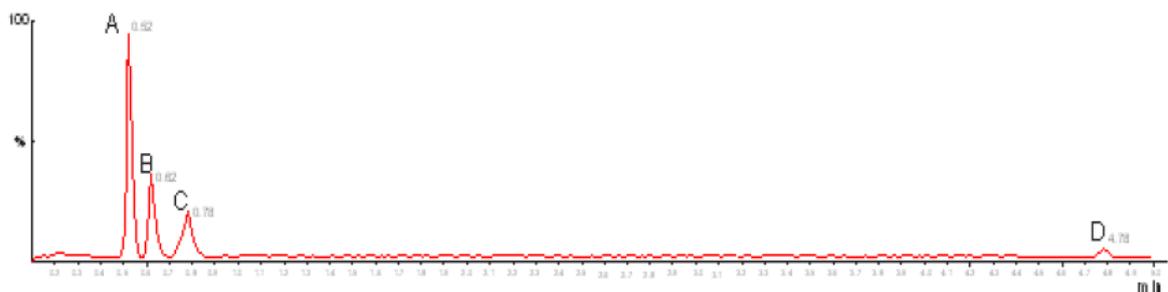


Gambar 5.2. Kromatogram pemisahan tujuh vitamin. Waktu retensi (menit) sianokobalamin adalah 2,41; riboflavin adalah 2,44; dexpanthenol 1,39; pyridoxine adalah 0,53; asam askorbat adalah 0,41; tiamin hidroklorida adalah 0,35 dan niktinamida adalah 0,5.

B. ANALISA SEDIAAN OBAT

Liquid chromatography tandem-mass spectrometry (LC-MS/MS) merupakan teknik analisis yang menggabungkan kemampuan pemisahan fisik dari kromatografi cair dengan spesifitas deteksi spektrometri massa. Teknik analisis ini dapat memberikan informasi tentang berat molekul, struktur, identitas dan kuantitas komponen sampel tertentu. Sehingga LC-MS/MS dapat menganalisis lebih luas komponen senyawa termal labil, polaritas tinggi atau bermassa molekul tinggi.

Teknik LC-MS/MS dapat sangat membantu analisis sediaan farmasi yang diproduksi secara bersamaan dalam satu formula, sediaan yang sangat polar, dan analisis senyawa metabolitnya. Salah satunya adalah analisis pirazinamid dan etambutol dalam sediaan *fixed dose combination* (FDC). Kondisi MS meliputi: suhu kolom 35 °C, suhu autosampler 4 °C, kecepatan alir 0,2 mL/menit. Electrospray ionization (ESI) diatur pada model positif (ES+) dengan nitrogen sebagai nebulizer. Turbo gas diatur pada suhu 500 °C dan tegangan jarum ESI pada 5500V. Kuantifikasi analit menggunakan *multiple reaction monitoring* (MRM), dengan rasio m/z pirazinamid 123,9 > 80,9 dan etambutol 205,01 > 115,91. Komposisi fase gerak asam formiat 0,1% dalam asetonitril-asam formiat 0,1% dalam air (50:50). Diperoleh profil kromatogram seperti gambar 5.3.



Gambar 5.3. Profil kromatogram hasil Optimasi Metode Analisis Pirazinamid dan Etambutol dalam Sediaan FDC. Puncak A dan D pengotor, Puncak B = etambutol; Puncak C=pirazinamid.

Beberapa analisis obat lain menggunakan LC-MS/MS dapat dilihat pada BAB 7.

BAB 6

PEMANFAATAN KCKUT-SM/SM UNTUK ANALISA OBAT DALAM SAMPEL BIOLOGIS

Sampel biologis merupakan sampel yang diambil dari sebagian tubuh untuk tujuan analisis. Sedangkan matriks biologis adalah bahan-bahan lain di luar analit dalam sampel biologis.

Bioanalisis merupakan ilmu terapan dari kimia analisis yang menganalisis secara kualitatif maupun kuantitatif suatu analit maupun metabolit dalam sampel biologis. Bioanalisis memberikan dukungan yang besar terhadap kemajuan berbagai aspek ilmu yang lain, diantaranya untuk pengembangan obat baru, studi bioavailabilitas dan bioekivalensi, uji toksikokinetik, uji farmakokinetik dan uji farmakodinamik. Bioanalisis juga memberikan dukungan dalam pengujian penyalahgunaan obat dan farmasi forensik.

Sampel biologis yang paling umum digunakan untuk bioanalisis obat adalah plasma, serum, darah total, dan saliva. Penentuan kuantitatif kadar obat dalam suatu sampel biologis merupakan hal yang sangat penting dalam evaluasi dan interpretasi data Pengembangan Obat (Uji pra klinis dan klinis obat baru) Farmakokinetika, Monitoring Obat. Penggunaan KCKUT-SM/SM ditambah dengan prosedur ekstraksi yang optimal dapat menjadi solusi yang kompetitif untuk menganalisis kadar analit dan metabolit yang kompleks di dalam sampel biologis.

Kromatografi cair kinerja ultra tinggi tandem-spektrometri massa (KCKUT-SM/SM) atau *ultra performance liquid chromatography tandem-mass spectrometry* (UPLC-MS/MS) merupakan instrumen analisis kombinasi antara kromatografi cair sebagai pemisah komponen-komponen analit dalam sampel, dengan spektrometri massa sebagai detektor. Kolom dari kromatografi cair akan memisahkan hampir semua campuran yang bisa dilarutkan, sedangkan spektrometri massa akan mengionisasi *peak* yang dipisahkan dan menghasilkan bera tmolekul untuk setiap komponen dari *peak* tersebut. Sistem LC-MS/MS dapat menghasilkan pola fragmentasi yang khas dari *ion parent* dan dapat memisahkan *ion daughter* untuk proses identifikasi dan kuantifikasi. Aplikasi LC-MS/MS lebih luas dibandingkan dengan kromatografi gas-spektrometri massa (GC-MS) karena penerapan UPLC-MS/MS tidak terbatas pada molekul volatil saja (biasanya dengan berat molekul di bawah 500 Da), namun mampu mengukur analit yang sangat polar dan persiapan sampel cukup sederhana tanpa adanya teknik derivatisasi. Kromatografi cair tandem-spektrometri massa juga memberikan

fleksibilitas lebih tinggi dibandingkan *immunoassay* karena pengujian dengan LC-MS/MS dapat dikembangkan sendiri dan informasi yang lebih lengkap dari hasil sekali *running* baik data kualitatif maupun kuantitatif, terutama untuk data dalam pengujian klinis secara rutin. Penggunaan LC-MS/MS memberikan spesifitas yang lebih baik untuk menganalisis senyawa induk dengan adanya gangguan metabolit, terlebih kadar senyawa induk lebih kecil dari metabolitnya.

Dalam UPLC-MS/MS sampel dikarakterisasi 2 kali, pertama dipisahkan secara spesifik melalui waktu retensi kemudian ditentukan rasio masa terhadap muatan (m/z) tiap komponen dari sampel. Kromatografi cair tandem-spektrometri massa memiliki keunggulan dalam resolusi, kecepatan, penurunan penggunaan pelarut, spesifik dan sensitif untuk aplikasi analisa analit dari sampel dalam cairan biologis.

A. ANALISA SAMPEL BIOLOGIS

Penentuan kadar suatu obat dalam sampel biologis merupakan hal yang kompleks disebabkan sampel biologis pada umumnya merupakan suatu matriks yang kompleks. Jika suatu obat atau metabolitnya dalam sampel biologis dapat dianalisa langsung tanpa perlu dilakukan perlakuan awal terhadap sampel yang diperoleh maupun pemisahan obat atau metabolit yang ditentukan maka hal ini merupakan suatu hal yang menguntungkan. Akan tetapi perlakuan awal sampel maupun isolasi obat atau metabolit yang akan ditentukan dari matriks biologis yang diperoleh harus dilakukan.

Hal yang perlu diperhatikan dalam pemilihan perlakuan awal sampel maupun metode untuk memisahkan atau mengisolasi obat dan/atau metabolitnya adalah tahapan dari prosedur yang dipilih harus seminimal mungkin untuk menghindari kehilangan Analit (sebagai hasil ekstraksi) dari obat atau metabolit (di dalam sampel) yang akan ditentukan. Semakin panjang tahapan prosedur untuk perlakuan awal maupun untuk memisahkan atau mengisolasi obat atau metabolitnya makin besar kemungkinan hilangnya obat atau metabolit yang akan ditentukan sepanjang prosedur yang dilakukan.

Darah merupakan sampel biologis yang paling umum digunakan dan mengandung berbagai komponen seluler seperti sel darah merah, sel darah putih, platelet, dan berbagai protein seperti albumin dan globulin. Pada umumnya bukan darah utuh (*whole blood*) tetapi plasma ataupun serum yang digunakan untuk penentuan kadar obat. Serum diperoleh dengan membiarkan darah untuk menggumpal dan supernatant yang dikumpulkan setelah sentrifugasi adalah serum. Sedangkan plasma diperoleh dengan penambahan antikoagulan

pada darah yang diambil dan supernatant yang diperoleh setelah sentrifugasi merupakan plasma. Jadi, plasma dan serum dibedakan dari protein yang dikandungnya.

Tahap-tahap Analisis Sampel Biologis

1. Preparasi sampel (pengendapan protein)

Kandungan protein dalam sampel biologis yang akan dianalisa menyebabkan dibutuhkan suatu tahap perlakuan awal dan/atau penyiapan sampel sebelum penentuan kadar obat dapat dilakukan. Pengendapan protein dilakukan dengan denaturasi protein. Denaturasi dapat dilakukan akibat adanya perubahan pH, temperature, dan penambahan senyawa kimia. Cara denaturasi protein yang umum digunakan adalah dengan penambahan *precipitating agent* (TCA, ammonium sulfat, zink sulfat, pelarut organik)

a. Trikloro asetat (TCA)

Mekanisme TCA 10 % sebagai agen presipitasi yakni ion negatif dari TCA akan bergabung dengan protein yang sedang berada pada kondisi sebagai kation (pH larutan dalam kondisi asam hingga pH isoelektrik protein) hingga membentuk garam protein.

Beberapa garam yang dihasilkan tersebut tidak larut dengan demikian metode ini dapat digunakan untuk memisahkan protein dari larutan. Umumnya agen presipitasi akan melarut sedangkan garam protein akan terdekomposisi dengan adanya penambahan basa (membentuk protein yang bermuatan negatif atau anionic protein).

TCA umumnya digunakan untuk protein-protein yang telah berada dalam keadaan bebas pada filtrat darah dan pada pemeriksaan awal materi biologis. Bila protein belum berada dalam kondisi yang bebas maka perlu penambahan asam tanin, dimana tanin akan bereaksi dengan protein kulit membentuk protein tanat yang tidak larut.

b. Ammonium Sulfat

Larutan $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ merupakan garam dengan konsentrasi tinggi. Mekanisme $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ sebagai anti presipitasi protein dikenal sebagai *salting out*, yakni penurunan kelarutan protein dengan adanya peningkatan konsentrasi garam. Sifat ini terjadi karena kemampuan ion garam untuk terhidrasi dan terjadi kompetisi antara garam dengan molekul protein untuk mengikat air. Sehingga interaksi antara air dengan gugus polar dari protein menurun, mengakibatkan pengendapan protein tersebut.

c. Zink sulfat-Natrium hidroksida

Mekanisme $\text{ZnSO}_4 - \text{NaOH}$ sebagai agen presipitasi adalah NaOH akan memberikan suasana basa pada larutan dan mengakibatkan protein berada dalam keadaan ion negatif atau anion. Anion protein ini akan berikatan dengan ion positif yang berasal dari logam berat yakni Zn^{2+} membentuk logam protein yang tidak larut. Logam berat juga akan merusak struktur sekunder dan tersier dari protein. Ikatan dari ion logam bermuatan positif akan menurunkan kelarutan protein. Ion logam akan berkompetisi dengan proton-proton pada larutan untuk berikatan dengan asam amino. Semakin kuat ikatan ion-ion logam untuk menggantikan ikatan oleh proton-proton akan menurunkan pH larutan. Kombinasi dari perubahan pI, penurunan pH (baik akibat ion logam maupun NaOH) akan menyebabkan protein mengendap.

d. Pelarut Organik

Pelarut organik secara umum dapat digunakan untuk mengendapkan protein tergantung dari ukuran molekul, besar molekul dan konsentrasi pelarut organik tersebut. Pelarut yang digunakan adalah pelarut yang dapat bercampur dengan air seperti; Metanol, Etanol, dan Asetonitril. Pengendapan ini berkaitan dengan titik isoelektrik (pI) protein, dimana semakin jauh dari titik isoelektrik maka kelarutan akan semakin meningkat dan semakin dekat dengan titik isoelektrik maka kelarutan akan semakin menurun. Penambahan larutan organik pada larutan protein dalam air akan menurunkan K_d (Konstanta Dielektrik) pelarut/air yang meningkatkan tarikan antara molekul-molekul bermuatan dan memfasilitasi interaksi elektrostatik protein.

Selain itu pelarut organik ini juga akan menggantikan beberapa molekul air di sekitar daerah hidrofob dari permukaan protein yang berasosiasi dengan protein sehingga menurunkan konsentrasi air dalam larutan dengan demikian kelarutan protein akan menurun dan memungkinkan terjadinya pengendapan.

Metanol: volume sama banyak atau 2x dari volume plasma

Etanol: volume sama banyak atau 2x dari volume plasma. Dibandingkan metanol, etanol lebih efektif karena semakin panjang rantai alkohol semakin mudah mendenaturasi protein.

Asetonitril: volume sama banyak dengan volume plasma digunakan, Asetonitril merupakan pelarut terbaik yang memberikan presentasi pengendapan tertinggi dengan rasio volume terhadap plasma terendah.

2. Ekstraksi sampel (Ekstraksi cair-cair, Ekstraksi fase padat)

Ekstraksi cair-cair: Pemisahan didasarkan perbedaan kelarutan senyawa pada pelarut organik & air. Parameter : koefisien partisi (K)

$$K = C_1 / C_2 * (\text{Jumlah volume})$$

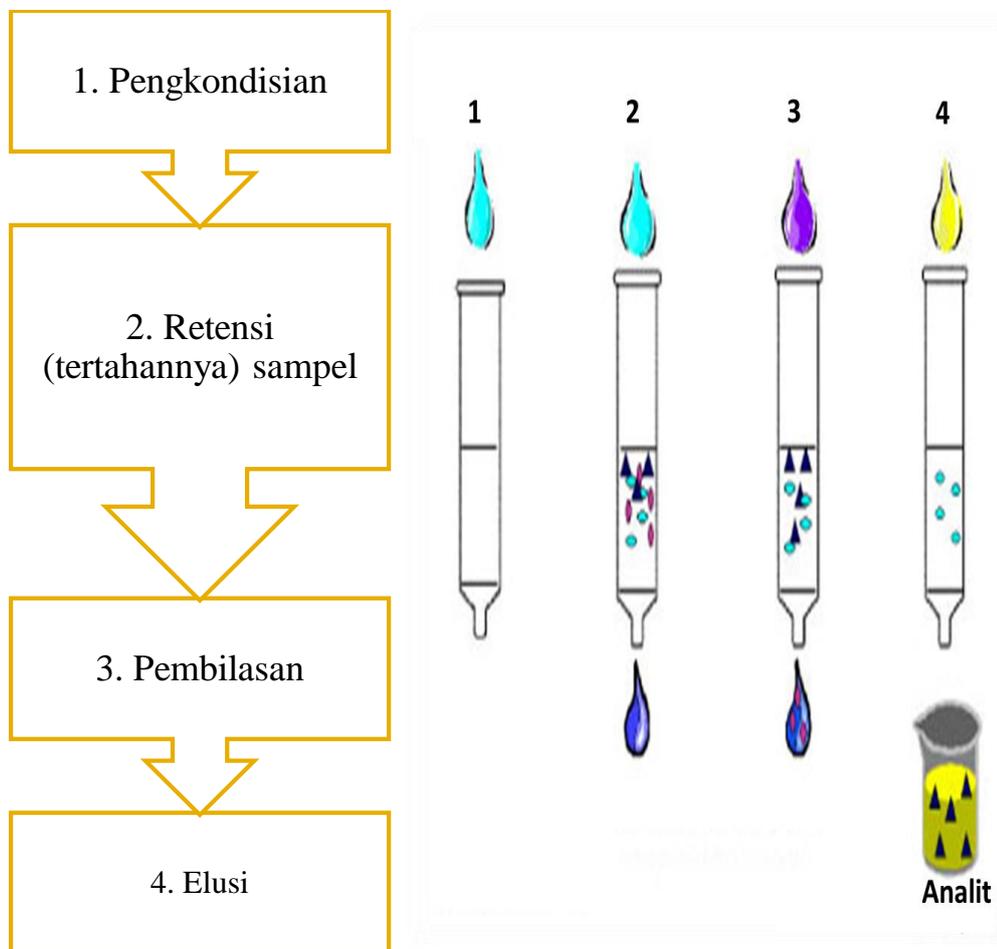
C_1 = konsentrasi awal

C_2 = konsentrasi yang diperoleh setiap ekstraksi

Faktor yang mempengaruhi koefisien partisi; pelarut yang digunakan, pH, dan derajat ionisasi.

Ekstraksi fase padat: Teknik ekstraksi fase padat/*solid phase extraction* (SPE) digunakan untuk pra-perlakuan sampel atau clean-up sampel-sampel yang kotor seperti sampel dengan kandungan matriks yang tinggi seperti garam-garam, protein, polimer, resin dll.

Efisiensi SPE dapat memperoleh recovery yang tinggi (>99 %).



Gambar 6.1. Tahapan-tahapan ekstraksi fase padat

3. Penguapan sampel (Bila diperlukan)
Dilakukan untuk meningkatkan kadar analit yang terekstraksi dari matriks sampel. Menggunakan Turbovop evapor, diuapkan pada suhu tertentu yang dialiri gas Nitrogen agar analit tidak terhidrolisis). Diuapkan sampai kering kemudian residu direkonstitusi kembali dengan eluen yang sesuai.
4. Analisis dengan metode terpilih
Sejumlah aliquot dari hasilpreparasi dianalisis menggunakan KCKUT-SM/SM dengan kondisi analisis terpilih.

Tabel 6.1. Aplikasi KCKUT-SM/SM dalam uji klinik pada sampel biologis (Leung & Fong, 2013)

Analit	Matrik biologis	Preparasi sampel	Mode ionisasi
Drug monitoring and toxicology			
Cocaine, benzoylecgonine, MDMA, MDEA, MDA, methamphetamine, diacetylmorphine, 6-MAM, morphine, and $\Delta(9)$ -THC	Urine	LLE	ESI (+)
Cyclosporine, tacrolimus, sirolimus, everolimus	DBS	LE	ESI (+)
Benzodiazepines	Urine	LLE	ESI (+)
Synthetic cannabinoid metabolites	Urine	Salting-out assisted LLE	ESI (+)
γ -Hydroxybutyrate and metabolites	Blood	SPE	ESI (+/-)
Mevalonic acid	Serum	SPE	ESI (+)
Drugs of abuse	Oral fluid	SPE	ESI (+)
Common drugs involved in drug-induced seizures: bupropion, citalopram, cocaine, diphenhydramine, isoniazid, lamotrigine, methamphetamine, MDMA, quetiapine, tiagabine, tramadol, and venlafaxine	Serum/plasma	SPE	ESI (+)
Iohexol	Serum	PPT	ESI (+)
Endocrinology			
Testosterone	Serum	LLE	ESI (+)
Synthetic glucocorticoids: prednisolone, dexamethasone, betamethasone, and beclomethasone dipropionate	Urine	LLE	ESI (+)
Androgenic steroids	Urine	LLE	ESI (+)
3-Methoxytyramine, normetanephrine and metanephrine	Plasma	SPE	ESI (+)
Metanephrine	Plasma	SPE	ESI (+)
Cortisol and dexamethasone	Plasma	SPE	ESI (+)
Metanephrine and catecholamines	Urine	SPE	ESI (+)
Aldosterone	Plasma	PPT followed by SPE	ESI (-)
Testosterone	Serum	PPT	ESI (+)
Inborn errors of metabolism			
L-Arginine, ADMA, SDMA, L-citrulline, L-ornithine, and L-proline	Plasma	LLE	ESI (+)
α -Glucosidase, α -galactosidase A, and α -L-iduronidase	DBS	LLE	ESI (+)
Alloisoleucine and branched amino acids	DBS	LE	ESI (+)
Enzyme activity for lysosomal storage disorders	DBS	LE	ESI (+)
5-Aminolevulinic acid and porphobilinogen	Urine, plasma	SPE	ESI (+)
Acylglycine	Urine	SPE	ESI (+)
N-Acetylgalactosamine-6-sulfate sulfatase	DBS	LE followed by SPE	ESI (+)
Carnitine and acylcarnitine	Urine, blood, plasma, muscle	LE followed by SPE	ESI (+)
5mTHF, hmTHF, FA, 5fTHF, pABG, and apABG	Serum	PPT	ESI (+)
Lipids and lipoproteins			
Phosphatidylethanol	Whole blood	LLE	ESI (-)
Sphingosine 1-phosphate, sphinganine 1-phosphate, and lysophosphatidic acid	Plasma	LLE	ESI (-)
Apolipoprotein A-1 and apolipoprotein B	Plasma	LE followed by SPE	ESI (+)
Proteomics and protein markers			
Peptide	Plasma	SPE	ESI (+)
Cholinesterase activity	Serum	PPT	ESI (+)
Choline	Plasma and whole blood	PPT	ESI (+)
High density lipoprotein	Plasma	Ultra-centrifugation, trypsin digestion	ESI (+)

B. VALIDASI METODE BIOANALISIS

Validasi metode bioanalisis dilakukan dengan tujuan agar metode yang digunakan pada analisis senyawa dalam matriks biologi dapat dipercaya dalam mengkuantifikasi analit. Validasi ini bertujuan untuk menjamin metode yang digunakan memberikan hasil yang cermat dan dapat dipercaya dalam menentukan konsentrasi analit dalam matriks biologis tertentu, seperti darah, serum, plasma, urin, atau air liur.

Validasi metode dapat dibagi menjadi 3, yaitu:

1. Validasi Total (*Full Validation*) Validasi ini penting dilakukan ketika melaksanakan atau mengembangkan metode bioanalisis untuk pertama kali atau untuk senyawa obat baru (*New Drug Entity*). Validasi total harus dilakukan untuk setiap pengujian menggunakan matriks biologis.
2. Validasi Parsial (*Partial Validation*) Validasi parsial adalah validasi yang dimodifikasi terhadap metode bioanalisis yang telah valid. Validasi parsial dapat dilakukan mulai dari akurasi dan presisi sampai dilakukan mendekati validasi total.
3. Validasi Silang (*Cross Validation*) Validasi silang merupakan perbandingan terhadap parameter validasi ketika dua atau lebih metode bioanalisis digunakan. Contoh dari validasi ini dapat digambarkan sebagai situasi dengan metode bioanalisis yang telah valid dianggap sebagai referensi dan metode bioanalisis revisi sebagai pembandingnya.

Karakteristik utama dari metode bioanalisis untuk memastikan dan menjamin keandalan hasil analisis, Parameter validasi untuk bioanalisis menurut *Guideline European Medicines Agency* (2011) meliputi; selektivitas, *carry-over*, penentuan batas kuantitasi lebih rendah, linearitas, akurasi, presisi, efek matriks, integritas pengenceran, dan stabilitas.

a. Selektivitas

Merupakan suatu kemampuan metode bioanalisis untuk mengukur dan membedakan analit yang diuji dan baku dalam yang digunakan dengan adanya komponen yang terdapat dalam sampel. Selektivitas dilakukan dengan menggunakan matriks biologis dari sedikitnya enam sumber yang berbeda. Matriks dari masing-masing individu dianalisis pada blangko kosong tanpa analit dan baku dalam, kemudian setiap matriks mengandung analit pada konsentrasi LLOQ (*Lower Limit of Quantification*) dan baku dalam. Diamati interferensinyaterhadap senyawa pengganggu dalam waktu retensi analit dan baku dalam. Syarat diterima parameter ini adalah apabila respon yang diperoleh tidak lebih besar dari 20 % untuk LLOQ analit dan tidak lebih besar Dari 5 % pada baku dalam.

b. *Carry-over*

Parameter yang dilakukan untuk melihat adanya komponen yang terbawa setelah penyuntikkan sampel pada konsentrasi tinggi atau kurva kalibrasi pada batas tertinggi (*Upper Limit of Quantification/ULOQ*). Pelaksanaan *carry-over* adalah dengan menyuntikkan blangko kosong setelah penyuntikan sampel dengan konsentrasi tinggi. Syarat diterima parameter ini adalah respon analit tidak lebih besar dari 20 % LLOQ analit dan 5 % untuk baku dalam.

c. *Lower Limit of Quantification (LLOQ)*

Merupakan konsentrasi terendah dari analit pada sampel yang masih terukur secara kuantitatif dan memenuhi persyaratan akurasi dan presisi. Respon analit pada LLOQ seharusnya 5 kali dari respon sampel blangko. Dalam studi bioekivalensi, nilai LLOQ tidak lebih besar dari 5 % konsentrasi maksimum analit dalam tubuh (*Cmax*).

d. Kurva Kalibrasi

Konsentrasi analit selama proses pengujian harus memenuhi rentang dari kurva kalibrasi yaitu batas *lower limit of quantification (LLOQ)* dan *upper limit of quantification (ULOQ)*. Kurva kalibrasi terdiri dari sampel blangko (matriks sampel tanpa analit dan baku dalam), sampel *zero* (matriks sampel dengan baku dalam), dan minimal enam titik sampel *nonzero* (matriks sampel dengan analit dan baku dalam). Parameter kurva kalibrasi berupa persamaan regresi linier dan koefisien relasi. Konsentrasi pada perhitungan ulang dari standar kurva kalibrasi harus memenuhi syarat (%diff) yang terukur dari analit tidak lebih dari $\pm 15\%$ untuk semua konsentrasi kecuali LLOQ. Sedangkan syarat untuk LLOQ adalah tidak lebih dari $\pm 20\%$.

e. Akurasi dan Presisi

Akurasi merupakan metode analisis yang menggambarkan kedekatan nilai yang diperoleh dengan metode terhadap nilai konsentrasi analit yang sebenarnya. Sedangkan presisi menggambarkan kedekatan dari keterulangan pengukuran setiap individu analit. Akurasi dan presisi dilakukan dengan menguji analit pada konsentrasi LLOQ dan *quality control samples (QC sampel)*. Larutan QC terdiri dari *quality control low (QCL, 3 kali LLOQ)*, *quality control medium (QCM, 30-50% kisaran konsentrasi kurva kalibrasi)* dan *quality control high (QCH, sedikitnya 75% dari ULOQ)*. Penagamatan akurasi dan presisi dilakukan secara intra hari dan antar hari dan minimal sebanyak 5 replika setiap konsentrasi. Akurasi ditunjukkan dengan nilai

%diff sedangkan presisi ditunjukkan dengan nilai %KV. Persyaratan akurasi dan presisi tidak lebih dari $\pm 15\%$ untuk sampel QC dan $\pm 20\%$ untuk sampel LLOQ.

f. Integritas Pengenceran

Parameter ini dilakukan dengan tujuan untuk melihat bahwa pengenceran sampel dalam analisis memengaruhi akurasi dan presisi atau tidak. Integritas pengenceran dilakukan dengan mencampur matriks dengan konsentrasi analit di atas konsentrasi ULOQ dan mengencerkan campuran ini dengan matriks blangko menjadi $\frac{1}{2}$ dan $\frac{1}{4}$ kalinya (minimal 5 kali penentuan per faktor pengenceran). Kemudian diamati akurasi dan presisi, dengan syarat tidak melebihi $\pm 15\%$.

g. Efek Matriks

Parameter ini dilakukan jika metode yang digunakan adalah spektrometer massa. Uji ini menggunakan minimal enam sumber matriks blangko dari sampel individu. Pada masing-masing analit dan baku dalam, faktor matriks hendaknya dihitung pada setiap sumber matriks dengan cara mengukur rasio luas puncak matriks dengan analit terhadap luas puncak larutan analit tanpa matriks. Baku dalam yang ternormalisasi faktor matriks diukur dengan membagi faktor matriks pada analit oleh faktor matriks pada baku dalam. Koefisien variasi diukur pada 6 sumber matriks dan tidak lebih besar dari 15%. Penentuan ini dilakukan pada konsentrasi rendah (3 kali LLOQ) dan konsentrasi tinggi (mendekati ULOQ).

h. Stabilitas

Uji stabilitas dilakukan dengan tujuan untuk memastikan bahwa setiap langkah yang dilakukan dan kondisi penyimpanan selama preparasi tidak memengaruhi konsentrasi analit. Uji stabilitas dilakukan dengan menggunakan larutan QCL dan QCH yang dianalisis dengan segera setelah diekstraksi dan setelah disimpan pada kondisi penyimpanan yang sesuai. Sampel QC dianalisis terhadap kurva kalibrasi dan diperoleh dari campuran standar kalibrasi. Persyaratan hasil pengukuran uji stabilitas adalah tidak lebih dari $\pm 15\%$ dari konsentrasi sebenarnya.

Beberapa uji stabilitas yang dilakukan:

1. Stabilitas larutan stok dan larutan kerja analit dan baku dalam Uji ini dilakukan pada satu konsentrasi.
2. Stabilitas *freeze-thaw* analit dalam matriks Uji ini dilakukan dengan menggunakan larutan QC yang disimpan dan dibekukan pada *freezer* kemudian dicairkan pada temperatur kamar.

Setelah mencair secara keseluruhan sampel dibekukan kembali pada temperatur kamar sedikitnya 12 jam kemudian di cairkan kembali. Jumlah siklus *freeze-thaw* yang dilakukan harus sama atau melebihi dari siklus beku/cair pada pengujian sampel.

3. Stabilitas jangka pendek analit dalam matriks pada temperatur kamar atau temperatur analisis sampel. Sampel dianalisis setelah dibiarkan pada temperatur kamar selama 0-24 jam (ditentukan berdasarkan waktu yang dibutuhkan untuk mengelola sampel) kemudian dianalisis.
4. Stabilitas jangka panjang analit dalam matriks disimpan dalam *freezer*. Lamanya penyimpanan untuk uji stabilitas jangka panjang harus melebihi durasi waktu pengumpulan sampel pertama sampai analisis sampel terakhir pada pengujian.
5. *Post-preparative stability*, stabilitas dari sampel yang telah diproses atau preparasi. Termasuk stabilitas *autosampler*, uji dilakukan pada sampel setelah dipreparasi dan disimpan dalam temperatur *autosampler* pada 0 jam dan 24 jam penyimpanan.

BAB 7

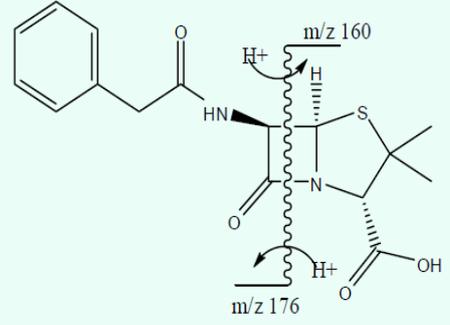
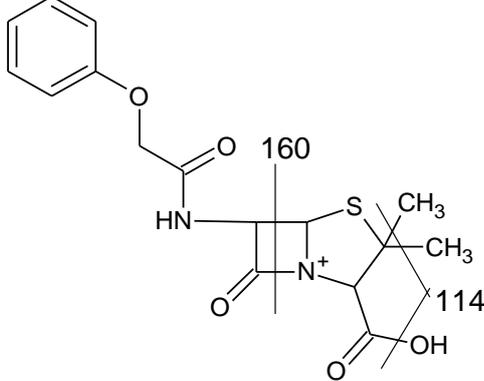
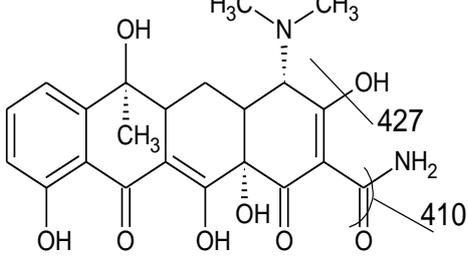
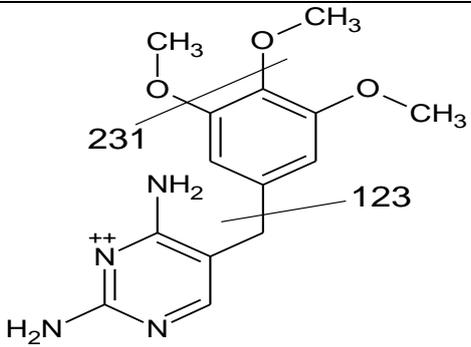
ION INDUK DAN ION PRODUK MOLEKUL OBAT

Beberapa sediaan obat yang telah di analisis menggunakan kromatografi cair kinerja ultra tinggi-tandem spektrometer massa diberikan pada table berikut ini:

Tabel 7.1. Rasio m/z senyawa antibiotik menggunakan KCKUT- SM/SM

Senyawa Antibiotik	Mode ESI	Ion Induk	Ion Produk 1	Ion Produk 2	Fragmentasi
Ciprofloksasin	+	332	314	288	
Doksisiklin	+	445	428	410	
Klindamisin	+	425	377	126	
Kloramfenikol	-	323	152	176	

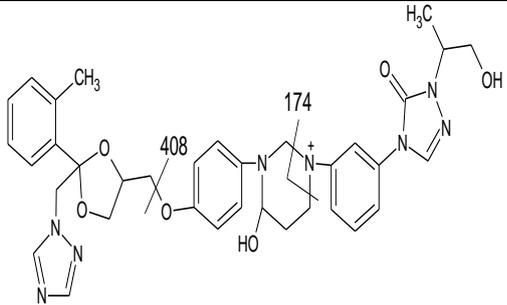
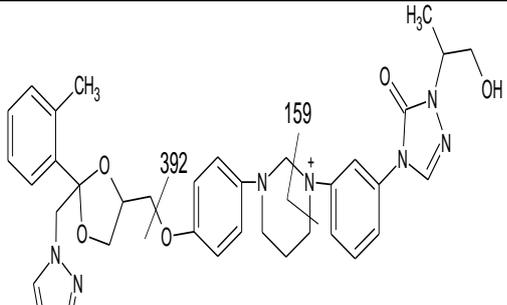
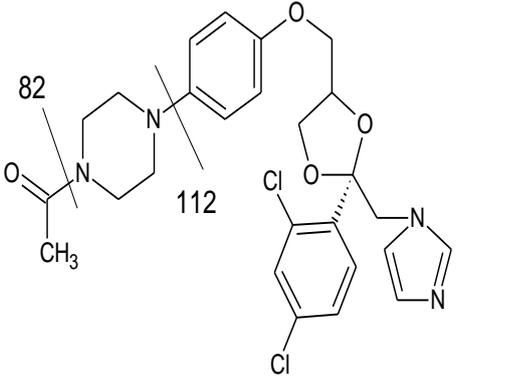
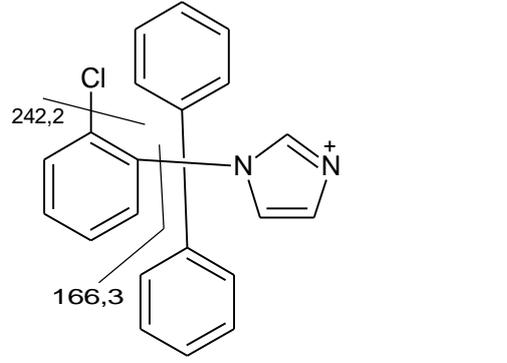
Klortetrasiklin	+	479	444	462	
Levofloksasin	+	362,1	261,1	318,2	
Nafsillin	+	432	171	199	
Oksasillin	+	419	144	243	
Oksitetrasiklin	+	461	426	443	

Penicillin G	+	352	160	176	
Penicillin V	+	368	114	160	
Tetracyclin	+	445	410	427	
Trimetoprim	+	292	123	231	

Tabel 7.2. Rasio m/z senyawa sulfa menggunakan KCKUT- SM/SM

Senyawa Sulfa	Mode ESI	Ion Induk	Ion Produk 1	Ion Produk 2	Fragmentasi
Sulfadiazin	+	251	156	108	
Sulfaguanidin	+	215	108	156	
Sulfametoksazol	+	254	156	108	
Sulfanilamid	+	173	108	156	
Sulfasoksazol	+	268	108	156	

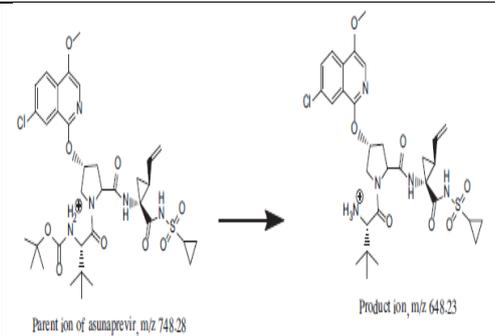
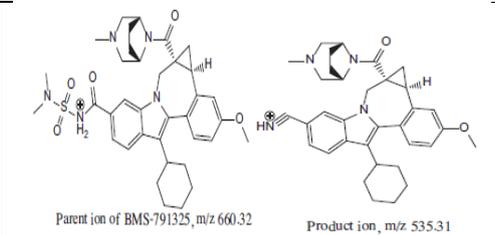
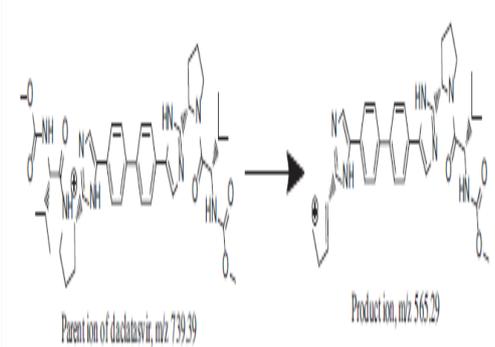
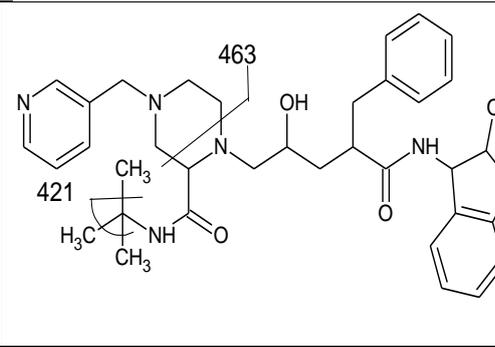
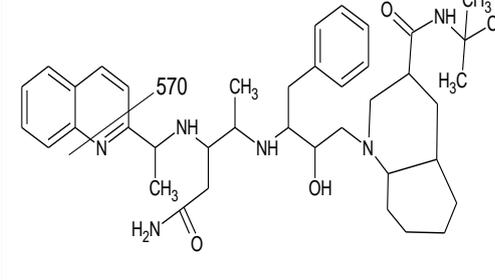
Tabel 7.3. Rasio m/z senyawa antifungi menggunakan KCKUT-SM/SM

Senyawa Antifungi	Mode ESI	Ion Induk	Ion Produk 1	Ion Produk 2	Fragmentasi
Hidroksi Itrakonazol	+	721	408,2	174,2	
Itrakonazol	+	705	392,2	159,1	
Ketokonazol	+	531,1	112,1	82,4	
Klotrimazol	+	277,7	166,3	242,2	

Metronidazol	+	172	128	82	
Mikonazol	+	417,1	160,9	229	

Tabel 7.4. Rasio m/z senyawa antiviral menggunakan KCKUT-SM/SM

Senyawa Antiviral	Mode ESI	Ion Induk	Ion Produk 1	Ion Produk 2	Fragmentasi
Aciklopir	+	261	152	135	
Adefovir	+	274,4	162,3	226,1	

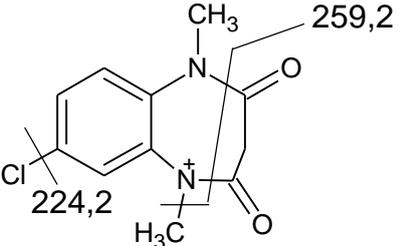
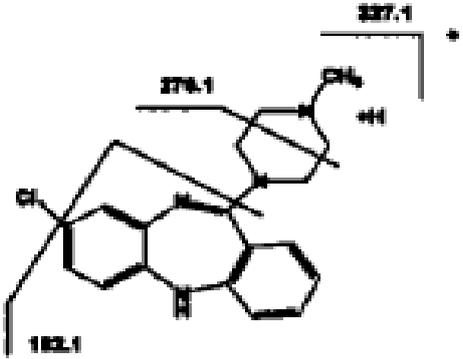
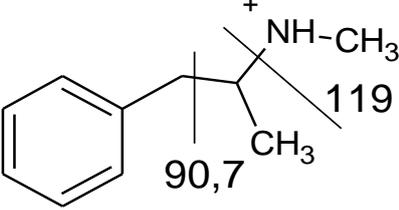
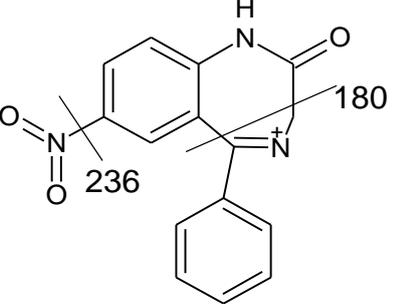
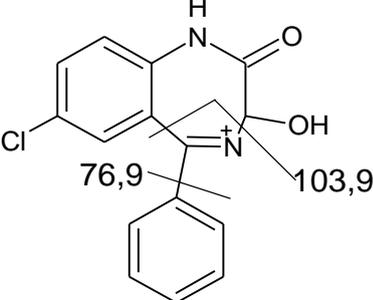
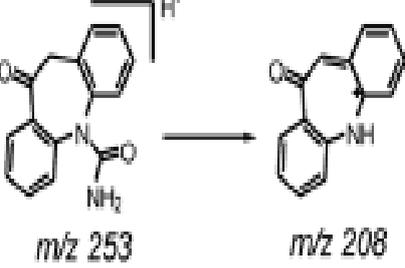
Asunaprevir	+	748,4	648,3		 <p>Parent ion of asunaprevir, m/z 748.28</p> <p>Product ion, m/z 648.23</p>
Beclabuvir	+	660,4	535,3		 <p>Parent ion of BMS-791325, m/z 660.32</p> <p>Product ion, m/z 535.31</p>
Daclatasvir	+	739,4	565,3		 <p>Parent ion of daclatasvir, m/z 739.39</p> <p>Product ion, m/z 565.29</p>
Indinavir	+	614,4	421,3	463,3	 <p>421</p> <p>463</p> <p>614,4</p>
Saquinavir	+	671	570		 <p>570</p> <p>671</p>

Tenofovir	+	288,1	176,1	136,1	<p>m/z 176 ←</p>
-----------	---	-------	-------	-------	-------------------------------

Tabel 7.5. Rasio m/z senyawa Antikonpulsan, Antidepresan, Antiansietas menggunakan KCKUT-SM/SM

Senyawa	Mode ESI	Ion Induk	Ion Produk 1	Ion Produk 2	Fragmentasi
Alprazolam	+	309,2	281,2	205,3	
Amitriptillin	+	278,1	90,8	233,3	
Ampetamin	+	136	90,6	119	

Bromazepam	+	316,2	182,3	209,3	
Despiramin	+	267,2	44	71,8	
Diazepam	+	285,2	154,2	193,3	
Haloperidol	+	376,1	165,1	123,1	
Imipramin	+	281,2	57,7	85,7	

Klobazam	+	301.1	259.2	224.2	
Klozapin	+	327.1	270.1	192.1	
Metamfetamin	+	150	90,6	119	
Nitrazepam	+	282.1	236.2	180.2	
Oksazepam	+	287,2	103,9	76,9	
Okskarbazepin	+	253	208,2	171	

Penfluridol	+	524,2	203,1	109,1	
Penitoin	+	253	182	104	<p>m/z 253 m/z 104</p>
Tetrazeepam	+	289,3	225,5	197,4	
Tioridazin	+	371,1	126,1	91,1	
Zuklopentisol	+	401,1	356,1	271,1	

Karbamazepin	+	253	210		<p>m/z 253 $\xrightarrow{H^+}$ m/z 210</p>
--------------	---	-----	-----	--	---

Tabel 7.6. Rasio m/z senyawa kardiovaskular menggunakan KCKUT-SM/SM

Senyawa	Mode ESI	Ion Induk	Ion Produk 1	Ion Produk 2	Fragmentasi
Amlodipin	+	409,2	294,2	238,1	
Atenolol	+	267,2	145,1	190,2	
Betaxolol	+	308	166	98	
Metoprolol	+	268,2	133,1	191,2	

Propranolol	+	260.2	183.2	116	
Sotalol	+	273.2	255.2	133.1	
Timolol	+	317.2	261.2	244.2	

DAFTAR PUSTAKA

- Agilent. (1998). Basic of LC/MS. www.chem.agilent.com/library...a05296.pdf. diakses tanggal 5 januari 2016.
- American Society for Mass Spectrometry. Available from: (<http://www.asms.org/whatisms/p12.html>).
- Bai-Shen Sun, Ming-Yang Xu, Zheng Li, Yi-Bo Wang, & Chang-Keun Sung. 2012. UPLC-Q-TOF-MS/MS Analysis for Steaming Times-dependent Profiling of Steamed *Panax quinquefolius* and Its Ginsenosides Transformations Induced by Repetitious Steaming. *J Ginseng Res.* 36(3);277-90
- BPOM (Badan Pengawas Obat dan Makanan). (2004). *Pedoman uji bioekuivalensi*. Jakarta: Badan Pengawas Obat dan Makanan RI.
- Creative Proteomic, MALDI-TOF Mass Spectrometry. Available from: <https://www.creative-proteomics.com/technology/maldi-tof-mass-spectrometry.htm>
- EMA (European Medicines Agency). (2011). *Guideline on bioanalytical method validation*. London: Committee for Medicinal Products for Human Use.
- Grebe, S.K.G., & Singh, R.J. (2011). LC-MS/MS in the clinical laboratory - Where to from here?, *Clinical Biochemist Reviews*, 32, 5–31.
- Hoffmann, E., & Stroobant, V. (2007). *Mass spectrometry: principles and application* (3rd Ed.). Chichester: Jhon Wiley & Son Ltd.
- http://www.waters.com/waters/de_DE/Mass-spectrometer-for-easiest-introduction-of-LC-MS-MS-in-the-clinical-laboratory/nav.htm
- <https://www.agilent.com/en/products/mass-spectrometry/lc-ms-instruments>
- http://www.waters.com/waters/en_ID/BEH-%28Ethylene-Bridged-Hybrid%29_Technology/nav.htm?cid=134618172&locale=en_ID
- <http://www.waters.com/webassets/cms/support/docs/WA40001.pdf>
- Jin Wang, Lihong Zhou, Hehua Lei, Fuhua Hao, Xin Liu, Yulan Wang, & Huiru Tang. 2017. Simultaneous Quantification of Amino Metabolites in Multiple Metabolic Pathways

Using Ultra-High Performance Liquid Chromatography with Tandemmass Spectrometry *Scientific Reports*. 7,1423:1-16

Ju-Seop Kang (2012). Principles and Applications of LC-MS/MS for the Quantitative Bioanalysis of Analytes in Various Biological Samples, Tandem Mass Spectrometry-Applications and Principles, Dr Jeevan Prasain (Ed.), ISBN: 978-953-51-0141-3, InTech, Available from: <http://www.intechopen.com/books/tandem-massspectrometry-applications-and-principles/principles-and-applications-of-lc-ms-ms-for-the-quantitativebioanalysis-of-analytes-in-various-biol>

Ju-Seop Kang. (2012). Tandem Mass Spectrometry; Applications and Principles www.intechopen.com

Justin J. J, van der Hooft, Lars Ridder, Michael P.B., & Karl E.V. 2015. Enhanced acylcarnitine annotation in high-resolution mass spectrometry data: fragmentation analysis for the classification and annotation of acylcarnitines. *Bioengineering and Biotechnology*. 3,26:1-15

Kang, J. (2012). Principles and Applications of LC-MS / MS for the Quantitative Bioanalysis of Analytes in Various Biological Samples. In Prasain,J.K (Ed.). *Tandem Mass Spectrometry-Applications and Principles* (pp. 441–492 from 794). Rijeka-Croatia: Intech.

Kazakevich, Y., & Lobrutto, R. (2007). *HPLC for Pharmaceutical Scientists*. New Jersey: Jhon Wiley & Son Inc.

La Marca G. 2014. Mass spectrometry in clinical chemistry: The case of newborn screening. *J Pharm Biomed Anal*. 101;174–82.

Manual Part Agilent 6545, 2014. Available from: <https://www.agilent.com/en/products/mass-spectrometry/lc-ms-instruments/quadrupole-time-of-flight-lc-ms/6545-q-tof-lc-ms>

Manual Part Waters TQD, 2007. Available from: http://www.waters.com/waters/en_US/Xevo-TQD-Triple-Quadrupole-Mass-Spectrometry/nav.htm?cid=134608730&locale=

McMaster, MC. (2005). *LC/MS A Practical User's Guide*. Wiley-Interscience . New Jersey.

Michael Jarvis. 2011. Simultaneous Targeted and Unknown Screening using the 3200 QTRAP® LC/MS/MS System and Cliquid® Software. *AB SCIEX*. Publication number: 3860111-01

Moffat, A.C., Osselton, M.D., Widdop, B., (2011). *Clarke's Analysis of Drugs and Poisons* (4th ed). London: Pharmaceutical Press.

Pitt, J. J. (2009). Principles and applications of liquid chromatography-mass spectrometry in clinical biochemistry, *The Clinical Biochemist Reviews*, 30, 19–34.

- Ragnar Stolt. 2004, Peptide mapping by capillary/standard LC/MS and multivariate. Analysis Molecular Biotechnology Programme, UPTEC X 04 036.
- Skoog, D.A., Holler, F.J., & Crouch, S.R. (2007). *Principles of instrumental analysis (6th ed.)*. Belmont: Thomson Brook/Cole.
- USP 29–NF 24 (2009). *United States pharmacopeia and the national formulary*. Rockville (MD): The United States Pharmacopeial Convention. 182-183.
- Waters. (2003). Introduction of LC-MS/MS. www.waters.lc/ms system.pdf. diakses tanggal 10 Maret 2016.
- Watson J.T. and Sparkman O.D. (2007). *Introduction to Mass Spectrometry: Instrumentation, Applications, and Strategies for Data Interpretation*; Fourth Edition. John Wiley & Sons, Ltd. England
- Yi-Tzu C., Hung S., Wen-Jeng W., Deng-Chyang W., Chao H.K., & Jentaie S. 2015. Biomarker Characterization by MALDI–TOF/MS. *Advances in Clinical Chemistry*. 69: 209-54. <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0065242315000025>



Prof. Dr. A. A. Kd. Harmita, Apt

Lahir di Negara-Bali pada 21 Juli 1951. Menjadi staf Pengajar Bidang Ilmu Kimia Farmasi, yang meliputi Analisis Kimia Farmasi dan Kimia Medisinal di Farmasi UI, sejak tahun 1979. Telah menulis 15 buku antara lain: Analisis Hayati, Analisis Fisikokimia, Kimia Medisinal, dan Analisis Bahan Baku dan Sediaan Farmasi Secara Volumetri dan Spektrometri uv-vis. Telah menghasilkan 21 publikasi internasional terindeks Scopus yang sebagian besar tentang analisis kuantitatif sediaan farmasi.



Prof. Dr. Yahdiana Harahap, M.Si., Apt

Lahir di Tebing Tinggi-Sumatera Utara pada tanggal 12 September 1964. Menajadi staf pengajar pada Bidang Ilmu Kimia Farmasi khususnya Bioanalisis sejak tahun 1991 di Farmasi UI. Telah menghasilkan 34 publikasi internasional terindeks Scopus dan 89 publikasi yang terindeks Google Scholar yang sebagian besar tentang analisis obat dan metabolitnya dalam matriks biologi menggunakan LC-MS/MS.



Dr. Supandi, M.Si., Apt

Lahir di Tangerang-Banten, 19 Juni 1978. Menyelesaikan pendidikan S3 pada tahun 2018 di Fakultas Farmasi UI dibidang Bioanalisis, dengan riset menggunakan instrumentasi HPLC dan LC-MS/MS. Menjadi staf pengajar Bidang Ilmu Kimia Farmasi di Farmasi UHAMKA sejak tahun 2009. Telah menghasilkan 8 publikasi internasional terindeks Scopus.

PT. ISFI PENERBITAN

JL. WIJAYA KUSUMA NO.17-TOMANG

JAKARTA BARAT, 11430

+6221-56943842

ptisfipenerbitan@yahoo.com

SCIENCE & NATURE (U 15+)

ISBN 978-602-17850-7-2



9 786021 785072

Harga P.Jawa Rp. 70.000,-