

Amphetamine Detection in Human Blood Plasma With LC_MS/MS

Idha Arfianti Wiraagni^{1*}, Mustafa Ali Mohd², Rusdi Abdul Rashid³,
Didi Erwandi bin Mohammad Haroon², Egha Zainur Ramadhani⁴

¹Department of Forensic, Faculty of Medicine, University Gadjah Mada, Yogyakarta, Indonesia

²Shimadzu- UMMC Center for Xenobiotics Studies (SUCXeS), Faculty of Medicine, University of Malaya, Kuala Lumpur, Malaysia

³Department of Psychological Medicine, Faculty of Medicine, University of Malaya, Kuala Lumpur, Malaysia

⁴Department of Medical Sciences, Faculty of Medicine and Health Sciences, University Abdurrah, Riau, Indonesia

*)Corresponding author: E-mail : idha.arfianti@ugm.ac.id

ABSTRAK

Penggunaan narkotika golongan stimulan sangat umum di seluruh dunia. Salah satu dari stimulan yang disalahgunakan secara luas adalah amfetamin, karena mempunyai efek yang poten dalam meningkatkan aktivitas tubuh dan sistem saraf pusat, melalui stimulasi berbagai neurotransmitter. Penelitian ini berhasil menemukan prosedur (presipitasi protein) yang efektif, efisien, dan sederhana yang bisa mendeteksi amfetamin di dalam plasma darah manusia dengan (Liquid Chromatography Tandem Mass Spectrometry / LC-MS/MS). Metode ini bisa mendapat hasil dalam jangka waktu cepat, dengan harga yang murah dan jumlah sampel yang sedikit. Metode ini jugamempunyai sensitifitas, spesifisitas, dan *recovery* yang bagus untuk deteksi amfetamin di dalam plasma darah manusia, pada konsentrasi lebih dari 100 ng/mL. Metode ini disarankan untuk tes konfirmasi, yang diperlukan untuk memastikan adanya amfetamin di dalam plasma darah manusia

Kata kunci : amfetamin, plasma darah manusia, skreening, LC-MS/MS

ABSTRACT

The use of stimulants as a abused drug are very common in all over the world. One of the main stimulant that are widely used are amphetamine, because it has potent effect in increasing activity of the body and central nervous system, through the stimulation of neurotransmitter. This research successfully performed an effective, efficient, and simple protein precipitation extraction procedure of amphetamine from human plasma then analysed by (Liquid Chromatography Tandem Mass Spectrometry / LC-MS/MS). This method showed fast running time with minimum cost and volume of sample. The developed method had quite good sensitivity, specificity, and recovery for amphetamine detection in human plasma samples in the concentration more than 100 ng/mL. This method was suggested for confirmatory screening test, that are needed to make sure the presence of amphetamine in human blood plasma.

Key words: amphetamine, human blood plasma, screening, LC-MS/MS

PENDAHULUAN

Amfetamin merupakan salah satu dari obat yang sering disalahgunakan di masyarakat. Obat ini masuk ke dalam golongan Psikotropika grup II

yang bisa membuat peminumnya semakin bertenaga. Penggunaan amfetamin sangat marak di kalangan pecandu karena harganya yang

terjangkau dan juga digunakan sebagai doping di bidang olahraga. Harganya yang murah dan lebih mudah didapat, membuat pecandu beralih dari golongan opioid ke amfetamin. Bahkan beberapa kasus pasien pecandu yang berobat rutin di klinik metadon, dalam beberapa tahun ada yang berubah mengkonsumsi amfetamin sebagai bentuk pelampiasan lain dalam kecanduannya (Triswara dan Carolia, 2017).

Amfetamin bisa memacu pelepasan beberapa neurotransmitter di dalam badan, seperti dopamin, norepinefrin, dan serotonin. Peningkatan yang ditimbulkan dari neurotransmitter tersebut bisa meningkatkan stimulasi energi, meningkatkan ketahanan fisik, aktifitas motorik, serta menimbulkan rasa senang. Semua organ di dalam tubuh bekerja lebih keras, sehingga pengguna merasa lebih fokus, bertenaga, percaya diri, dan dapat berpikir dengan cepat (Betzler, Viohl, Romanczuk-Seiferth, dan Foxe, 2017).

Efek samping yang ditimbulkan dari penggunaan amfetamin ini adalah timbulnya rasa sangat lelah setelah efek hilang dalam beberapa jam. Penggunaan jangka panjang menyebabkan ketergantungan dan intoleransi sehingga pengguna akan senantiasa ingin mengkonsumsi obat tersebut untuk mencegah efek *withdrawal* (sakau). Untuk kasus penggunaan dosis yang berlebih akan menimbulkan kondisi yang bisa mengancam nyawa (Substance Abuse and Mental Health Services Administration, 2013a, 2013b). Dalam beberapa kasus, pecandu meminum beberapa obat yang dikonsumsi sekaligus atau juga menambahkan zat aditif, seperti lem, cat, dan plastik. Kombinasi ini dilakukan dengan maksud untuk meningkatkan efek kerja obat agar semakin berkesan, khususnya pada pecandu yang sudah toleran dengan dosis tunggal amfetamin (Kolbrich et al., 2008).

Amfetamin adalah obat yang dikonsumsi secara oral. Tersedia dalam sediaan tablet konvensional dan kapsul lepas tertunda. Setelah

masuk ke dalam tubuh, dia akan diserap secara sempurna dari usus dalam jangka waktu 3 sampai 7 jam. Setelah proses penyerapan, efek dari zat ini akan dirasakan oleh pengguna dalam 3 sampai 12 jam. Dalam hati, amfetamin akan dimetabolisme oleh CYP2D6, glisin N-aciltransferase, dopamin β -hidroksilase, butirir-KoA ligase, dan flavin-monooksigenase³ menjadi zat yang lebih larut dalam air, dan mudah dikeluarkan melalui ginjal. Mayoritas ekskresi amfetamin melalui ginjal dan sebanyak 30-40% tetap diekskresikan dalam bentuk amfetamin. Itulah mengapa amfetamin bisa dideteksi dari urin (Betzler, Viohl, Romanczuk-Seiferth, dan Foxe, 2017).

Berdasarkan toksikokinetik di atas, amfetamin di dalam tubuh bisa dideteksi dari berbagai cairan biologis pengguna, seperti darah, cairan mulut, dan urin. Metode penapisan atau skrining biasa dilakukan dalam berbagai bidang, seperti olahraga, pendidikan, okupasi, atau penelitian. Dalam bidang olahraga, tim kedokteran akan melakukan skrining untuk memastikan atlet bebas dari penggunaan doping, sehingga dapat meningkatkan sportifitas dalam bertanding. Dalam pendidikan dan okupasi, institusi memerlukan pelajar dan pekerja yang tidak terlibat dalam penggunaan narkotika. Dalam penelitian, metode skrining sangat aplikatif untuk mendeteksi pengguna narkotika dalam waktu yang singkat di lapangan (Fernandez et al., 2009).

Metode skrining yang mudah dan relatif murah di lapangan adalah deteksi dengan menggunakan *rapid test*. *Rapid test* banyak digunakan dalam aplikasinya, tetapi memiliki beberapa kelemahan. Kelemahan pertama adalah isu mengenai kualitas alat *rapid*, yang tergantung pada proses pabrikasi dan penyimpanan sebelum digunakan. Kelemahan lainnya dan sering muncul di lapangan adalah adanya *cross reaction* dari alat uji. *Cross reaction* bermakna alat uji akan menunjukkan hasil positif, jika diujikan dalam beberapa zat yang mempunyai struktur kimia yang sama atau pada golongan obat yang sama.

Konsekuensi dari *Cross reaction* menyebabkan adanya hasil yang positif palsu. (Vlase, Popa, Loghin, & Leucuta, 2009).

Kelemahan uji rapid tersebut membuat perlu adanya pemeriksaan dengan alat deteksi yang lebih canggih (dengan sensitivitas dan spesifisitas tinggi), untuk memastikan jenis obat apa yang dikonsumsi oleh pasien. Proses deteksi tersebut juga diharapkan lebih mudah dalam pengerjaannya, dan lebih murah dibandingkan uji konfirmasi, tanpa mengurangi validitas dan keterandalannya. Studi ini mengembangkan metode deteksi baru dengan menggunakan LC-MS/MS untuk mendeteksi adanya amfetamin dalam darah sebagai alternatif metode konfirmasi yang sangat diperlukan di masyarakat (Barnes et al., 2009).

METODE PENELITIAN

Analisis amfetamin dilakukan dengan menggunakan instrumen LC-MS/MS. Instrumen LC terdiri dari sistem LC-20AD XR UFLC dengan injektor sampel otomatis SIL-HT (Shimadzu, Kyoto Japan). Sistem LC-MS/MS dikontrol dengan software Analyst, versi 1.6.3 (*Applied Biosystems*). Kolom analitikal yang digunakan adalah Agilent, Eclipse Plus Phenyl-Hexyl (150 mm x 2.1 mm, 5 μ m). Suhu kolom 40°C dengan total waktu analisis 10 menit. Fase gerak yang digunakan adalah 10 mM ammonium formate dalam air (pH 6.6) pada pompa A dan 0.1% FA (dalam asetonitril) pada B. Kecepatan aliran 0.3 mL/menit dengan gradien elusi yang diset sesuai suhu ruangan. Gradien dimulai dengan 5% B, lalu naik menjadi 40% B saat 3 menit, dan berlangsung sampai 4 menit. Selanjutnya gradien naik menjadi 100% B saat 6 menit, dan berlangsung sampai 8 menit. Gradien kemudian kembali ke 5% B saat 8.01 menit dan kondisi ini berlaku sampai 10 menit. Volum sampel saat injeksi sebanyak 8 μ L.

Untuk spektrometer kita menggunakan *Linear Ion Trap Quadrupole* LC-MS/MS

Spectrometer, QTRAP 5500, dengan *ESI probe*. Instrumen ini dioperasikan dengan model ionisasi negatif. Beberapa parameter spektrometryang optimal digunakan untuk deteksi amfetamin adalah suhu sumber ion 450°C, tegangan *ion spray* 5500 V, tekanan *gas curtain* sejumlah 20 psi, tekanan gas sumber ion 1 sebesar 35 psi, dan tekanan gas sumber ion 2 sebesar 35.0 psi. *Dwell time* yang digunakan untuk amfetamin adalah 40 milisekon.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Hasil injeksi sampel menunjukkan waktu retensi (RT = *Retention Time*) kromatogram amfetamin adalah 3.92 menit, serta rasio massa terhadap muatan (m/z) sebesar 136.32 > 90.9 dan 136.32 > 118.9. Hasil optimasi dari parameter spektrometer yang optimal terdapat dalam **Tabel 1**.

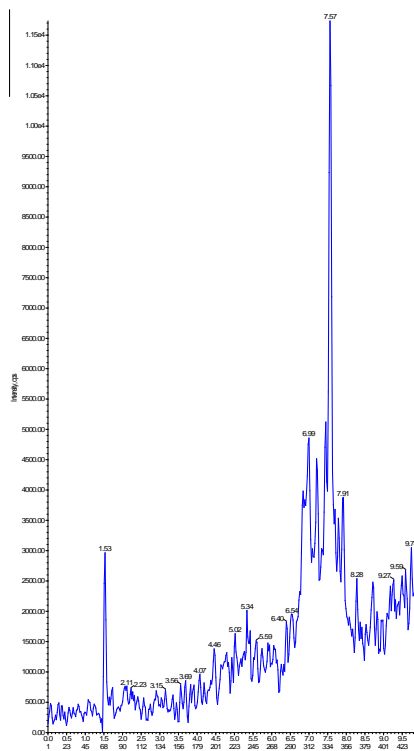
Tabel 1. Parameter Spektrometer Amfetamin

Analit	Q1	Q3	DP	EP	CE	C
						X
						P
Amfetamin	136.3	90.9	256	10	23	14
		118.9	256	10	11	16

DP: *declustering potential*; EP: *entrance potential*; CEP: *collision cell entrance potential*; CE: *collision energy*; CXP: *collision cell exit potential*

Saat pemeriksaan blanko, tidak terdapat *peak* lain yang muncul pada menit ke 3.83. Hal ini menunjukkan metode ini spesifik untuk deteksi amfetamin (**Gambar 1**). Sensitiviti dari prosedur ini mencapai 100 ng/mL. Hal ini dapat mendeteksi kuantiti yang minimal dari amfetamin di dalam tubuh.

Selain mengembangkan metode deteksi amfetamin dengan LC-MS/MS, studi ini juga menemukan metode ekstraksi amfetamin yang sangat efektif dan efisien dari sampel biologis berupa plasma manusia. Sampel yang dibutuhkan dalam metode ini sangat sedikit yaitu 100 μ l plasma manusia.

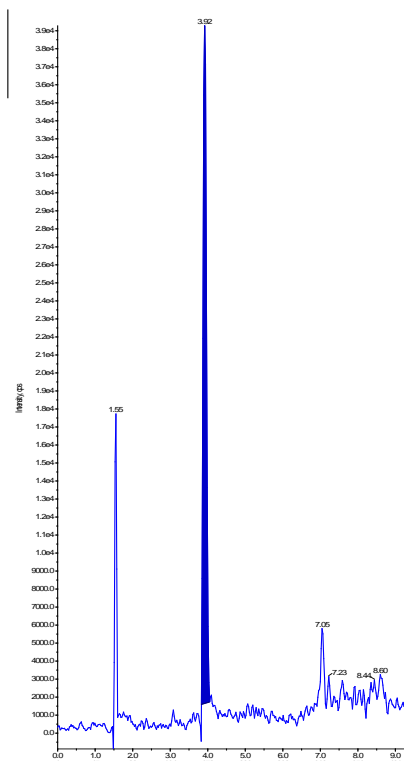


Gambar 1. Kromatogram pada pemeriksaan blanko

Prosedur yang dilakukan dalam pengambilan sampel adalah 5 mL darah manusia dimasukkan ke dalam tabung EDTA. Sel-sel darah dipisahkan dari plasma dengan cara prosedur sentrifugasi selama 10 menit dengan kecepatan 2,000 x g. Setelah proses sentrifugasi, plasma dipindahkan ke dalam tabung *polypropylene* steril dengan menggunakan pipet Pasteur. Sampel disimpan di dalam almari es -20°C sampai saat analisis.

Peparasi sampel dilakukan dengan teknik ekstraksi presipitasi protein. Sampel plasma yang sudah beku dicairkan dalam suhu ruangan. Setelah sampel plasma cair, plasma divorteks untuk memastikan semua kandungan tercampur sempurna. Selanjutnya 100 µL plasma ditambah dengan 300 µL asetonitril. Campuran divorteks selama 5 detik dan disentrifugasi selama 2 menit dengan kecepatan 14800 rpm. Supernatan difilter dengan filter berdiameter 0.2 µm, kemudian ditransfer ke dalam vial yang baru. Sebanyak 8

mikroliter sampel diinjeksikan ke dalam LC-MS/MS untuk deteksi kandungan amfetamin. Gambar kromatogram amfetamin dalam plasma manusia terdapat dalam Gambar 2. Tes *recovery* juga dilakukan dengan membandingkan area kromatogram amfetamin dalam plasma manusia dengan area kromatogram dalam standard. Hasil perbandingan dalam konsentrasi 100 ng/mL adalah 116% dan hasil perbandingan dalam konsentrasi 1000 ng/mL adalah 105%.



Gambar 2. Kromatogram amfetamin konsentrasi 3000 ng/mL dengan intensitas : 3.9e4 dalam plasma darah manusia

KESIMPULAN

Studi ini mengembangkan metode skrining dan deteksi amfetamin baru dengan menggunakan LC-MS/MS. Metode ini mempunyai spesifisitas dan sensitivitas yang tinggi. Selain itu, ditemukan juga metode yang sederhana, efektif, dan efisien untuk mengekstraksi amfetamin dari plasma manusia dengan protein presipitasi. Sampel plasma yang diperlukan dalam kuantitas yang minimal, prosedur yang digunakan cepat, mudah,

dan murah dalam aplikasinya. Kedua metode ini diharapkan dapat diaplikasikan dengan mudah dan luas, sebagai metode konfirmasi dari pemeriksaan skrining sederhana yang dilakukan di lapangan.

UCAPAN TERIMAKASIH

Terimakasih untuk LPDP Indonesia sebagai institusi penyanggah dana yang telah membiayai studi ini. Selain itu, terimakasih kami tujukan kepada Shimadzu-UM Center for Xenobiotics Studies (SUCXeS) dan Departemen Patologi Univesiti Malaya, yang telah menyediakan tempat dan fasilitas untuk menyelesaikan studi ini.

DAFTAR PUSTAKA

1. Barnes, A.J., De Martinis, B.S., Gorelick, D.A., Goodwin, R.S., Kolbrich, E.A., Huestis, M.A., 2009. Disposition of MDMA and Metabolites in Human Sweat Following Controlled MDMA Administration. *Clinical Chemistry* 55, 454–462.
<https://doi.org/10.1373/clinchem.2008.117093>.
2. Betzler, F., Viohl, L., Romanczuk-Seiferth, N., & Foxxe, J., 2017. Decision-making in chronic ecstasy users: a systematic review. *European Journal of Neuroscience*, 45(1), 34–44. [doi:10.1111/ejn.13480](https://doi.org/10.1111/ejn.13480).
3. Fernández, M. del M.R., Wille, S.M.R., Samyn, N., Wood, M., López-Rivadulla, M., De Boeck, G., 2009. High-Throughput Analysis of Amphetamines in Blood and Urine with Online Solid-Phase Extraction-Liquid Chromatography—Tandem Mass Spectrometry. *Journal of Analytical Toxicology* 33, 578–587.
<https://doi.org/10.1093/jat/33.9.578>.
4. Kolbrich, E.A., Goodwin, R.S., Gorelick, D.A., Hayes, R.J., Stein, E.A., & Huestis, M.A., 2008. Plasma pharmacokinetics of 3,4-methylenedioxymethamphetamine after controlled oral administration to young adults". *Therapeutic Drug Monitoring*, 30(3), 320–332. [doi:10.1097/FTD.0b013e3181684fa0](https://doi.org/10.1097/FTD.0b013e3181684fa0).
5. Substance Abuse and Mental Health Services Administration, 2012. National Survey on Drug Use and Health: Detailed tables. 2013a. Retrieved from <http://www.samhsa.gov/data/NSDUH/2012SummNatFindDetTables/DefTabs/NSDUH-DefTabsTOC2012.htm>.
6. Triswara, R., Carolia, N., 2017. Gangguan Fungsi Kognitif Akibat Penyalahgunaan Amfetamin 5. Majority 7(1).
7. Vlase, L., Popa, D.-S., Loghin, F., Leucuta, S.E., 2009. High-throughput toxicological analysis of Methamphetamine, MDA and MDMA from human plasma by LC-MS/MS. *Romanian Journal of Legal Medicine* 17, 213–220.