

## Penetapan Kadar Simultan Deksmetason dan Metilprednisolon dengan Metode Kromatografi Gas-Spektrometri Massa melalui Derivatisasi

SWASONO R. TAMAT<sup>1\*</sup>, ERNAWATI<sup>2</sup>, LINDA ROSALINA<sup>2</sup>,  
SONNY PUJIANTO<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Pusat Radioisotop dan Radiofarmaka, BATAN, Kawasan Puspiptek, Serpong

<sup>2</sup>Laboratorium Pengawasan *Doping*, LABKESDA, DKI Jakarta

<sup>3</sup>Fakultas Farmasi Universitas Pancasila,  
Srengseng Sawah, Jagakarsa, Jakarta 12640

Diterima 4 April 2006, Disetujui 3 Juli 2006

**Abstract:** This investigation is intended to find a simultaneous assay method for glucocorticosteroids declared as doping compound by the International Olympic Committee. Experiments were carried out in the determination of dexamethasone and methylprednisolone in urine matrix by gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS) using various derivatisation reagents, reaction temperature and time. Selection of the best derivatisation reagent was based on the separation of total ion chromatogram (TIC) and appearance of three characteristic ions,  $m/z$  305, 345, 680 or  $m/z$  206, 456, 662 for dexamethasone; and  $m/z$  279, 369, 459 or  $m/z$  147, 424, 644 for methylprednisolone. Dexamethasone and methylprednisolone derivatives in the GC-MS spectra were identified by characteristic ions of  $m/z$  305 (dexamethasone) and  $m/z$  279 (methylprednisolone). The best derivatisation yield was achieved by a combination of TMSI - [BSTFA-TMCS (99:1)] (2:1) reacted at 90°C for 90 minutes, which produced a linear correlation between concentration (0-150 ng/ml) and ratio of quantitation-ion abundance of standard compound/ion abundance of D3-testosterone internal standard with  $r=0.9937$  for dexamethasone and  $r=0.9823$  for methylprednisolone; high precision  $CV=12.14\%$  (dexamethasone) and  $CV=13.87\%$  (methylprednisolone); high recovery for both dexamethasone and methylprednisolone, and LOD values of 4.44ng/ml (dexamethasone) and 1.80ng/ml (methylprednisolone). The method can be used for simultaneous quantitative assay of glucocorticosteroids, and has been validated for ten other glucocorticosteroid compounds.

**Key words:** glucocorticosteroids, dexamethasone, methylprednisolone, D3-testosterone, gas chromatography-mass spectrometry

### PENDAHULUAN

Di era modern seperti sekarang ini, olah raga telah menjadi salah satu kebutuhan manusia untuk menjaga kesehatan tubuh secara alami dan juga sebagai sarana hiburan yang menyenangkan. Dalam olah raga pertandingan terjadi persaingan antar atlet, sehingga pada umumnya atlet terus berusaha memacu kemampuannya agar dapat meraih prestasi yang tinggi. Namun karena persaingan yang ketat tersebut, ada atlet yang menempuh langkah-langkah yang tidak sah dengan menggunakan obat-obatan untuk meningkatkan kemampuan tubuh secara tidak alami. Obat-obatan yang dapat meningkatkan

kemampuan tubuh secara tidak alami tersebut oleh Komite Olimpiade Internasional (*International Olympic Committee*-IOC) telah dilarang penggunaannya oleh atlet, baik di luar pertandingan, masa latihan, maupun selama pertandingan. Penggunaan obat-obatan tersebut dikategorikan sebagai *doping*, yaitu pemakaian suatu zat atau penggunaan suatu metode tertentu yang dikategorikan dalam kelompok zat dan metoda yang terlarang penggunaannya dalam olah raga<sup>(1)</sup>. Obat-obatan yang dilarang penggunaannya oleh atlet antara lain senyawa golongan stimulan, golongan narkotik-analgetik, senyawa anabolik, golongan diuretik, glukokortikosteroid, dan  $\beta$ -blocker<sup>(1)</sup>.

Sejak tahun 2004, glukokortikosteroid juga dikategorikan sebagai senyawa *doping*, yang berarti bahwa penggunaan glukokortikosteroid dengan cara

\* Penulis korespondensi, Hp.08129695600,  
e-mail: swasonotamat@gmail.com

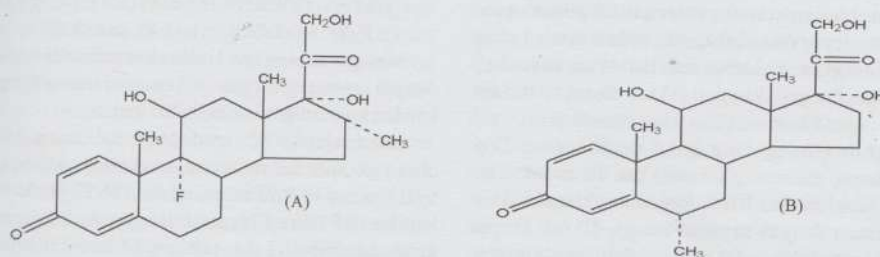
apapun dilarang, misal dengan cara pemberian per oral, per rektal, dan suntikan intravena maupun intramuskular. Cara pemakaian yang lain, seperti: topikal di sekitar anus, telinga, kulit, inhalasi, intra articular, hidung, dan mata, harus disertai surat keterangan dokter<sup>(1)</sup>.

Glukokortikosteroid adalah senyawa antiinflamasi yang kuat, umumnya dipakai untuk mengobati kondisi inflamasi kronik, seperti arthritis, asma, inflamasi sendi, dan reaksi alergi. Senyawa golongan glukokortikosteroid dilarang penggunaannya karena dapat menyebabkan atropi otot, dan memiliki banyak efek samping misalnya euforia, inotropik positif, meningkatkan tekanan darah, meningkatkan kadar gula darah, retensi cairan, osteoporosis, iritasi lambung, depresi, dan psikosis<sup>(2,3)</sup>. Dengan adanya larangan tersebut maka kemungkinan penggunaannya oleh atlet harus diawasi, dengan cara menganalisis secara kuantitatif adanya senyawa tersebut dalam urin atlet.

Penetapan kadar senyawa glukokortikosteroid dalam urin biasanya dilakukan dengan metode kromatografi gas-spektrometri massa<sup>(4)</sup> karena memiliki kepekaan yang tinggi dan kemampuan kuantitasi yang baik. Senyawa dengan kerangka

dasar steroid seperti senyawa steroid anabolik tidak mudah menguap sehingga sulit dianalisis dengan metode kromatografi gas-spektrometri massa secara langsung. Oleh karena itu, senyawa ini dianalisis melalui proses derivatisasi agar lebih mudah menguap, dan dapat menghasilkan rendemen produk derivat dengan ion massa intensitas tinggi dan hasil reaksi yang konsisten<sup>(5)</sup>. Metode kromatografi gas-spektrometri massa dapat digunakan untuk identifikasi senyawa melalui puncak-puncak spektrogram khas (*characteristic ion*) yang dihasilkan, dan puncak yang paling tinggi pada *characteristic ion* dapat digunakan untuk tujuan kuantitatif dan disebut ion kuantitasi<sup>(6)</sup>.

Penelitian ini dilakukan untuk memperoleh satu sistem penetapan kadar senyawa golongan glukokortikosteroid menggunakan metode kromatografi gas-spektrometri massa melalui reaksi derivatisasi dan optimalisasi reaksi dengan variasi senyawa pereaksi, variasi suhu dan waktu reaksi derivatisasi (trimetilsililasi). Dalam penelitian ini sebagai model senyawa glukokortikosteroid akan dianalisis dua senyawa, yaitu deksametason dan metilprednisolon (Gambar 1).

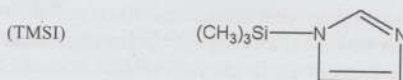
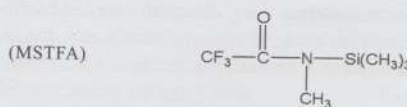


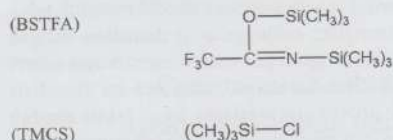
Gambar 1. Rumus bangun deksametason (A) = 9-fluoro-11  $\beta$ ,17,21-trihidroksi-16 $\alpha$ -metilpregna 1,4-diena-3,20-dion; BM 392,47; dan metilprednisolon (B) = 11 $\beta$ ,17 $\alpha$ ,21-trihidroksi-6 $\alpha$ -metil-pregna-1,4-diena-3,20-dion; BM 374,5.

## BAHAN DAN METODE

**BAHAN.** Baku pembanding deksametason (BPOM), baku pembanding metilprednisolon (Sigma), metanol p.a. (Merck), amonium iodida (Merck), D3-testosteron (ASDTL) standar internal, metiltestosteron (ASDTL) kontrol eksternal, kolom Sep-pak C<sub>18</sub>, dapar asetat 2M pH 5, enzim *helix pomatia* (Sigma), dapar karbonat pH 9, *t*-butil metil eter p.a. (Merck). Pereaksi derivatisasi (mutu untuk derivatisasi) yang digunakan adalah trimetilsilil-klorosilan (TMCS) (Sigma), N-trimetilsilil-imidazol (TMSI) (Sigma), 2-merkaptotanol (Merck), N,O-bis(trimetilsilil)asetamida (BSA), N-metil-N-

trimetilsilil-trifluoroasetamida (MSTFA) (Sigma); [N,O-bis(trimetilsilil)trifluoro-asetamida (BSFTA) dan trimetilsilil-klorosilan (TMCS)] (99:1) (Sigma).





**Alat.** Kromatografi gas-spektrometri massa (Hewlett Packard 6890 Series); evaporator vakum (BUCHI B480); timbangan (Sartorius MC210P); *waterbath* (GRANT SUB 14 dan Zymark Turbo Vap LV Evaporator); ekstraktor (RATEK RSM 6); sentrifuga (SAVANT Speed Vac Plus SC210A); *drybath* (Thermolyne 16500); pengocok (BOECO Vortex V<sub>1</sub> Plus).

Penelitian ini dilakukan di Laboratorium Pengawasan Doping, LABKESDA, DKI Jakarta.

**METODE. Pembuatan larutan baku pembanding deksametason dan metilprednisolon.** Lebih kurang 1 mg baku pembanding deksametason ditimbang saksama dan dimasukkan ke dalam labu tentukur 10 ml, kemudian dilarutkan dan diencerkan dengan metanol hingga 10 ml, kemudian dibuat larutan pengenceran 10x dengan metanol. Dengan cara yang sama dibuat larutan baku pembanding metilprednisolon.

**Pembuatan standar internal D3Testosteron.** D3-testosteron ditambahkan ke dalam sampel yang akan ditetapkan kadarnya sebelum tahap ekstraksi, yang berfungsi sebagai faktor koreksi dalam perhitungan kadar senyawa yang dianalisis.

Lebih kurang 1 mg baku pembanding D3-testosteron, ditimbang saksama dan dimasukkan ke dalam labu tentukur 10 ml. Kemudian dilarutkan dan diencerkan dengan metanol hingga 10 ml. Empat ratus  $\mu$ l larutan dipindahkan ke dalam labu tentukur 10 ml dan ditambah metanol sampai tanda.

**Pembuatan kontrol metiltestosteron.** Lebih kurang 1 mg baku pembanding metiltestosteron ditimbang saksama dan dimasukkan ke dalam labu tentukur 10 ml. Kemudian dilarutkan dan diencerkan dengan metanol hingga 10 ml. Empat ratus  $\mu$ l larutan dipindahkan ke dalam labu tentukur 10 ml, dan ditambah metanol sampai tanda.

Metiltestosteron yang ditambahkan ke dalam sampel setelah tahap ekstraksi, berfungsi sebagai kontrol eksternal terhadap sensitivitas alat saat dioperasikan.

**Pengambilan blanko urin.** Dalam analisis juga digunakan blanko urin sebagai matriks yang akan ditambah kedua baku pembanding dan digunakan sebagai sampel pada tahap validasi metode. Pengumpulan blanko urin secara khusus adalah sebagai berikut:

Sukarelawan yang akan diambil urinnya untuk blanko harus menandatangani formulir persetujuan penggunaan urin. Satu minggu sebelum pengambilan urin dilaksanakan, sukarelawan dipersiapkan untuk tidak mengkonsumsi obat-obatan, vitamin, *healthy food*, makanan, dan minuman seperti kopi, teh, coklat, *soft drink*, atau minuman kesehatan. Urin sukarelawan dikumpulkan selama 48 jam dalam botol penampung kemudian ditambahkan natrium azida 0,1% kedalamnya. Blanko urin disimpan di dalam *freezer*<sup>(9)</sup>.

**Percobaan pendahuluan.** Percobaan dilakukan pada 150  $\mu$ l larutan baku pembanding deksametason dan metilprednisolon dalam metanol yang telah dikeringkan, menggunakan 14 macam variasi kombinasi pereaksi derivatisasi masing-masing 100  $\mu$ l dimasukkan ke dalam tabung ulir, ditutup, dan dipanaskan dalam *dry bath* pada 70°C selama 90 menit. Pereaksi derivatisasi yang dimaksud adalah<sup>(4,10)</sup>:

- (i) MSTFA-NH<sub>4</sub>I-Etantiol;
- (ii) MSTFA-TMSI (50:1);
- (iii) TMSI;
- (iv) TMSI-BSA-TMCS (3:3:2);
- (v) MSTFA-NH<sub>4</sub>I-Merkaptoetanol;
- (vi) sampai (xiv) adalah kombinasi TMSI dengan [BSTFA-TMCS(99:1)] rasio (5:1); (4:1); (3:1) (2:1); (1:1); (1:2); (1:3); (1:4); dan (1:5).

Masing-masing hasil reaksi kemudian dianalisis dengan kromatografi gas-spektrometri massa dengan kondisi kromatografi sebagai berikut:

Suhu inlet 280°C; mode split; split rasio 10:1, aliran gas split 8,2 ml/menit; gas helium, aliran gas total konstan 12,0 ml/menit, tekanan 16,92 psi; kolom kapiler "HP Ultra 1" (*crosslinked methyl siloxane*), ketebalan film 0,11  $\mu$ m, panjang 17 meter, diameter 200  $\mu$ m, aliran gas gerak 0,8 ml/menit, volume injeksi: 4  $\mu$ l. Suhu oven awal 180°C, kenaikan suhu gradien 3°C/menit sampai 229°C, kemudian 40°C/menit sampai 310°C, dan suhu konstan selama 5 menit.

Pereaksi derivatisasi yang dipilih berdasarkan pada kriteria pereaksi yang dapat secara jelas memberikan *characteristic ion* spesifik; yaitu *m/z* 305, 345, 680 atau *m/z* 206, 456, 662 untuk deksametason; dan *m/z* 279, 369, 459 atau *m/z* 147, 424, 644 untuk metilprednisolon.

**Pemilihan pereaksi derivatisasi.** Dua kombinasi pereaksi derivatisasi saja yang dipilih dari percobaan pendahuluan dan diuji lebih lanjut untuk memilih salah satu saja yang terbaik. Dua pereaksi kombinasi tersebut dipersiapkan sebagai berikut: MSTFA-NH<sub>4</sub>I-Merkaptoetanol<sup>(10)</sup>. Botol bersih disiapkan, dibilas dengan metanol dan dikeringkan satu jam pada suhu 120°C. Lebih kurang 100 mg

amonium iodida ditimbang seksama, dimasukkan ke dalam botol, dan ditambah 5 ml MSTFA. Campuran pereaksi dilarutkan pada suhu 120°C selama dua jam, didinginkan, dan ditambah 175 ml merkaptotanol. Kemudian sebelas bagian pereaksi tersebut di atas ditambah dengan seratus bagian MSTFA. TMSI-[BSTFA-TMCS (99:1)](2:1), dua bagian TMSI ditambah satu bagian BSFTA-TMCS (99:1).

**Tahapan kerja.** Seratus lima puluh ml larutan baku deksametason dan 150 ml larutan baku metilprednisolon dimasukkan ke dalam tabung reaksi ulir 10 cm kemudian dikeringkan pada 60°C dengan gas nitrogen dalam Turbo Vap.

Kemudian 100 ml pereaksi derivatisasi dimasukkan ke dalam tabung tersebut, ditutup, dan tabung dipanaskan dalam *dry bath* pada 70°C selama 90 menit. Hasil derivatisasi dipindahkan ke vial.

Masing-masing hasil reaksi kemudian dianalisis dengan kromatografi gas-spektrometri massa pada mode *full scan* dengan sistem kromatografi seperti pada percobaan pendahuluan. Data kromatogram yang diperoleh dibandingkan dan dipilih pereaksi yang memberikan selektivitas paling baik seperti pada percobaan pendahuluan.

Data kromatogram yang diperoleh dibandingkan dan dipilih pereaksi yang menghasilkan spektrogram derivat senyawa dan teridentifikasinya tiga fragmen ion spesifik (*characteristic ion*) bagi masing-masing baku pembanding, untuk derivat senyawa deksametason adalah  $m/z$  305, 345, dan 680; atau  $m/z$  206, 456, dan 662; sedang *characteristic ion* untuk derivat senyawa metilprednisolon adalah  $m/z$  279, 369, dan 459; atau  $m/z$  147, 424, dan 644<sup>(4)</sup>. Lampiran 1 dan Lampiran 2 menggambarkan reaksi derivatisasi dan pola fragmentasi deksametason dan metilprednisolon.

**Penetapan suhu optimum reaksi derivatisasi.** Baku pembanding deksametason dan baku pembanding metilprednisolon disiapkan seperti pada percobaan pemilihan pereaksi derivatisasi, kemudian ditambah 100 ml pereaksi derivatisasi yang terpilih pada langkah pemilihan pereaksi derivatisasi. Setelah ditutup, panaskan tabung dalam *dry bath* pada suhu 60°, 70°, 80°, atau 90°C selama 90 menit. Hasil derivatisasi dipindahkan ke vial, lalu dianalisis dengan kromatografi gas-spektrometri massa menggunakan sistem kromatografi di atas pada mode *full scan*.

Pemilihan suhu reaksi derivatisasi optimum dilakukan berdasarkan spektrogram yang memiliki tiga *characteristic ion* yang spesifik, dan dengan memplot data kelimpahan ion kuantitasi (*characteristic ion* tertinggi) terhadap suhu reaksi derivatisasi, kemudian dipilih suhu yang memberikan kelimpahan ion kuantitasi yang tinggi dan standar

deviasi yang rendah. Ion kuantitasi untuk deksametason adalah  $m/z$  305 atau  $m/z$  662, dan ion kuantitasi metilprednisolon adalah  $m/z$  147 atau  $m/z$  279<sup>(4)</sup>.

**Penetapan waktu optimum reaksi derivatisasi.** Percobaan dilakukan seperti pada percobaan penetapan waktu optimum reaksi derivatisasi, dengan pemanasan tabung pada suhu reaksi yang telah dipilih dari percobaan penetapan waktu optimum reaksi derivatisasi, dan dengan variasi waktu 30, 60, 90 dan 120 menit. Hasil derivatisasi dianalisis dengan kromatografi gas-spektrometri massa menggunakan sistem kromatografi tersebut di atas pada mode *full scan*.

Waktu reaksi derivatisasi optimum dipilih berdasarkan kelimpahan ion kuantitasi yang paling tinggi dengan standar deviasi yang kecil. Kromatogram yang diuji harus memiliki waktu retensi sama serta memiliki *characteristic ion* dengan rasio kelimpahan ion relatif yang konstan.

**Validasi metode kromatografi gas-spektrometri massa.** Karena deksametason dan metilprednisolon terdapat dalam matrik urin, maka analisis kedua senyawa dilakukan melalui ekstraksi dari matrik urin, kemudian derivatisasi menjadi senyawa yang non polar dan mudah menguap. Kombinasi pereaksi derivatisasi, suhu dan waktu reaksi derivatisasi yang optimum selanjutnya digunakan untuk validasi metode penetapan kadar deksametason dan metilprednisolon secara simultan dari matrik urin secara Kromatografi Gas-Spektrometri Massa menggunakan senyawa standar internal dan standar eksternal.

**Uji linearitas.** Sejumlah 12,5 ml; 25 ml; 37,5 ml; 50 ml; dan 75 ml masing-masing larutan baku deksametason dan larutan baku metilprednisolon dimasukkan ke dalam 5,0 ml blanko urin. Kadar akhir masing-masing senyawa berturut-turut adalah 25 ng/ml, 5,0 ng/ml, 75 ng/ml, 100 ng/ml, dan 150 ng/ml. Masing-masing larutan dan satu blanko urin ditambah 50 ml larutan standar internal D3-Testosteron 4 µg/ml, dan dicampur homogen<sup>(10)</sup>.

**Tahap pemisahan.** Semua larutan di atas dielusi ke dalam kolom Sep-Pak C<sub>18</sub> yang sebelumnya telah dikondisikan dengan 3 ml metanol dan 3 ml aquabides. Kemudian kolom dicuci dengan 2 ml aquabides, dan dielusi dengan 3 ml metanol ke dalam tabung reaksi bertutup asah.

Fase metanol diuapkan dengan vakum evaporator, kemudian tambahkan 1 ml aquabides, 50 ml 2 M dapar asetat pH 5, dan 50 ml enzim Helix pomatia; tabung ditutup dan diinkubasi dalam *waterbath* pada suhu 52°C selama 3 jam. Setelah 3 jam tabung didinginkan, kemudian ditambahkan 250 ml dapar

karbonat pH 9, dan 5 ml *t*-butil metil eter, kemudian dikocok selama 30 menit.

**Tahap derivatisasi.** Larutan hasil ekstraksi disentrifugasi selama 5 menit. Lapisan eter dimasukkan ke dalam tabung bertutup ulir 10 cm dan ditambahkan 50 l metiltestosteron 4 µg/ml, dicampur homogen. Fase eter dikeringkan pada suhu 60°C dengan gas nitrogen dalam Turbo Vap. Seratus mikroliter pereaksi derivatisasi dimasukkan ke dalam tabung. Tabung ditutup dan dipanaskan dalam *dry bath* pada suhu dan waktu optimum.

Hasil derivatisasi dipindahkan ke dalam vial, lalu dianalisis dengan kromatografi gas-spektrometri massamenggunakan sistem kromatografi di atas, mode *Selected Ion Monitoring* (SIM).

Data kromatogram dan spektrogram dianalisis secara kualitatif dengan melihat waktu retensi dan *characteristic ion*. Persamaan garis regresi hubungan antara konsentrasi senyawa (deksametason/metilprednisolon) sebagai absis dan rasio kelimpahan ion kuantitasi senyawa terhadap kelimpahan ion kuantitasi standar internal sebagai ordinat, serta koefisien korelasi (R) dihitung dari data konsentrasi zat uji dengan rasio kelimpahan ion kuantitasi sampel terhadap kelimpahan ion kuantitasi D3-testosteron. Hubungan linear dinilai baik bila harga koefisien korelasi tidak kurang dari 0,98<sup>(11)</sup>. Tahap pemisahan dan tahap derivatisasi tersebut di atas akan digunakan seterusnya dalam analisis setiap kali ada sampel dalam matriks urin.

**Uji ketelitian.** Sejumlah 25 l larutan baku deksametason dan larutan baku metilprednisolon dimasukkan ke dalam 5,0 ml blanko urin, dan dilakukan 5 kali pengulangan<sup>(10)</sup>.

Masing-masing larutan ditambah 50 l larutan standar internal D3-testosteron 4 µg/ml, kemudian dicampur homogen. Selanjutnya dilakukan tahap pemisahan dan tahap derivatisasi seperti uji linearitas diatas, dan kemudian dianalisis dengan metode kromatografi gas-spektrometri massa<sup>(10)</sup>.

Data kromatogram dan spektrogram dianalisis secara kualitatif dengan melihat waktu retensi dan *characteristic ion*. Dihitung rata-rata, simpangan baku, dan koefisien variasi (KV) rasio kelimpahan ion kuantitasi analit terhadap kelimpahan ion kuantitasi D3-testosteron. Koefisien variasi yang masih dapat diterima berdasarkan konsentrasi analit adalah 15% untuk 100i g/kg-10i g/kg, dan 21% untuk 10i g/kg-1i g/kg<sup>(12)</sup>.

**Uji perolehan kembali**<sup>(10)</sup>. Sejumlah 37,5 l dan 50 l larutan baku deksametason dan larutan baku metilprednisolon dimasukkan ke dalam 5,0 ml blanko urin, masing-masing dilakukan 3 kali pengulangan. Masing-masing larutan ditambah 50 l larutan standar

internal D3-testosteron 4 µg/ml, kemudian dicampur homogen. Selanjutnya dilakukan tahap pemisahan dan tahap derivatisasi seperti uji linearitas di atas, kemudian dianalisis dengan metode kromatografi gas-spektrometri massa.

Data kromatogram dan spektrogram dianalisis secara kualitatif dengan melihat waktu retensi dan *characteristic ion*. Data rasio kelimpahan ion kuantitasi sampel dihitung terhadap kelimpahan ion kuantitasi D3-testosteron, kemudian dihitung kadar menggunakan persamaan garis regresi. Kadar yang didapat dibandingkan dengan kadar sebenarnya yang ditambahkan ke dalam urin, serta dihitung persentase perolehan kembali. Nilai perolehan kembali yang dapat diterima adalah 80-120%<sup>(13)</sup>.

**Batas deteksi.** Batas deteksi ditetapkan melalui pengolahan komputer terhadap data uji ketelitian. Pengolahan data akan memberikan informasi rasio *signal/noise* yang kemudian digunakan untuk menghitung kadar terkecil yang masih dapat terdeteksi dengan baik<sup>(14)</sup>.

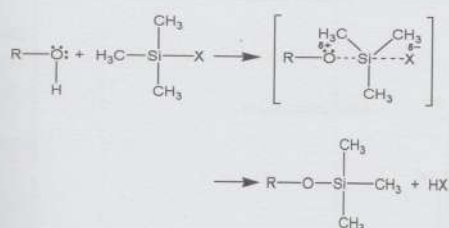
## HASIL DAN PEMBAHASAN

Matrik urin terdiri dari 95% air, yang di dalamnya terlarut urea, asam urat, kreatinin, dan produk buangan lainnya. Dalam urin normal juga terkandung natrium, kalium, dan kalsium<sup>(15)</sup>. Karena kompleksnya matrik urin dan kecilnya konsentrasi senyawa *doping* di dalamnya, maka analisis menggunakan metode kromatografi gas-spektrometri massa yang mempunyai kepekaan, ketepatan, dan ketelitian yang diperlukan.

Senyawa glukokortikosteroid tidak mudah menguap karena gaya tarik inter molekuler seperti gugus polar N-H, O-H, dan S-H yang dapat membentuk ikatan hidrogen. Dalam analisis dengan metode kromatografi gas-spektrometri massa, senyawa demikian harus ditingkatkan kemampuan menguapnya dengan cara derivatisasi, yaitu penggantian hidrogen pada gugus-gugus tersebut dengan cara alkilasi, asilasi, atau sililasi, sehingga meningkatkan kemampuan menguap secara signifikan.

Senyawa glukokortikosteroid umumnya memiliki gugus hidroksi pada posisi 11, 17, dan 21 serta gugus keton pada posisi 3 dan 20. Gugus hidroksi pada posisi 11 dan 21 paling mudah terderivatisasi, sedangkan gugus hidroksi pada posisi 17 tidak mungkin terderivatisasi karena rintangan sterik yang besar. Gugus keton pada posisi 3 dan 20 dapat terderivatisasi setelah mengalami tautomerisasi menjadi bentuk hidroksi.

Derivatisasi melalui sililasi terjadi melalui suatu



Gambar 2. Reaksi Substitusi Nukleofilik ( $S_N2$ ) oleh pereaksi trimetilsililasi.

reaksi substitusi nukleofilik ( $S_N2$ ) dengan mekanisme reaksi seperti pada Gambar 2.

**Percobaan pendahuluan.** Percobaan pendahuluan dilakukan untuk secara cepat memilih (*screening*) dua pereaksi derivatisasi dari sejumlah 14 kombinasi pereaksi, yang dapat secara jelas memberikan *characteristic ion*.

Dari keempatbelas pereaksi yang dicoba, hanya kombinasi MSTFA- $NH_4I$ -Merkaptoetanol (Tabel 1 no.5) dan TMSI-[BSTFA-TMCS (99:1)] (Tabel 1 no.6-14) yang dapat memberikan spektrogram derivat senyawa yang spesifik. Kombinasi MSTFA- $NH_4I$ -Merkaptoetanol memberikan ion  $m/z$  206, 456, 662 untuk deksametason; dan  $m/z$  147, 424, 644 untuk metilprednisolon.

Kombinasi TMSI-[BSTFA-TMCS(99:1)]

Tabel 1. Hasil percobaan pendahuluan

Pereaksi derivatisasi	Karakteristik ion
MSTFA- $NH_4I$ -EtantioI	-
MSTFA-TMSI (50:1)	-
TMSI	-
TMSI-BSA-TMCS (3:3:2)	-
MSTFA- $NH_4I$ -Merkaptoetanol	+
TMSI-[BSTFA-TMCS (99:1)] (5:1)	+
TMSI-[BSTFA-TMCS (99:1)] (4:1)	+
TMSI-[BSTFA-TMCS (99:1)] (3:1)	+
TMSI-[BSTFA-TMCS (99:1)] (2:1)	+
TMSI-[BSTFA-TMCS (99:1)] (1:1)	+
TMSI-[BSTFA-TMCS (99:1)] (1:2)	+
TMSI-[BSTFA-TMCS (99:1)] (1:3)	+
TMSI-[BSTFA-TMCS (99:1)] (1:4)	+
TMSI-[BSTFA-TMCS (99:1)] (1:5)	+

- = tidak ada *characteristic ion*

+ = Memberikan *characteristic ion* spesifik; yaitu  $m/z$  305, 345, 680 atau  $m/z$  206, 456, 662 untuk deksametason; dan  $m/z$  279, 369, 459 atau  $m/z$  147, 424, 644 untuk metilprednisolon.

memberikan ion  $m/z$  305, 345, 680 untuk deksametason dan  $m/z$  279, 369, 459 untuk metilprednisolon. Dari sembilan kombinasi konsentrasi TMSI-[BSTFA-TMCS(99:1)], hanya kombinasi (2:1) (Tabel 1 no. 9) yang memberikan kelimpahan ion paling tinggi; dengan demikian kombinasi TMSI-[BSTFA-TMCS(99:1)] (2:1) dipilih untuk digunakan seterusnya.

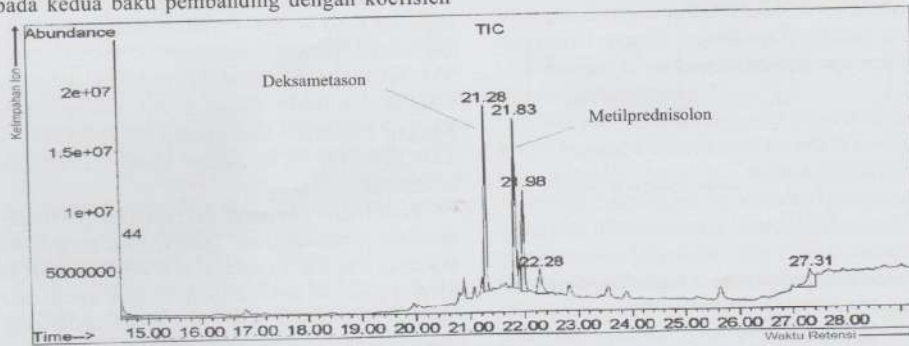
**Pemilihan pereaksi derivatisasi berdasar total ion chromatogram.** Dengan cara yang sama seperti di atas, kombinasi pereaksi MSTFA- $NH_4I$ -Merkaptoetanol dibandingkan dengan kombinasi TMSI-[BSTFA-TMCS(99:1)] (2:1) dan dipilih yang dapat menghasilkan kromatogram lebih baik. Dari kedua kromatogram tersebut (Gambar 3 dan Gambar 4) dapat dilihat bahwa kedua pereaksi derivatisasi dapat memenuhi syarat selektivitas dengan baik, karena puncak dari kedua baku pembanding dapat dibedakan dari puncak yang lain. Namun, karena terbentuknya puncak lain di sekitar puncak baku pembanding lebih sedikit pada kombinasi pereaksi TMSI-[BSTFA-TMCS (99:1)] (2:1) (Gambar 4), maka pereaksi tersebut dipilih untuk selanjutnya digunakan dalam penelitian ini.

**Suhu optimum reaksi derivatisasi.** Kelimpahan ion kuantitasi yang dimaksud sebagai kriteria pemilihan adalah respon *characteristic ion* tertinggi, yaitu  $m/z$  305 untuk deksametason,  $m/z$  279 untuk metilprednisolon, dan  $m/z$  435 untuk D3-Testosteron seperti terlihat pada Gambar 5.

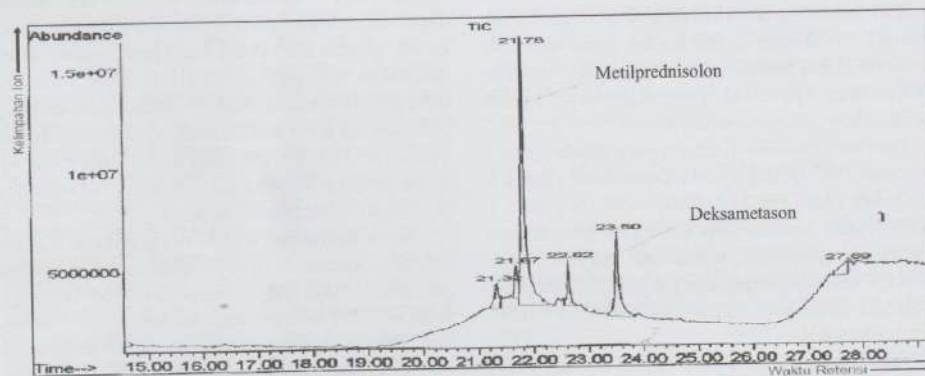
Dari keempat suhu reaksi derivatisasi 60, 70, 80, 90°C sebagaimana ditunjukkan pada Tabel 2 dan Gambar 6, diamati bahwa suhu reaksi 90°C dapat memberikan kelimpahan ion kuantitasi yang tertinggi dengan koefisien variasi yang rendah, yaitu  $x = 617306$ ;  $KV = 4,58\%$  pada deksametason, dan  $x = 1913586$ ;  $KV = 7,23\%$  pada metilprednisolon. Walaupun suhu reaksi di atas 90°C mungkin dapat menghasilkan kelimpahan ion kuantitasi yang lebih tinggi lagi, percobaan tidak dapat dilakukan karena maksimum suhu *dry bath* adalah 90°C. Reaksi derivatisasi dan pola fragmentasi deksa-metason dan metilprednisolon sehingga dapat memberikan *characteristic ion*  $m/z$  305 untuk deksametason dan  $m/z$  279 untuk metilprednisolon, ditunjukkan pada Lampiran 1 dan Lampiran 2.

**Waktu optimum reaksi derivatisasi.** Reaksi derivatisasi yang dilakukan dengan pereaksi TMSI-[BSTFA-TMCS(99:1)] (2:1), pada suhu reaksi 90°C dan variasi waktu reaksi 30, 60, 90, dan 120 menit. Dari keempat waktu reaksi derivatisasi seperti ditunjukkan pada Tabel 3 dan Gambar 7, diamati bahwa waktu reaksi 90 menit memberikan kelimpahan ion kuantitasi yang tinggi secara simultan

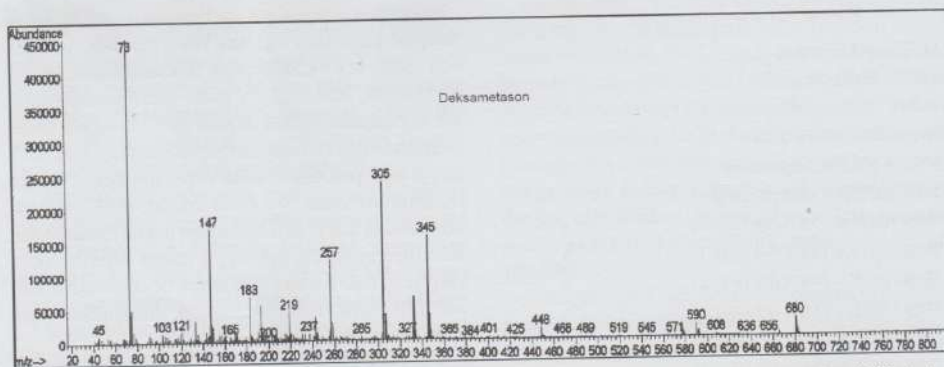
pada kedua baku pembanding dengan koefisien



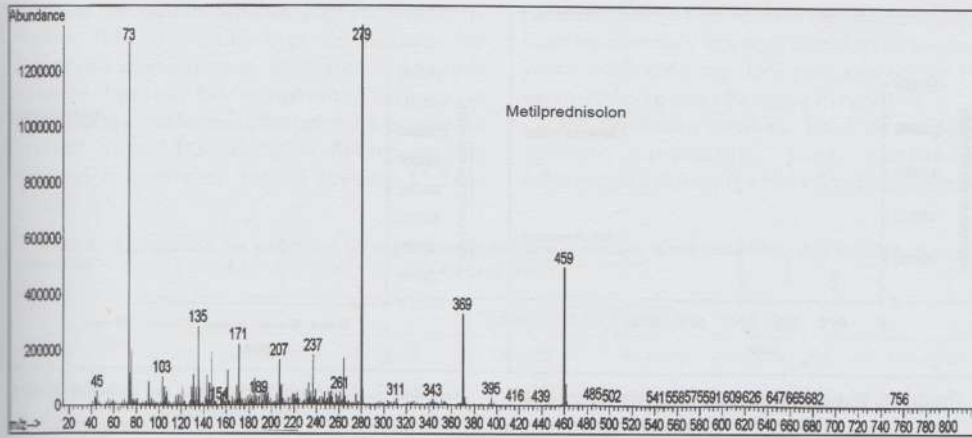
Gambar 3. Total ion chromatogram campuran baku pembanding deksameton dan metilprednisolon 300 ng/ml dengan pereaksi derivatisasi MSTFA-NH<sub>4</sub>I merkaptotetanol.



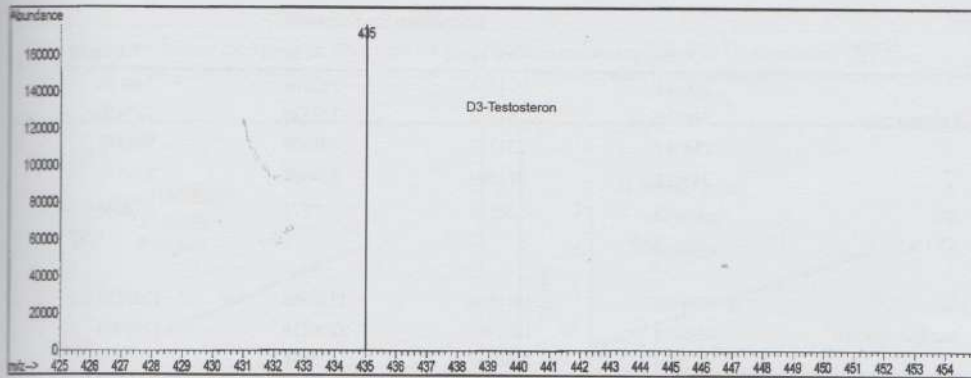
Gambar 4. Total ion chromatogram campuran baku pembanding deksameton dan metilprednisolon 300 ng/ml dengan pereaksi derivatisasi TMSI-[BSTFA-TMCS (99:1)] (2:1).



Gambar 5. Tipikal spektrum massa hasil analisis kromatografi gas-spektrometri massa derivat trimetilsilil dari deksameton.



Gambar 5. Tipikal spektrum massa hasil analisis kromatografi gas-spektrometri massa derivat trimetilsilil dari metilprednisolon.

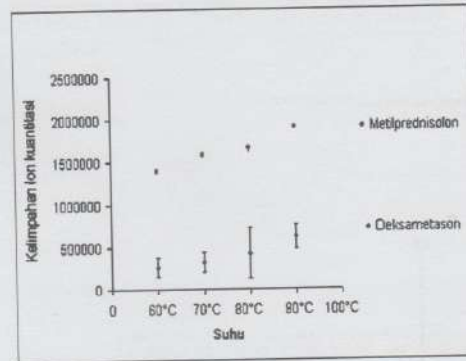


Gambar 5. Tipikal spektrum massa hasil analisis kromatografi gas-spektrometri massa derivat trimetilsilil dari D3-testosteron.

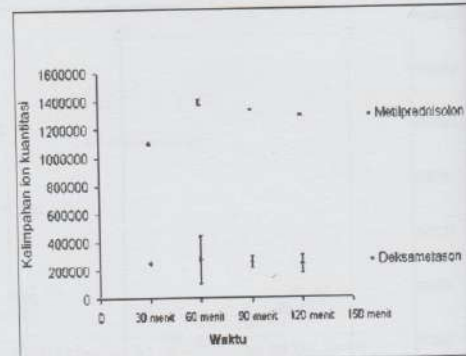
Tabel 2. Kelimpahan ion kuantitasi baku pembanding deksametason dan metilprednisolon (1500 ng) pada berbagai suhu reaksi

Senyawa	Kelimpahan Ion Kuantitasi			
	60°C	70°C	80°C	90°C
Deksametason	219282	347168	360615	636990
	266569	277474	446952	584944
	295376	339488	463056	629984
	260409	321377	423541	617306
SD	38419	38214	55087	28244
KV (%)	14,75	11,89	13,01	4,58
Metilprednisolon	1267056	1528600	1588248	2037912
	1427464	1506064	1982360	1938312
	1493264	1724376	1403768	1764472
	1395928	1586347	1658125	1913565
SD	116355	120067	295558	138389
KV (%)	8,34	7,57	17,82	7,23





Gambar 6. Hubungan kelimpahan ion terhadap suhu reaksi derivatisasi



Gambar 7. Hubungan kelimpahan ion terhadap waktu reaksi derivatisasi

Tabel 3. Kelimpahan ion kuantitasi baku pembanding deksametason dan metilprednisolon (1500 ng) pada berbagai waktu reaksi

Senyawa	Kelimpahan Ion Kuantitasi			
	30 menit	60 menit	90 menit	120 menit
Deksametason	246664	291784	262696	240176
	246736	251272	252520	237480
	255317	271712	248608	241480
$\bar{x}$	249572	271589	254608	239712
SD	4975	20256	7272	2040
KV (%)	1,99	7,46	2,86	0,85
Metilprednisolon	1094680	1441816	1323568	1242128
	1098256	1201952	1296536	1361904
	1095064	1532168	1376688	1260480
$\bar{x}$	1096000	1391979	1332264	1288171
SD	1963	170656	40777	64511
KV (%)	0,18	12,26	3,06	5,01

variasi yang cukup rendah, yaitu  $\bar{x} = 254608$ ,  $KV=2,86\%$  pada deksametason, dan  $\bar{x} = 1332264$ ,  $KV=3,06\%$  pada metilprednisolon. Waktu reaksi lain yang menghasilkan kelimpahan ion kuantitasi lebih tinggi atau koefisien variasi lebih rendah, tidak dipilih karena tidak terjadi secara simultan pada deksametason dan metilprednisolon.

**Uji linearitas metode kromatografi gas-spektrometri massa.** Tabel 4 menunjukkan kelimpahan ion kuantitasi pada berbagai konsentrasi baku pembanding deksametason ( $m/z$  305), metilprednisolon ( $m/z$  279) dan standar internal D3-testosteron ( $m/z$  435), serta rasio kelimpahan ion kuantitasi baku pembanding terhadap D3-testosteron pada berbagai konsentrasi tersebut (D/D3 dan M/D3).

Kurva baku yang dibuat antara berbagai konsen-

trasi deksametason terhadap rasio kelimpahan ion D/D3 menghasilkan persamaan garis regresi  $y = 0,013x + 0,0106$  (Gambar 8) dengan koefisien korelasi  $R = 0,9937$ , yang menunjukkan bahwa ada korelasi yang baik antara konsentrasi deksametason dan rasio kelimpahan ion D/D3 dalam rentang konsentrasi sampai 150 ng/ml.

Persamaan garis regresi yang dibuat dari berbagai konsentrasi metilprednisolon terhadap rasio kelimpahan ion M/D3, adalah  $y = 0,0081x + 0,3067$  (Gambar 9) dengan koefisien korelasi  $r = 0,9823$  yang menunjukkan bahwa ada korelasi yang baik antara konsentrasi metilprednisolon dan rasio kelimpahan ion M/D3 dalam rentang konsentrasi sampai 150 ng/ml.

**Uji ketelitian.** Analisis dilakukan 5 kali pengulangan dengan campuran baku pembanding deksa-

metason dan metilprednisolon pada konsentrasi 50 ng/ml. Tabel 5 menunjukkan kelimpahan ion kuantitasi deksametason, metilprednisolon, dan standar internal D3-testosteron, serta rasio kelimpahan ion kuantitasi baku pembanding terhadap standar internal D3-testosteron. Secara simultan diperoleh koefisien variasi sebesar 12,14%

(deksametason), dan 13,87% (metilprednisolon). Hasil ini memenuhi syarat uji presisi, yaitu koefisien variasi tidak lebih dari 15% pada konsentrasi 100 µg/kg-10 µg/kg atau 100 ng/ml-10 ng/ml<sup>(12)</sup>.

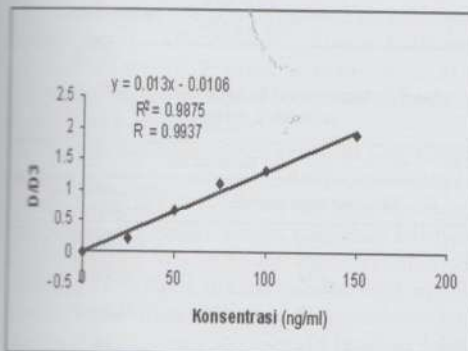
**Uji perolehan kembali.** Hasil uji perolehan kembali penambahan baku pembanding deksametason dan metilprednisolon masing-masing

**Tabel 4. Kelimpahan ion kuantitasi berbagai konsentrasi deksametason, metilprednisolon, dan standar internal D3- testosteron**

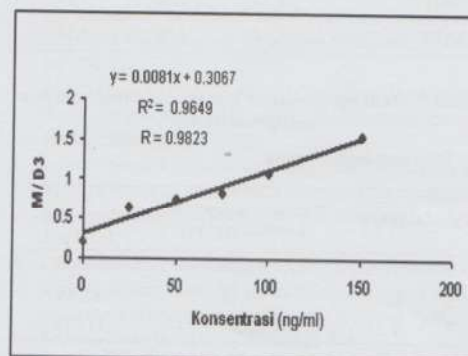
	Kelimpahan ion kuantitasi					
	Control	25 ng/ml	50 ng/ml	75 ng/ml	100 ng/ml	150 ng/ml
Deksametason	0	31072	128480	191504	294168	339840
Metilprednisolon	48775	96329	147936	148384	241016	280224
D3-Testosteron	228667	148699	197587	176321	222585	181284
D/D3	0,00	0,21	0,65	1,09	1,32	1,87
M/D3	0,21	0,65	0,75	0,84	1,08	1,54

D/D3 = Rasio kelimpahan ion kuantitasi deksametason (*m/z* 305)/kelimpahan ion kuantitasi D3-testosteron (*m/z* 435)

M/D3 = Rasio kelimpahan ion kuantitasi metilprednisolon (*m/z* 279) /kelimpahan ion kuantitasi D3-testosteron (*m/z* 435).



Gambar 8. Kurva kalibrasi, persamaan garis regresi dan koefisien korelasi deksametason dalam rentang kadar 0-150ng/ml.



Gambar 9. Kurva kalibrasi, persamaan garis regresi dan koefisien korelasi metilprednisolon dalam rentang kadar 0-150ng/ml.

**Tabel 5. Kelimpahan ion kuantitasi pada uji ketelitian konsentrasi baku pembanding 50 ng/ml dan standar internal D3-testosteron**

Perulangan	Kelimpahan Ion Kuantitasi			Rasio Kelimpahan Ion Kuantitasi	
	Deksametason	Metilprednisolon	D3-Testosteron	D/D3	M/D3
1	126840	170584	204962	0,62	0,83
2	153832	147936	186448	0,83	0,79
3	128480	147936	197587	0,65	0,75
4	113512	106096	176025	0,64	0,60
5	139824	133856	211457	0,66	0,63
$\bar{x}$				0,68	0,72
SD				0,08	0,10
KV (%)				12,14	13,87

**Tabel 6. Respon ion kuantitasi uji perolehan kembali deksametason dan metilprednisolon**

a). Konsentrasi 75 ng/ml

Senyawa	Perulangan		
	1	2	3
Deksametason	191504	217784	281008
Metilprednisolon	148384	189640	242056
D3-Testosteron	176321	237693	246976
D/D3	1,09	0,91	1,14
M/D3	0,84	0,80	0,98

b). Konsentrasi 100 ng/ml

Senyawa	Perulangan		
	1	2	3
Deksametason	339600	294168	283488
Metilprednisolon	298112	241016	286800
D3-Testosteron	266575	222585	247249
D/D3	1,27	1,32	1,15
M/D3	1,12	1,08	1,16

**Tabel 7. Hasil uji perolehan kembali deksametason dan metilprednisolon**

a). Deksametason 75 ng/ml

No	D/D3	Kadar yang diperoleh kembali (ng/ml)	Persen ketepatan (%)
1	1,09	82,85	110,47
2	0,91	69,37	92,49
3	1,14	86,95	115,94
Persen ketepatan rata-rata = 106,30%			
SD = 12,27			
KV = 11,54%			

b). Metilprednisolon 75 ng/ml

No	D/D3	Kadar yang diperoleh kembali (ng/ml)	Persen ketepatan (%)
1	0,84	69,52	92,70
2	0,80	64,50	86,00
3	0,98	85,45	113,93
Persen ketepatan rata-rata = 97,54%			
SD = 14,58			
KV = 11,95%			

**Tabel 8. Hasil uji perolehan kembali deksametason dan metilprednisolon**

a). Deksametason 100 ng/ml

No	D/D3	Kadar yang diperoleh kembali (ng/ml)	Persen ketepatan (%)
1	1,27	97,76	97,76
2	1,32	101,54	101,54
3	1,15	87,65	87,65
Persen ketepatan rata-rata = 95,65%			
SD = 7,18			
KV = 7,51%			

b). Metilprednisolon 100 ng/ml

No	D/D3	Kadar yang diperoleh kembali (ng/ml)	Persen ketepatan (%)
1	1,12	101,33	101,33
2	1,08	97,25	97,25
3	1,16	106,12	106,12
Persen ketepatan rata-rata = 101,57%			
SD = 4,44			
KV = 4,37%			

**Tabel 9. Konsentrasi terkecil yang masih dapat terdeteksi dengan baik**

No	Konsentrasi	
	Deksametason (ng/ml)	Metilprednisolon (ng/ml)
1	4,93	3,45
2	6,79	4,93
3	5,12	4,00
4	3,15	2,42
5	2,19	1,83
$\bar{X}$	4,44	3,33
SD	1,80	1,23

75 ng/ml dan 100 ng/ml dalam blanko urin dirangkum dalam Tabel 6, yaitu data kelimpahan ion kuantitasi deksametason, metilprednisolon, dan D3-testosteron. Dari Tabel 6 dapat dihitung kadar deksametason dan metilprednisolon yang diperoleh kembali melalui persamaan garis regresi kurva kalibrasi yang didapat pada uji linearitas.

Data kadar yang diperoleh kembali dapat dilihat pada Tabel 7 dan Tabel 8. Uji perolehan kembali ini menunjukkan bahwa pada konsentrasi 75 ng/ml maupun 100 ng/ml, secara simultan dapat memberikan perolehan kembali deksametason maupun metilprednisolon dengan baik sesuai persyaratan, yaitu

80% - 120% <sup>(14)</sup>.

**Uji batas deteksi.** Pengolahan data uji ketelitian pada konsentrasi baku pembanding 50 ng/ml dapat menghasilkan data rasio *signal/noise* (S/N), yang selanjutnya dengan formula  $LOD = [5/(S/N) \times C]$  digunakan untuk menghitung nilai batas deteksi. Deksametason masih dapat terdeteksi dengan baik pada kadar 4,44 ng/ml dengan SD 1,8 ng/ml, sedangkan metilprednisolon masih dapat terdeteksi pada 3,33 ng/ml dengan SD 1,23 ng/ml (Tabel 9).

### SIMPULAN

Metode kromatografi gas-spektrometri massa menggunakan kombinasi pereaksi derivatisasi TMSI-[BSTFA-TMCS(99:1)](2:1) pada suhu reaksi 90°C dan waktu reaksi 90 menit merupakan metode yang peka dan teliti dengan keterulangan yang baik untuk penetapan kadar deksametason dan metilprednisolon secara simultan.

Metode ini memberikan hubungan linier yang baik antara konsentrasi deksametason dan metilprednisolon dan rasio kelimpahan ion kuantitasi baku pembanding terhadap kelimpahan ion kuantitasi standar internal D3-testosteron dengan koefisien korelasi (R)=0,9937 untuk deksametason dan (R)=0,9823 untuk metilprednisolon dalam rentang konsentrasi 0-150 ng/ml urin.

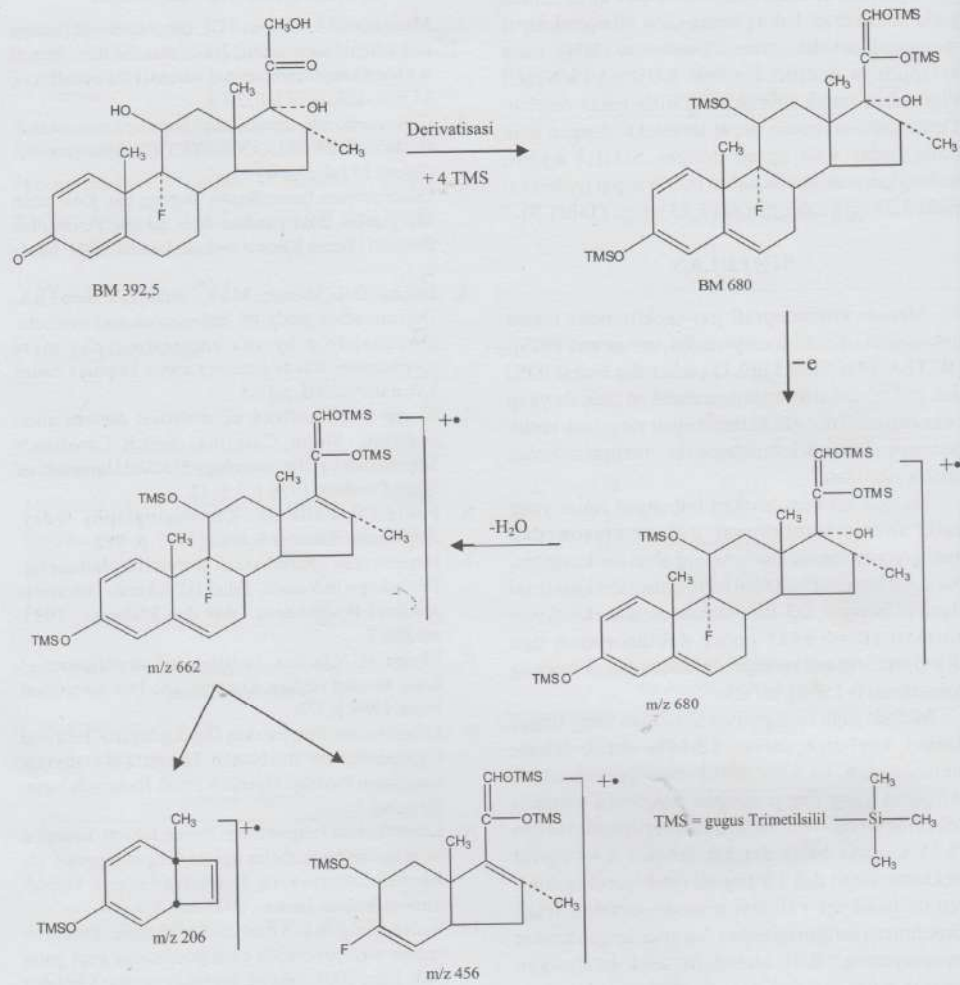
Metode juga mempunyai ketelitian yang tinggi dengan koefisien variasi 12,14% untuk deksametason dan 13,87% untuk metilprednisolon, ketepatan yang tinggi dengan perolehan kembali deksametason 100,98% dan metilprednisolon 99,55%, serta batas deteksi sebesar 4,44 ng/ml (deksametason) dan 1,80 ng/ml (metilprednisolon). Semua hasil uji validasi metode tersebut telah dikonfirmasi dengan uji anova dua arah dengan tingkat kepercayaan  $\alpha = 0,01$ . Metode ini telah ditunjukkan dapat digunakan untuk analisis senyawa glukokortikosteroid di dalam matrik urin.

Metode kromatografi gas-spektrometri massa dengan pereaksi derivatisasi yang terpilih tersebut di atas disarankan diuji lebih lanjut untuk deteksi dan penentuan kadar senyawa glukokortikosteroid yang lain, terutama senyawa glukokortikosteroid yang tercantum dalam daftar *International Olympic Committee (IOC)* tahun 2004.

### DAFTAR PUSTAKA

1. Magiakou MA, Chrousos GP. Glucocorticoid therapy and adrenal suppression; 2002. diambil dari: <http://www.endotext.com/adrenal/adrenal14/adrenalframe14.htm>. diakses 14 Juli, 2004.
2. Glucocorticoids. diambil dari: <http://cpharm.vetmed.vt.edu/vm8784/GLUCOCORTICIDS/glucocort.htm>. diakses 14 Juli, 2004.
3. Laboratorium Pemeriksaan Doping dan Kesehatan Masyarakat. Buku panduan atlet. Jakarta: Pemerintah Provinsi Daerah Khusus Ibukota Jakarta, 2004; hal. 1-2.
4. Pereira HMG, Marques MAS, Cardoso JN, Neto FRA. Derivatization study on endogenous and synthetic corticosteroid by gas chromatography mass spectrometry. Rio de Janeiro: Ladetec Doping Control Laboratory; 2001. p. 1-15.
5. Knapp DR. Handbook of analytical derivatization reaction. South Carolina: South Carolina's Department of Pharmacology Medical University of South Carolina; 1979. p. 2, 9, 12.
6. Poole CF, Polle SK. Chromatography today. Amsterdam: Elsevier Science; 1991. p. 982.
7. Departemen Kesehatan Republik Indonesia. Farmakope Indonesia. Edisi IV. Jakarta: Direktorat Jenderal Pengawasan Obat dan Makanan; 1995. hal. 286-7.
8. Moffat AC, Clarke's. Isolation and identification of drug. Second edition. London: The Pharmaceutical Press; 1986. p. 772.
9. Laboratorium Pengawasan Doping Jakarta. Instruksi kerja pembuatan urin blanko. Jakarta: Laboratorium Kesehatan Provinsi Daerah Khusus Ibukota Jakarta; 2003. hal. 1.
10. Laboratorium Pengawasan Doping Jakarta. Instruksi kerja skrining anabolik steroid dengan seppak C18. Jakarta: Laboratorium Kesehatan Provinsi Daerah Khusus Ibukota Jakarta; 2003. hal. 3-4.
11. Badan Pengawas Obat dan Makanan. Petunjuk operasional penerapan cara pembuatan obat yang baik. Edisi 2001. Jakarta: Badan Pengawas Obat dan Makanan; 2001. hal. 412-21.
12. Sumardi. Validasi metode pengujian. Jakarta: Badan Standardisasi Nasional; 2001. hal. 15.
13. Sriwoelan S. Validasi dan pemilihan metode analisis. Jakarta: Prosiding Temu Ilmiah Nasional Bidang Farmasi VI; 1997. hal. 17.
14. Laboratorium Pengawasan Doping Jakarta. Instruksi kerja pelaksanaan validasi metode analisis. Jakarta: Laboratorium Kesehatan Provinsi Daerah Khusus Ibukota Jakarta; 2003. hal. 13.
15. Urine, anatomy and physiology. diambil dari <http://reference.allrefer.com/encyclopedia/U/urinehtml> diakses 17 Agustus, 2004.

## Lampiran 1. Reaksi derivatisasi dan pola fragmentasi deksametason



Lampiran 2. Reaksi derivatisasi dan pola fragmentasi metilprednisolon

