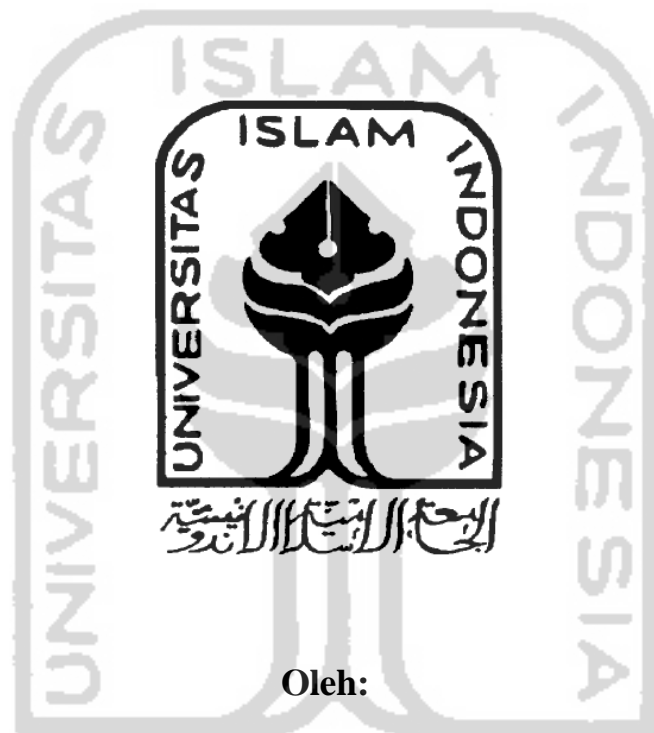


**KAJIAN METODE PREPARASI SAMPEL DAN DETEKSI
KARBAMAZEPIN DAN KARBAMAZEPIN-10,11-EPOKSIDA
DALAM CAIRAN HAYATI MENGGUNAKAN KCKT**

SKRIPSI



Oleh:

FIQIH DAHNIAR WIDIYANTI

16613001

**PROGRAM STUDI FARMASI
FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM
UNIVERSITAS ISLAM INDONESIA
YOGYAKARTA
JULI 2020**

**KAJIAN METODE PREPARASI SAMPEL DAN DETEKSI
KARBAMAZEPIN DAN KARBAMAZEPIN-10,11-EPOKSIDA
DALAM CAIRAN HAYATI MENGGUNAKAN KCKT**

SKRIPSI

Diajukan untuk memenuhi salah satu syarat mencapai gelar Sarjana Farmasi
(S.Farm)

Program Studi Farmasi Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam

Universitas Islam Indonesia Yogyakarta



Oleh:

FIQIH DAHNIAR WIDIYANTI

16613001

**PROGRAM STUDI FARMASI
FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM
UNIVERSITAS ISLAM INDONESIA
YOGYAKARTA
JULI 2020**

SKRIPSI
KAJIAN METODE PREPARASI SAMPEL DAN DETEKSI
KARBAMAZEPIN DAN KARBAMAZEPIN-10,11-EPOKSIDA
DALAM CAIRAN HAYATI MENGGUNAKAN KCKT

Yang diajukan oleh :

FIQIH DAHNIAR WIDIYANTI

16613001

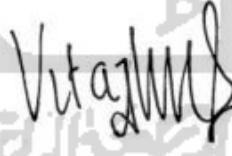
Telah disetujui oleh :

Pembimbing Utama,

Pembimbing Pendamping,



Ari Wibowo, M.Sc., Apt



Dr. Vitarani D. A. Ningrum, M.Si., Apt

SKRIPSI
KAJIAN METODE PREPARASI SAMPEL DAN DETEKSI
KARBAMAZEPIN DAN KARBAMAZEPIN-10,11-EPOKSIDA
DALAM CAIRAN HAYATI MENGGUNAKAN KCKT

Oleh:

FIQIH DAHNIAR WIDIYANTI
16613001

Telah lolos uji etik penelitian
dan dipertahankan di hadapan Panitia Penguji Skripsi
Program Studi Farmasi Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam
Universitas Islam Indonesia

Tanggal: 13 Juli 2020

Ketua Penguji : Dr. Farida Hayati, S.Si., M.Si., Apt. (.....) 
Anggota Penguji : Ari Wibowo, S.Si., M.Sc., Apt. (.....) 
Dr. Vitarani D. Ananda N., M.Si., Apt. (.....) 
Dr. Dwiwarso Rubiyanto, S.Si., M.Si. (.....) 

Mengetahui,
Dekan Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam
Universitas Islam Indonesia


Prof. Riyanto, S.Pd., M.Si., Ph.D.

PERNYATAAN

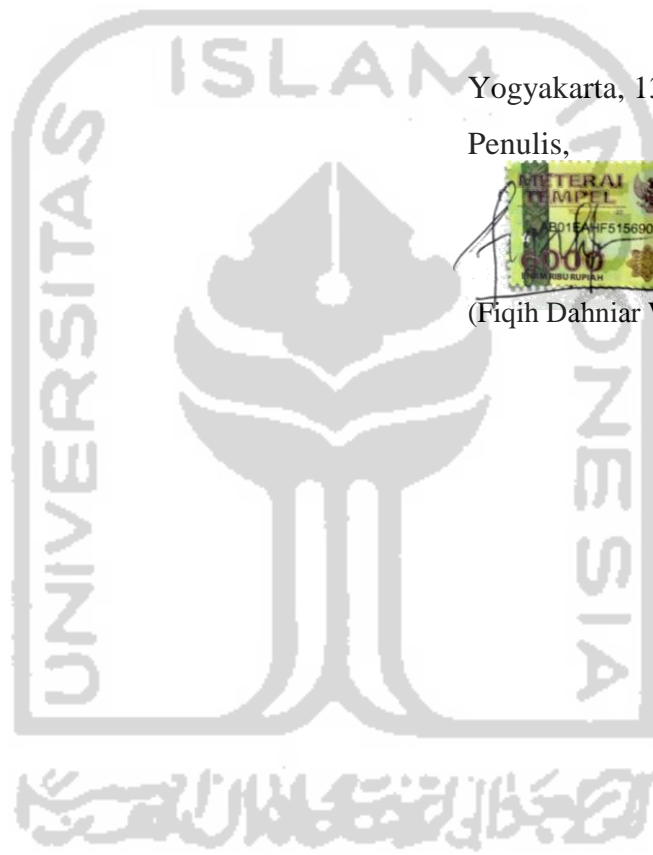
Dengan ini saya menyatakan bahwa dalam skripsi ini tidak terdapat karya yang pernah diajukan untuk memperoleh gelar kesarjanaan di suatu perguruan tinggi dan sepanjang pengetahuan saya, juga tidak terdapat karya atau pendapat yang pernah ditulis atau diterbitkan oleh orang lain kecuali yang secara tertulis diacu dalam naskah ini dan diterbitkan dalam daftar pustaka.

Yogyakarta, 13 Juli 2020

Penulis,

A green postage stamp with a value of 3000 Rupiah. The stamp features a signature in black ink. The text on the stamp includes "METERAI TEMPEL", "3000", and "RUPIAH". There is also a small circular emblem on the right side of the stamp.

(Fiqih Dahniar Widiyanti)



DAFTAR ISI

HALAMAN JUDUL.....	i
HALAMAN PERSETUJUAN.....	ii
HALAMAN PENGESAHAN.....	iii
HALAMAN PERNYATAAN ORISINALITAS.....	iv
DAFTAR ISI.....	v
INTISARI.....	vi
ABSTRACT.....	vii
1. Pendahuluan.....	1
2. Metode.....	2
3. Preparasi Sampel.....	2
3.1 Pengendapan Protein.....	3
3.2 Ekstraksi Cair-cair.....	5
3.3 Solid Phase Extraction (SPE).....	7
3.4 <i>Stir Bar Sorptive Extraction</i> (SBSE).....	13
4. Detektor.....	13
4.1 Detektor UV.....	13
4.2 Detektor MS.....	18
4.3 Perbandingan Metode Deteksi UV dan MS.....	22
5. Kesimpulan.....	23
DAFTAR PUSTAKA.....	24

KAJIAN METODE PREPARASI SAMPEL DAN DETEKSI KARBAMAZEPIN DAN KARBAMAZEPIN-10,11-EPOKSIDA DALAM CAIRAN HAYATI MENGGUNAKAN KCKT

Fiqih Dahniar Widiyanti

Program Studi Farmasi

INTISARI

Karbamazepin merupakan salah satu obat antiepilepsi yang memiliki indeks terapeutik sempit dan memiliki metabolit aktif yaitu karbamazepin-10,11-epoksida, sehingga pemantauan kadar obat dalam darah penting dilakukan. Pengembangan metode kromatografi khususnya KCKT untuk bioanalisis karbamazepin dan karbamazepin-10,11-epoksida sudah banyak dilakukan, pemilihan metode preparasi sampel dan deteksi merupakan hal penting dalam penggunaan metode KCKT. Pada kajian ini menyediakan rangkuman beberapa metode preparasi sampel dan deteksi menggunakan KCKT dalam berbagai sampel yang dapat digunakan sebagai acuan dalam pemilihan metode deteksi dan preparasi sampel untuk pemantauan kadar karbamazepin dan karbamazepin-10,11-epoksida dalam sampel biologis. Metode jelajah jurnal yang digunakan yaitu dengan melakukan pencarian pada *database google scholar, pubmed, dan science direct* dengan kata kunci *bioanalysis, carbamazepine, carbamazepine epoxide, HPLC, dan biological sample* sesuai dengan kriteria inklusi dan eksklusi. Hasil kajian dari 37 jurnal, preparasi sampel yang umum digunakan dalam analisis karbamazepin dan karbamazepin-10,11-epoksida yaitu pengendapan protein, *solid phase extraction (SPE)*, ekstraksi cair-cair, sedangkan metode deteksi yang umum digunakan yaitu UV dan *mass spectra (MS)*. Berdasarkan nilai *recovery*, efisiensi biaya dan waktu, pengendapan protein dan *Micro-extraction in packed sorbent (MEPS)* merupakan metode preparasi sampel yang efektif, sedangkan berdasarkan sensitivitas dan selektivitas deteksi MS lebih baik dibandingkan UV. Namun, penggunaan MS cukup mahal ketika digunakan untuk praktik klinis dibandingkan UV.

Kata kunci : karbamazepin, karbamazepin-10,11-epoksida, preparasi sampel, deteksi, KCKT

REVIEW OF METHOD SAMPLE PREPARATION AND DETECTION OF CARBAMAZEPINE AND CARBAMAZEPINE-10,11-EPOXIDE IN BIOLOGICAL SAMPLE USING HPLC

Fiqih Dahniar Widiyanti

Departement of Pharmacy

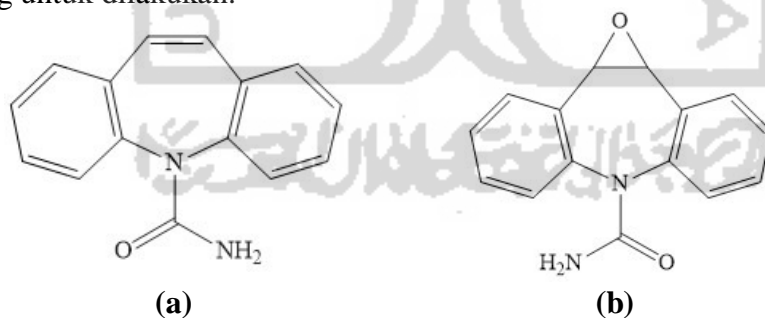
ABSTRACT

Carbamazepine is one of the antiepileptic drugs which has a narrow therapeutic index and an active metabolite, namely carbamazepine-10,11-epoxide, so it is necessary to monitor drug levels in the blood. The development of chromatography methods, especially HPLC for bioanalysis of carbamazepine and carbamazepine-10,11-epoxide has been commonly conducted, the selection of sample preparation methods and detection is essential in the use of the HPLC method. This study provides a summary of several methods of sample preparation and detection using HPLC in a various sample as a reference in the selection of sample preparation and detection methods for monitoring the level of carbamazepine and carbamazepine-10,11-epoxide of biological samples. The method of journal browsing used are by databases searching from google scholar, pubmed, and science direct, with the keywords bioanalysis, carbamazepine, carbamazepine epoxide, HPLC, and biological samples according to inclusion and exclusion criteria. The results of studies from 37 journals, sample preparation commonly used in the analysis of carbamazepine and carbamazepine-10,11-epoxide are precipitation protein, solid-phase extraction (SPE), and liquid-liquid extraction. However, detectors commonly used are UV and mass spectra (MS). Based on recovery values and efficiency of time and cost, precipitation protein and *Micro-extraction in packed sorbent* (MEPS) is an effective sample preparation method, while based on the sensitivity and selectivity, MS detector is better than UV. However, the use of MS is quite expensive for clinical practice compared to UV.

Keyword : carbamazepine, carbamazepine-epoxide, sample preparation, detection, HPLC

1. Pendahuluan

Epilepsi merupakan salah satu gangguan sistem syaraf yang menyerang lebih dari 50 juta orang di dunia dan 80% berasal dari negara berkembang salah satunya Indonesia (1). Data menunjukkan bahwa di Indonesia terdapat 2288 penderita epilepsi yang terdiri dari 487 kasus baru dan 1808 kasus lama (2). Salah satu obat lini pertama epilepsi yaitu karbamazepin (CBZ) (3). Karbamazepin memiliki kisaran terapeutik sempit yaitu 4–12 $\mu\text{g/mL}$, sehingga risiko kejadian subterapeutik dan toksisitas dapat terjadi. Hasil penelitian Shakya *et al.* ditemukan bahwa lebih dari 20% pasien mengalami kejadian subterapeutik dan toksisitas akibat karbamazepin (4). Karbamazepin juga bersifat *auto-inducer* yang menyebabkan peningkatan *clearance* obat sehingga terjadi penurunan kadar obat dalam plasma (5). Selain itu, peningkatan *clearance* akan merubah karbamazepin menjadi metabolitnya yaitu karbamazepin-10,11-epoksida (CBZE) yang masih aktif sebagai anti epilepsi dan mungkin akan terakumulasi di dalam tubuh pada penggunaan jangka panjang (6). Peningkatan *clearance* juga terjadi ketika karbamazepin dikombinasikan dengan vigabatrin, artinya karbamazepin juga dapat berinteraksi dengan obat anti epilepsi yang lainnya (7). Hal itu menyebabkan bahwa bioanalisis karbamazepin dan karbamazepin-10,11-epoksida penting untuk dilakukan.



Gambar 1. Rumus Struktur (a) Karbamazepin (b) Karbamazepin-10,11-Epoksida

Bioanalisis karbamazepin dan karbamazepin-10,11-epoksida dengan metode kromatografi sudah banyak dikembangkan. Salah satu metode kromatografi yang paling sering digunakan yaitu Kromatografi Cair Kinerja Tinggi (KCKT). Beberapa kajian tentang metode bioanalisis karbamazepin dan karbamazepin-10,11-epoksida dengan KCKT telah dilakukan pada tahun 2015

dan 2017 (8,9). Namun, kajian tentang metode preparasi sampel dan deteksi belum dibahas secara detail. Preparasi sampel merupakan salah satu bagian penting dalam metode kromatografi. karena dapat mengurangi gangguan pada profil kromatogram akibat adanya pengotor dalam sampel. Selain itu, proses preparasi sampel juga dapat menambah jangka pemakaian alat kromatografi.

Kajian ini memuat tentang rangkuman berbagai metode preparasi sampel dan deteksi yang digunakan untuk bioanalisis karbamazepin dan karbamazepin-10,11-epoksida menggunakan KCKT. Pada kajian ini juga menyajikan diskusi berbagai metode KCKT khususnya preparasi sampel yang sudah dipublikasikan untuk dapat membantu penerapan pemantauan kadar obat dalam praktik klinis dengan menggunakan metode KCKT. Selain itu, kajian ini dapat membantu dalam pengembangan metode yang lebih efektif dalam pemantauan kadar karbamazepin dan karbamazepin-10,11-epoksida dalam sampel biologis.

2. Metode

Sumber referensi yang digunakan dalam kajian ini yaitu berupa artikel ilmiah yang didapatkan dari pencarian melalui database seperti google scholar, PubMed, dan science direct dengan kata kunci *bioanalysis*, *carbamazepine*, *carbamazepine epoxide*, HPLC, dan *biological sample*. Kriteria inklusi yang digunakan yaitu artikel merupakan artikel penelitian, terpublikasi dalam bahasa inggris, membahas tentang bioanalisis karbamazepin dan karbamazepin-10,11-epoksida dengan KCKT, dan menggunakan sampel biologis manusia secara in vitro.. Kriteria eksklusinya yaitu artikel tidak tersedia dalam *full papper*, dan tidak terdapat parameter *recovery*. Setelah dilakukan pencarian, didapatkan artikel yang sesuai kriteria yaitu sebanyak 37 artikel. Selain menggunakan 37 artikel tersebut digunakan juga referensi penunjang sebanyak 11 referensi.

3. Preparasi Sampel

Preparasi sampel merupakan proses sebelum sampel diinjeksikan ke sistem kromatografi. Tujuan preparasi sampel yaitu untuk meminimalkan adanya pengotor yang akan mengganggu proses analisis dengan mengeliminasi komponen-komponen selain analit. Efisien tidaknya suatu metode preparasi sampel dapat dilihat dari nilai perolehan kembali atau *recovery* dengan nilai keberterimaan

$\pm 100\%$. Sampel yang paling umum digunakan dalam bioanalisis karbamazepin dan karbamazepin-10,11-epoksida yaitu plasma dan serum manusia. Namun, tersedia juga metode kromatografi untuk bioanalisis karbamazepin dan karbamazepin-10,11-epoksida dalam sampel saliva, urin dan *dried blood sample* (DBS).

3.1 Pengendapan Protein

Pengendapan protein merupakan salah satu metode preparasi sampel dengan menggunakan suatu pelarut organik atau asam yang berfungsi untuk mengendapkan protein dalam suatu sampel biologis. Metode ini cukup sederhana, hemat waktu dan hemat biaya karena hanya menggunakan pelarut organik atau asam. Beberapa pelarut yang digunakan pada metode pengendapan protein yaitu asetonitril (10–17), metanol (18–20), aseton (21), kloroform (22), dan campuran metanol-air-asam format (23). Pelarut yang paling banyak digunakan untuk mengendapkan protein pada bioanalisis karbamazepin dan karbamazepin-10,11-epoksida yaitu asetonitril. Berdasarkan tabel 1, penggunaan asetonitril sebagai reagen pengendap memberikan nilai *recovery* diatas 90%. Bahkan *recovery* sekitar $\pm 100\%$ ditunjukkan oleh Yoshida *et al.* dengan menggunakan asetonitril sebagai reagen pengendap pada sampel serum bayi (13), sedangkan hanya penelitian oleh Bhati *et al.* yang mendapatkan *recovery* 79% dengan menggunakan reagen pengendap asetonitril (11). Pengaruh pH pada saat proses ekstraksi terhadap pemisahan analit dalam sampel diteliti oleh Kim *et al.* (16). Kim *et al.* menyebutkan bahwa campuran asetonitril dan 5 M amonium format pH 7,8 memberikan pemisahan pada sistem kromatografi yang lebih baik daripada campuran metanol-asam asetat, asetonitril-asam asetat, dan asetonitril-asam format.

Pelarut kedua yang sering digunakan dalam metode pengendapan protein yaitu metanol. Jika dibandingkan dengan asetonitril hasil nilai *recovery* metanol tidak jauh berbeda dengan asetonitril yaitu rata-rata diatas 90%, karena metanol dan asetonitril merupakan pelarut yang sering sekali digunakan sebagai reagen pengendap. Campuran metanol, air, dan asam format juga dilakukan oleh Shokry

et al. pada sampel DBS dengan nilai *recovery* 89% untuk karbamazepin dan 92,2% untuk karbamazepin-10,11-epoksida (23).

Pelarut lain yang digunakan dalam metode pengendapan protein untuk penentuan kadar karbamazepin dan karbamazepin-10,11-epoksida yaitu kloroform dan aseton (21,22). Kedua pelarut tersebut juga memberikan nilai *recovery* yang baik yaitu di atas 90% sama seperti asetonitril maupun metanol. Namun penggunaan pelarut tersebut sangat jarang digunakan karena berbahaya jika terhirup dan terkena mata, sehingga dibutuhkan lemari asam ketika menggunakan pelarut tersebut. Hal itu menjadi kendala pada laboratorium yang tidak memiliki fasilitas lemari asam.

Tabel 1. Metode Pengendapan Protein

Analit	Sampel Matriks	Reagen Pengendap	<i>Recovery</i>	Ref
CBZ, CBZE, PHT, PB, PRM	Serum	Asetonitril	CBZ (97,21%) CBZE (98,45%)	(10)
CBZ, CBZE, PHT	Plasma	Asetonitril	lebih dari 79%	(11)
CBZ, CBZE, OXC, PHT, PB, 10-OH-CBZ	Serum	Asetonitril	CBZ (96,52%) CBZE (94,45%)	(12)
CBZ, CBZE, ZNS	Serum	Asetonitril	CBZ (100,02%) CBZE (100,72%)	(13)
CBZ, CBZE dan metabolit CBZ lainnya	Plasma	Asetonitril	CBZ (84,65%) CBZE (90,01%)	(14)
CBZ	Serum	Asetonitril	CBZ (93,1%)	(15)
CBZ, CBZE	Plasma	Asetonitril	CBZ (92,6%) CBZE (90,45%)	(16)
CBZ, CBZE	Serum	Asetonitril	CBZ (101,28%) CBZE (tidak disebutkan)	(17)
CBZ, CBZE	Plasma	Metanol	CBZ (92,5%) CBZE (tidak disebutkan)	(18)
CBZ dan CBZE serta 20 OAE lainnya	Plasma	Metanol	CBZ (102,67%) CBZE (101,67%)	(19)

Tabel 1. Lanjutan

Analit	Sampel Matriks	Reagen Pengendap	Recovery	Ref
CBZ	Plasma	Metanol	CBZ (92,16%)	(20)
CBZ, CBZE, OXC	Plasma	Aseton	CBZ (90%) CBZE (98%)	(21)
CBZ	Plasma	Kloroform	CBZ (94%)	(22)
CBZ dan CBZE	DBS	MeOH:air: asam format (80:20:0.1, v/v/v)	CBZ (89%) CBZE (92,2%)	(23)

Keterangan	a) CBZ	: Karbamazepin	h) 10-OH-CBZ	: 10-hidrokarbamazepin
	b) CBZE	: Karbamazepin-10,11-epoksida	i) LEV	: Leviteracetam
	c) PHT	: Fenitoin	j) VPA	: Asam valproat
	d) PB	: Fenobarbital	k) GBP	: Gabapentin
	e) PRM	: Primidon	l) OAE	: Obat antiepilepsi
	f) LTG	: Lamotrigin		
	g) OXC	: Okskarbazepin		

Berdasarkan tabel 1, dapat diketahui bahwa metode pengendapan protein memiliki *recovery* yang cukup bagus yaitu diatas 90% dengan berbagai pelarut. Nilai *recovery* rendah hanya terdapat pada penelitian yang dilakukan Bhati *et al.* yaitu 79% dan Jiang *et al.* yaitu sekitar 84% untuk karbamazepin dan 90% untuk karbamazepin-10,11-epoksida (11,14). Kekurangan metode ini yaitu hanya protein dalam sampel saja yang bisa dihilangkan sehingga masih ada senyawa endogen yang tersisa dalam *supernatant* yang dapat mengganggu proses pemisahan dalam sistem kromatografi. Oleh karena itu, perlu dilakukannya pengembangan metode pemisahan.

3.2 Ekstraksi Cair-cair

Penggunaan ekstraksi cair-cair dalam penentuan kadar karbamazepin dan karbamazepin-10,11-epoksida cukup banyak karena metode ekstraksi cair-cair merupakan metode ekstraksi yang mudah. Pelarut organik yang sering digunakan yaitu etil asetat karena memiliki tingkat kepolaran yang hampir sama dengan karbamazepin. Hal tersebut dibuktikan oleh penelitian Kishore *et al.*, Van rooyen

et al., dan Ates *et al.* dengan hasil *recovery* di atas 90% untuk karbamazepin dan diatas 95% untuk karbamazepin-10,11-epoksida (24–26).

Penggunaan pelarut yang lebih non-polar dibandingkan etil asetat juga telah diteliti sebagai agen pengelusi pada metode ekstraksi cair-cair yaitu kloroform, diklorometan, dietileter, dan metil ter-butileter (27–31). Namun, semi-polar penggunaan pelarut tersebut mengakibatkan nilai *recovery* tidak cukup bagus jika dibandingkan dengan pelarut etil asetat yaitu hanya di bawah 90% (29,30). Hal tersebut terjadi karena pelarut tersebut lebih non-polar sedangkan karbamazepin memiliki sifat semi-polar sehingga analit tidak semuanya larut dalam fase organik. Diklorometan, metil ter-butileter, dan dietil eter merupakan jenis pelarut yang beracun sehingga penggunaannya untuk pemantauan kadar karbamazepin dan karbamazepin-10,11-epoksida pada laboratorium yang tidak memiliki lemari asam akan sangat berbahaya.

Tabel 2. Ekstraksi Cair-cair

Analit	Sampel Matriks	Pelarut	<i>Recovery</i>	Ref
CBZ, PHT, dan PB	Serum	Etil asetat	CBZ (102,9 %)	(24)
CBZ dan CBZE	Plasma	Etil asetat	CBZ (95%) CBZE (101%)	(25)
CBZ	Saliva dan serum	Klorofom	CBZ (serum 97,59%) (saliva 92,30%)	(27)
CBZ dan CBZE	Plasma	Kloroform	CBZ Plasma (91,9%) CBZE (87,35%)	(28)
CBZ LTG PRM PB	Serum	Dietileter	CBZ (80,7%)	(30)
CBZ dan CBZ E	Plasma	Metil ter-butil eter	CBZ (96,7 %) CBZ E (85,6%)	(31)

Penggunaan pengendapan protein sebelum ekstraksi cair-cair digunakan oleh beberapa peneliti. Hasil *recovery* yang dihasilkan tidak jauh berbeda dengan yang tanpa menggunakan pengendapan protein terlebih dahulu. Namun, terlihat berbeda ketika dilihat dari profil hasil kromatogram. Penggunaan pengendapan protein sebelum metode ekstraksi cair-cair memberikan hasil kromatogram yang

bersih dari gangguan matriks biologis. Puncak matriks biologis muncul pada 2 menit awal sehingga tidak tumpang tindih dengan analit (26).

Tabel 3. Ekstraksi Cair-cair setelah Pengendapan Protein

Analit	Sampel Matriks	Reagen pengendap	Pelarut	% <i>recovery</i>	Ref
CBZ CBZE	Plasma	Asetonitril	Etil asetat	CBZ (91,47) CBZE (95,05)	(26)
CBZ	Plasma	Asetonitril	Dikloro-metan	CBZ (87%)	(29)

3.3 Solid Phase Extraction (SPE)

Metode SPE merupakan salah satu metode ekstraksi yang sering digunakan untuk penentuan kadar karbamazepin dan karbamazepin-10,11-epoksida dalam berbagai sampel biologis terutama pada KCKT detektor UV. Penggunaan SPE menghasilkan selektivitas yang lebih baik dan sampel ekstrak yang jauh lebih bersih sehingga meminimalkan adanya gangguan matriks endogen saat pemisahan pada sistem kromatografi. Rangkuman penggunaan SPE dalam berbagai penelitian tersaji dalam Tabel 2.

Oasis HLB merupakan jenis *catridge* yang sering digunakan pada metode SPE dalam penetapan kadar karbamazepin dan karbamazepin-10,11-epoksida (32–39). Kandungan komponen hidrofilik dan lipofilik pada *sorbent* oasis HLB membuat *catridge* ini ideal untuk analit yang asam, basa, dan netral karena stabil pada pH 0-14. Penggunaan oasis HLB pada penetapan kadar karbamazepin dan karbamazepin-10,11-epoksida memberikan nilai *recovery* diatas 90-100% (34–36,39). Jenis *catridge* yang lain juga digunakan dalam beberapa penelitian dan memberikan nilai *recovery* yang baik, untuk lebih jelasnya dapat dilihat pada tabel 4.

Tabel 4. Metode *Solid Phase Extraction* (SPE)

Analit	Sampel Matriks	cartridges	Peng-kondisian	Pencucian	Peng-elusi	Recovery	Ref
CBZ, OXC	Plasma	Oasis HLB	1 mL metanol, 1 mL ACN dan 1 mL air-ACN (95:5%)	Air: Metanol (90:10, v/v)	1 mL etil asetat	CBZ (85,86%) CBZE (87,77%)	(32)
CBZ, CBZE, PRM, LTG, PB, Lic, OXC, PHT transdiol	Plasma	Oasis HLB	1 mL metanol, 1 mL ACN dan 1 mL air:ACN (95:5, v/v)	1 mL air	1 mL etil asetat	CBZ (87,90%) CBZE (88,38%)	(33)
CBZ, CBZE dan metanolit lainnya	Plasma	Oasis HLB	2 mL metanol dan 2 mL air	2 mL air dan 100 μ L metanol	Tetrahydrofuran (THF)	CBZ (96,7%) CBZE (90,8%)	(34)
CBZ, CBZE, PHT, ZNS, PRM, PB, LTG	Serum	Oasis HLB	1 mL metanol dan 1 mL Air	2 mL air	0,1 mL ACN : MeOH (7:3, v/v)	CBZ (100%) CBZE (102%)	(35)
CBZ dan CBZE	Plasma	Oasis HLB	1 mL metanol dan 1 mL air	1 mL 5% MeOH	500 μ L MeOH	CBZ (98,97%) CBZE (99,33%)	(36)
CBZ, CBZE, LEV, LTG, PB	DBS 30 μ L	Oasis HLB	1 mL metanol dan 1 mL air	1 mL air	1 mL MeOH: ACN(3:1,v/v)	CBZ (87,9%) CBZE (96,54%)	(37)
CBZ, CBZE, OXC, LTG, PB, PRM, PHT	Plasma	Oasis HLB	1 mL metanol	1 mL air	1 mL MeOH	CBZ (93%) CBZE (96%)	(38)
CBZ CBZE	Plasma	Oasis HLB	1 mL MeOH dan 1 mL bufer fosfat 10 M pH 7,0	1 mL campuran MeOH : 10 mM bufer fosfat pH 7 (20:80, v/v)	0,5 mL campuran an ACN : bufer fosfat (60:40, v/v)	CBZ (94,6%) CBZE (97,9%)	(39)

Tabel 4. Lanjutan

Analit	Sampel Matriks	catridges	Peng-kondisian	Pencucian	Peng-elusi	Recovery	Ref
CBZ CBZE	Plasma dan air susu ibu	Sep-Pak C ₁₈	5 mL air dan 20% MeOH	5 mL air dan 20% MeOH	5 mL 60% metanol	CBZ (93,6% , ASI) (94,6% , plasma) CBZ E (95,6% , ASI) (96,01% , plasma)	(40)
CBZ, CBZ E, LTG, OXC	Plasma	Isolute C ₈	3 mL MeOH 3mL air	3 mL air	3 mL metanol	CBZ (95,78 - 102,84%) CBZE (97,54-101,87%)	(41)
CBZ, CBZE, PHT, LTG, Zonisamide , Topiramat	Plasma	Strata-X 30-mg (Phenom enex) hidrofilik	1 mL metanol dan 1mL 20 M dapar asetat	1 mL 2% metanol dan 1 mL larutan dapar asetat	20 M dapar amoni-um asetat	CBZ (87,7%) CBZE (94,4%)	(42)

Proses pencucian pada prosedur SPE merupakan hal yang penting yang bertujuan untuk membuang senyawa-senyawa yang tidak dibutuhkan sehingga didapatkan sampel yang bersih dari pengotor. Pada penetapan karbamazepin dan karbamazepin-10,11-epoksida, pelarut seperti air, metanol, larutan dapar, ataupun kombinasi air dan metanol sering digunakan pada proses pencucian (32,33,35,36,39–41). Namun air merupakan agen pembersih yang memiliki nilai *recovery* yang baik yaitu 100% (35). Air dipilih karena kemungkinan analit yaitu karbamazepin dan karbamazepin-10,11-epoksida untuk ikut larut didalamnya sangat kecil, sebab karbamazepin praktis tidak larut dalam air sehingga karbamazepin tetap berada pada sorbent.

Metanol dan etil asetat merupakan pelarut yang banyak digunakan untuk proses elusi pada ekstraksi karbamazepin dan karbamazepin-10,11-epoksida (32,33,36,40,41,43,44). Pemilihan larutan untuk mengelusi analit harus memperhatikan sifat kepolaran analit. Hal tersebut bertujuan agar analit tersebut larut dalam larutan pengelusi dan terlepas dari *catridge*. Penggunaan etil asetat

sebagai agen pengelusi sudah diteliti dan hasil *recovery* karbamazepin dan karbamazepin-10,11-epoksida tidak lebih dari 90% (32,33). Hasil nilai *recovery* berbeda ditunjukkan dengan menggunakan metanol sebagai pengelusi, yaitu rata-rata diatas 90% dalam berbagai *catridge*. Shimoyama *et al.* menggunakan metanol sebagai pengelusi dengan *catridge* C¹⁸ menghasilkan *recovery* untuk karbamazepin sebesar 91,1-98% dalam ASI dan 90,6-97,1% dalam plasma, sedangkan untuk karbamazepin-10,11-epoksida 88,9-99,5% dalam ASI dan 92,1-104% dalam plasma (40). Metanol juga digunakan untuk mengelusi karbamazepin dan karbamazepin-10,11-epoksida dari *catridge* oasis HLB dan C⁸ dalam sampel plasma dan menghasilkan nilai *recovery* lebih dari 95% untuk karbamazepin dan lebih dari 97% untuk karbamazepin-10,11-epoksida (36,41). Vermeij *et al.* menggunakan campuran metanol dengan asetonitril sebagai agen pengelusi dan menghasilkan nilai *recovery* 100% untuk karbamazepin dan 102% karbamazepin-10,11-epoksida (35). Pelarut lain yang digunakan sebagai pengelusi yaitu *tetrahydrofuran* (THF), namun penggunaannya mengakibatkan puncak yang dihasilkan melebar sehingga dibutuhkan proses *vaccum* untuk menguapkan THF agar tidak mengganggu proses pemisahan dalam sistem kromatografi (34). Penggunaan larutan dapar juga telah diteliti sebagai agen pengelusi dalam metode ekstraksi SPE (39,42).

Kelebihan SPE jika dibandingkan dengan metode ekstraksi pengendapan protein yaitu kemungkinan pengembangan SPE lebih besar seperti *on-line* SPE, dan *micro-extraction in packed sorbent* (MEPS) (43-45). Namun, karena terdapat beberapa proses seperti pengkondisian, pencucian, dan elusi, waktu yang dibutuhkan ketika menggunakan metode SPE menjadi lama. Rangkuman keterbaruan SPE dapat dilihat pada tabel 5.

Tabel 5. Metode keterbaruan dari SPE

Metode	Analit	Sampel Matriks	catridges	Peng-kondisian	Pen-cucian	Peng-elusi	Recovery	Ref
SPE <i>on-line</i>	LTG PHT PB CBZ dan CBZE	Plasma	Water Oasis HLB	-	ACN:10 M dapar amoniu m asetat pH 3,5 (2:98 , v/v)	20% ACN	CBZ (98,46%) dan CBZE (93,5%)	(45)
MEPS	CBZ OXC PHT PRM	Plasma dan Urin	Sorben Octa- decyl Silica	100µL MeOH dan 100µL air	50 µL air	35µL MeOH	CBZ Plasma (94,4%) CBZ urin (95,7%)	(43)
MEPS	CBZ CBZE LTG OXC	Plasma	Sorben Octa- decyl Silica	3 x 200µL MeOH dan 3x 200 µL Air	200 µL air	3 x 20µL MeOH	CBZ (88,1%) CBZE (91%)	(44)

Keterangan Lic : Licarbazepin
 ACN : Asetonitril
 MeOH : Metanol

Salah satu keterbaruan dari SPE yaitu *on-line* SPE, prosedur tersebut tidak memerlukan *pre-treatment* sampel sehingga sampel langsung diinjeksikan ke sistem kromatografi. Kebanyakan prosedur SPE *on-line* terdiri dari kolom SPE yang digabungkan dengan sistem kromatografi dengan detektor *mass spectra* (MS) (46). Qu *et al.* telah melakukan penelitian dengan menggunakan *on-line* SPE pada sistem kromatografi. Metode ini menggunakan satu kolom untuk ekstraksi dan satu kolom untuk analisis. Proses yang dilakukan hampir sama dengan SPE konvensional yaitu terdapat proses pengkondisian, pencucian dan pengelusan. Qu *et al.* menggunakan asetonitril dan dapar ammonium asetat 10 mM 2:98 (v / v, pH = 3.5) sebagai agen pencuci dan 20% sebagai agen pengelusi. Total waktu yang dibutuhkan untuk proses ekstraksi dan elusi yaitu waktu 13 menit tiap sampel. Nilai perolehan kembali atau *recovery* CBZ dan CBZE dengan metode ini yaitu di atas 90% dengan penggunaan sampel plasma yang sedikit yaitu 10 µL (45). Metode *on-line* SPE ini merupakan metode yang cepat karena tidak memerlukan

waktu untuk preparasi sampel. Namun, biaya untuk menggunakan online SPE ini mahal sehingga cukup sulit penggunaannya untuk praktik kesehatan secara rutin terutama pada laboratorium yang kecil.

Micro-extraction in packed sorbent (MEPS) merupakan keterbaruan dari metode ekstraksi SPE, namun *cartridge* yang digunakan berbeda. MEPS menggunakan *cartridge* berupa sorben padat seberat 4 mg yang dimasukkan ke dalam *syringe* sehingga pelarut yang digunakan jauh lebih sedikit. Rani *et al.* dan Ferreira *et al.* menggunakan *octadecyl silica* sebagai sorben dalam proses ekstraksi karbamazepin dengan metode MEPS (43,44). Berbeda dengan Rani *et al.*, pada penelitian yang dilakukan Ferreira *et al.* dilakukan proses preparasi sampel pengendapan protein dengan asetonitril sebelum sampel dimasukkan ke dalam MEPS. Hal tersebut dilakukan agar memperoleh hasil kromatogram yang lebih bersih, namun hasil kromatogram antara Rani *et al.* dan Ferreira *et al.* tidak jauh berbeda (43,44). Kemudian, untuk cara pengoperasian MEPS hampir sama dengan SPE pada umumnya yaitu pengkondisian, sampel dimasukkan, pencucian dan proses elusi. Namun, hal yang membedakan antara SPE dan MEPS yaitu jumlah pelarut yang digunakan dalam MEPS jauh lebih sedikit dibandingkan dengan SPE. Selain pelarut yang digunakan sedikit, proses ekstraksi dengan MEPS hanya membutuhkan waktu 1,5 menit tiap sampel. Jauh berbeda dengan SPE konvensional yang membutuhkan 10-20 menit tiap sampel (43).

Dalam metode MEPS *recovery* dapat ditingkatkan dengan meningkatkan siklus ekstraksi yaitu dengan cara melewati sampel ke dalam *syringe* secara berulang, Rani *et al.* menyebutkan bahwa peningkatan *recovery* terjadi sampai 10 kali siklus setelah 10 siklus tidak terdapat peningkatan *recovery*. Hal tersebut tidak bisa dilakukan dengan SPE karena sampel hanya bisa melewati *cartridge* sekali saja. Hasil *recovery* karbamazepin yang didapatkan oleh Rani *et al.* yaitu 94,4% pada plasma dan 95,7% pada urin (43), sedangkan *recovery* yang didapatkan Ferreira *et al.* 88,1% untuk karbamazepin dan 91% untuk karbamazepin-10,11-epoksida dalam sampel plasma (44). Hasil keduanya terlihat berbeda walaupun menggunakan agen pencuci dan pengelusi yang sama. Hal tersebut dapat dikarenakan adanya proses pengendapan protein sebelum MEPS

yang dilakukan oleh Ferreira et al., sehingga terjadi kemungkinan karbamazepin ikut terendapkan selama proses pengendapan protein.

3.4 *Stir Bar Sorptive Extraction (SBSE)*

SBSE merupakan salah satu metode ekstraksi terbaru untuk mengesktraksi karbamazepin dan karbamazepin-10,11-epoksida dalam sampel plasma yang digunakan oleh Queiroz *et al.* dalam penelitiannya. Prinsip metode SBSE yaitu pemisahan berdasarkan fase silikon dengan fase berair. Analit akan diekstraksi dengan menggunakan batang pengaduk magnet yang dilapisi dengan *polydimethylsiloxane* (PDMS) (47). Batang pengaduk magnet tersebut dilapisi dengan 22 µg PDMS. Proses ekstraksi dengan metode SBSE cukup mudah namun prosesnya lama, yaitu dengan menyiapkan 1 mL sampel *spiked* plasma dalam vial, kemudian batang pengaduk magnet dimasukkan ke dalam sampel lalu dilakukan proses pengadukan dengan kecepatan 1200 rpm selama 50 menit. Kemudian, batang pengaduk magnet diangkat lalu dicelupkan dalam pelarut asetonitril untuk proses desorpsi. Desorpsi dilakukan selama 50 menit. Setelah itu, batang pengaduk magnet diangkat dan larutan dievaporasi. Lalu, hasil evaporasi dilarutkan dengan fase gerak dan diinjeksikan ke sistem kromatografi (47).

Metode SBSE sangat dipengaruhi oleh suhu, lamanya proses ekstraksi dan desorpsi. Hal tersebut mengakibatkan proses ekstraksi dengan metode SBSE menjadi lama. Queiroz *et al.* menyebutkan bahwa hasil *recovery* terbaik didapatkan ketika melakukan ekstraksi selama 50 menit dan desorpsi selama 50 menit, sehingga ketika diterapkan untuk pengujian klinis secara rutin metode ini tidak sesuai karena prosesnya yang lama (47). Hasil *recovery* untuk karbamzepin dan karabamzepin 10,11 epoksida dengan SBSE yaitu 86,6% dan 82,2%, (47).

4. Detektor

4.1 Detektor UV

Analisis karbamazepin dan karbamazepin-10,11-epoksida dalam berbagai macam sampel biologis, pada umumnya menggunakan UV sebagai detektornya. Panjang gelombang yang umum digunakan untuk determinasi karbamazepin yaitu 285 nm dan 220 nm baik dengan UV atau DAD (20,22,27). Kemudian, untuk determinasi karbamazepin dan karbamazepin-10,11-epoksida menggunakan

panjang gelombang 214-254 nm (26,28,29,36,40), sedangkan panjang gelombang 205-240 nm digunakan untuk determinasi karbamazepin dan metabolit-metabolit lainnya, serta obat antiepilepsi lainnya (10,12,13,24,30,32–35,37,38,41,43,44,47). Panjang gelombang 210 nm juga digunakan untuk mendeteksi karbamazepin, karbamazepin-10,11-epoksida dan obat anti epilepsi lainnya (11,17,31,39). Pada penggunaan panjang gelombang 210 nm Dzodic *et al.* tidak menggunakan metanol sebagai campuran fase gerak metanol terabsorpsi pada panjang gelombang 210 nm sehingga menghasilkan puncak dengan resolusi dan simetris yang buruk (39). Namun, peneliti lain yang menggunakan panjang gelombang 210 nm tidak mengalami permasalahan tersebut (11,17,31).

Tabel 5. Deteksi dengan UV

Analit	Sampel Matriks	Fase gerak	Detektor	tR (menit)	LoQ (mg/L)	Linearitas (mg/L)	Ref
CBZ CBZE PHT PB PRM	Serum	Dapar potasium fosfat 0,01 M pH 7,0 : ACN: Metanol (110:50:30, v/v/v)	DAD 215 nm	CBZ (13,073) CBZE (7,783)	CBZ (0,78) CBZE (0,39)	CBZ (0,78-50) CBZE(0,39-25)	(10)
CBZ CBZE E PHT	Plasma	ACN: MeOH :Na fosfat pH 6,9; 0,05 M (18:18:64 v:v:v)	UV 210 nm	CBZ (11,8) CBZ-E (5,8) total 20 menit	CBZ (0,05)	CBZ (0,05 - 25,0).	(11)
CBZ CBZE OXC PHT PB, 10-OH-CBZ	Serum	Dapar Na Asetat (7 M, pH 7) : ACN (78:22 , v/v)	UV 240 nm	CBZE (6,57) CBZ (16,85)	CBZ (0,66) CBZE (2,35)	CBZ (0,5–100) CBZE (2–100)	(12)
CBZ CBZE ZNS	Serum	Dapar Kalium Fosfat (pH 4,6; 25 M) : MeOH: ACN(65:20:15, v/v/v)	UV 235 nm	CBZE (7,5) CBZ (16,0)	CBZ (0,5) CBZE (0,25)	CBZ (0,5–16) CBZE (0,25–8)	(13)
CBZ, CBZE, LTG, PB, PHT,	Serum	Dapar fosfat (10 mM) : MeOH: ACN: Aseton (55:22:12:11 ,v/v/v/v)	UV 210 nm	CBZ (8,85) CBZE (5,08)	CBZ dan CBZE (0,2)	CBZ dan CBZE (0,5-20)	(17)

Tabel 5. Lanjutan

Analit	Sampel Matriks	Fase gerak	Detektor	tR (menit)	LoQ (mg/L)	Linearitas (mg/L)	Ref
CBZ	Plasma	Dapar fosfat (0.1% Trietilamin, pH 3.0) : ACN: MeOH (60:30:10, v/v/v)	UV 220 nm	CBZ (2,6)	CBZ (0,122)	CBZ (0,5-40)	(20)
CBZ	Plasma	ACN: Air (50:50, v/v)	DAD 220 nm	CBZ (3,5) total 8	CBZ (0,5)	CBZ (0,5-16)	(22)
CBZ, PB, PHT	Serum	MeOH : Air : Asam asetat glasial (67:33:1, v/v/v)	UV 230 nm	CBZ (6,2)	CBZ (0,05)	CBZ (0,05 - 100)	(24)
CBZ	Plasma	ACN: Air (50:50, v/v)	DAD 220 nm	CBZ (3,5) total 8	CBZ (0,5)	CBZ (0,5-16)	(22)
CBZ CBZE	Plasma	ACN: MeOH: Dapar KH ₂ PO ₄ 0,01 M pH 4,6 (180:180:170, v/v/v)	UV 214 nm	CBZ (4,987) CBZE (2,263)	CBZ (0,05) CBZE (0,05)	CBZ dan CBZE (0,05 - 5)	(26)
CBZ	Saliva dan serum	MeOH: Air : Asam asetat (65:34:1, v/v/v)	UV 285 nm	CBZ (3,927, Saliva) (3,926, serum)	CBZ (0,168, saliva) (0,173, serum)	CBZ (0,1-5)	(27)
CBZ CBZE	Plasma	0,1M sodium fosfat: MeOH (49:51, v/v)	UV 225 nm	CBZ (7,0) CBZE (3,3)	CBZ (0,1)	CBZ dan CBZE (0,10-10,0)	(28)
CBZ	Plasma	ACN: isopropil alkohol: dapar fosfat pH: 3 (36:15:49 v/v/v)	UV 220 nm	CBZ (11,4)	CBZ (0,1)	CBZ (0,1 - 8,0)	(29)
CBZ LTG PRM PB	Serum	Air : ACN : MeOH : trietilamin (72:23:5: 0,1, v/v/v) pH 7.0	UV 220 nm	CBZ (14,789)	CBZ (1,24)	CBZ (0,625 -12,5)	(30)
CBZ dan CBZ E	Plasma	Air:MeOH:ACN (63:19:18, v/v/v)	UV 210 nm	CBZ (20,0) CBZ-E (9,8)	CBZ (0,01) CBZ E (0,005)	CBZ (0,01-10) CBZE (0,005-5)	(31)

Tabel 5. Lanjutan

Analit	Sampel Matriks	Fase gerak	Detektor	tR (menit)	LoQ (mg/L)	Linearitas (mg/L)	Ref
CBZ, CBZE, OXC	Plasma	Air : MeOH: ACN (64:30:6, v/v/v)	UV 235 nm	CBZ (6,98) CBZ E (2,8)	CBZ (0,05) CBZ E (0,1)	CBZ-E (0,10–30,0) CBZ (0,05–30,0)	(32)
CBZ, CBZE, PRM, LTG, PB, Lic, OXC, PHT transdi-ol	Plasma	Air:MeOH: ACN: Trietilamin (68,7:25:6:0,3, v/v/v/v)	UV 237 nm	CBZ (15,0) CBZ E (5,8)	CBZ (0,1) dan CBZ E (0,1)	CBZ dan CBZ E (0,1 -50)	(33)
CBZ, CBZE dan 3 metabolit lainnya	plasma	ACN: MeOH: dapar pospat 15 M pH 1,9 mengandung TEA (17,5:20:62,5 , v/v/v)	UV 237nm	CBZ (16,5) CBZE (8,9)	CBZ (0,006) CBZE (0,012)	CBZ (0,5–15,0) CBZE (0,0125-15)	(34)
CBZ, CBZE, PHT, Zonisamid, PRM, PB, LTG	Serum	MeOH: ACN: 25 M dapar fosfat (12,5 M, pH 6,2) (14,5:19,5:66 , v/v/v)	DAD 215 nm	CBZ (18,30) CBZE (8,60)	CBZ (0,030) CBZE (0,014)	CBZ (0-14,8) CBZE (0-6,26)	(35)
CBZ dan CBZ E	Plasma	Air:ACN (65:35, v/v)	DAD 220 nm	CBZ (4,793) CBZ-E (2,828)	CBZ (0,25) CBZE (0,1)	CBZ (0,25-20) CBZ-EP (0,1 - 10)	(36)
CBZ, CBZE, LEV, LTG, PB	DBS	A: 25 M dapar fosfat pH 6.2 B: ACN C: MeOH Teknik Gradient	UV 205 nm	CBZ (22,808) CBZE (13,535)	CBZ (0,258) CBZE (0,3)	CBZ dan CBZE (4-12)	(37)
CBZ, CBZE, OXC, LTG, PB, PRM, PHT	Plasma	MeOH:ACN:15 M dapar fosfat pH 3 (19,2:16,8:64, v/v/v)	DAD 237 nm	CBZ (11,5) CBZE (4,9)	CBZ (0,035) CBZE (0,05)	CBZ dan CBZE (2-40)	(38)
CBZ CBZE	Plasma	ACN: 10 M dapar fofsfat pH 7 (30:70, v/v)	DAD 210 nm	Total run time 8 menit	CBZ CBZE (0,02)	CBZ CBZE (0,2-25)	(39)

Tabel 5. Lanjutan

Analit	Sampel Matriks	Fase gerak	Detektor	tR (menit)	LoQ (mg/L)	Linearitas (mg/L)	Ref
CBZ CBZE	plasma dan air susu manusia	0.5% potassium dihidrogen fosfat (pH2.5) : ACN(67:33, v/v)	UV 254 nm	CBZ E (5,2) CBZE (9,1) (ASI dan plasma)	CBZ (0,01) CBZE (0,02)	CBZ (0,01-6) CBZE (0,02-6)	(40)
CBZ CBZ E LTG OXC	Plasma	Air : ACN: MeOH : (725:150: 125, v/v/v/)	UV 214 nm	CBZ (10,03) CBZ E (6,8)	CBZ (0,2) CBZE (0,2)	CBZ (0,3-60) CBZE (0,3-50)	(41)
CBZ OXC PTN PRM	Plasma dan urin	Air : ACN: MeOH (55:30:15, v/v/v)	UV 215 nm	CBZ Plasma (8,94) CBZ Urin (8,94)	CBZ (0,00036)	CBZ (0,001-0,5)	(43)
CBZ CBZE PHT PB LTG OXC	Plasma	ACN: metanol 94%: Trietilamin (73,2:26,5:0,3, v/v/v), pH 6,5	DAD 215 nm	CBZ (13,5) CBZE (4,9)	CBZ (0,1) CBZE (0,1)	CBZ (0,1-15) CBZE (0,1-5)	(44)
CBZ CBZE PHT PHB	Plasma	Air : ACN(78:22 , v/v)	UV 220 nm	CBZ (32,5) CBZE (10,1)	CBZ (0,08) CBZE (0,08)	CBZ (0,08-40) CBZE (0,08-40)	(47)

Detektor UV dan DAD merupakan kategori detektor yang mudah dalam cara pengoperasian. Hal tersebut sangat menguntungkan dalam penerapan TDM secara rutin. Berdasarkan tabel 5, dapat dilihat bahwa detektor UV dan DAD tidak hanya mampu menganalisis karbamazepin dan karbamazepin-10,11-epoksida saja tapi juga dapat menganalisis OAE lainnya dengan pemisahan yang baik. Penelitian yang dilakukan oleh Serralheiro *et al.* dapat menganalisis karbamazepin dan karbamazepin-10,11-epoksida serta 6 OAE lainnya dalam plasma (33), sedangkan Vermeij *et al.* dapat menganalisis karbamazepin dan karbamazepin-10,11-epoksida serta 5 OAE lainnya dalam serum manusia (35). Hal tersebut membuktikan bahwa selektivitas detektor UV dan DAD dikategorikan baik. Selain itu, nilai sensitivitas dengan menggunakan detektor UV dan DAD memiliki

rentang 0,00036 - 0,78 mg/L untuk karbamazepin dan 0,008 – 2,35 mg/L untuk karbamazepin-10,11-epoksida. Namun, proses analisis dengan detektor UV berdasarkan tabel 5 membutuhkan waktu cukup lama. Queiroz *et al.* membutuhkan waktu 32 menit untuk analisis karbamazepin dan 10 menit untuk karbamazepin-10,11-epoksida (47). Walaupun demikian, Rani *et al.* berhasil mengembangkan metode KCKT UV untuk menganalisis karbamazepin, fenobarbital, oxcarbazepin, pirimidon dalam plasma dan urin dengan waktu 12 menit tiap sampel (43). Hal yang serupa juga disampaikan oleh Fortuna *et al.* dalam penelitiannya, KCKT UV mampu melakukan analisis secara bersamaan karbamazepin, oxcarbazepin, eslicarbazepin, dan tiga metabolit karbamazepin dalam plasma dengan waktu pemisahan 10 menit (32).

4.2 Detektor MS

Penggunaan *mass spectra* untuk deteksi karbamazepin dan karbamazepin-10,11-epoksida dalam sampel biologis telah banyak dilakukan oleh beberapa peneliti. Kombinasi *electrospray ionization* (ESI) mode positif sebagai sumber ion dan *triple quadrupole* (TQD) sebagai analisis masa serta *multiple reaction monitoring* (MRM) sebagai mode pemantauan ion merupakan teknik yang banyak digunakan dalam determinasi karbamazepin dan karbamazepin-10,11-epoksida (14–16,19,23,25). Namun demikian, terdapat teknik lain dalam penggunaan MS seperti *heated electrospray ionization* (HESI) (45) dan *atmospheric pressure chemical ionization* (APCI) (42) sebagai sumber ion, *single quadrupole* (SQD) (21,42) dan orbitrap (45) sebagai analisa massa, dan *selected ion monitoring* (SIM) (21,42) dan *parallel reaction monitoring* (PRM) (45) sebagai mode pemantauan ion. Dalam penggunaan mode pemantauan ion MRM, diperoleh data spektrometri massa karbamazepin pada m/z 237>194 (14–16,18,19,23,25), sedangkan karbamazepin-10,11-epoksida pada m/z 237>181 (21), m/z 253>180 (15,18,19,23,25), dan m/z 253>210 (16). Terdapat perbedaan produk ion pada karbamazepin-10,11-epoksida, namun Van *et al.* mengatakan bahwa produk ion pada m/z 180 lebih stabil dibandingkan m/z 210 (25).

Breton *et al.* menggunakan ESI positif untuk sumber ion, *single quadrupole* sebagai analisa massa, dan SIM digunakan untuk menyajikan data

spektrum massa dengan m/z 237 untuk karbamazepin dan m/z 180 untuk karbamazepin 10,11. Waktu yang dibutuhkan dalam analisis dengan metode ini yaitu 50 menit dengan nilai LoQ 0,5 mg/L untuk karbamazepin dan 0,1 mg/L untuk karbamazepin-10,11-epoksida (21). Penggunaan *orbitrap* sebagai analisa massa dijabarkan oleh Qu *et al.* Sumber ion yang digunakan dalam metode ini menggunakan *heated electrospray ionization* (HESI) dan data spektrometri massa dijabarkan dengan mode pemantauan PRM dengan m/z 237>194 untuk karbamazepin dan m/z 253>210 untuk karbamazepin-10,11-epoksida. Waktu analisis yang dibutuhkan yaitu 13 menit tiap sampelnya dengan nilai LoQ 0,0016 mg/L untuk karbamazepin dan karbamazepin-10,11-epoksida (45). Metode sumber ion lainnya seperti APCI digunakan oleh Subramanian *et al.* dalam eterminasi karbamazepin dan karbamazepin-10,11-epoksida dengan teknik kromatografi MS. Berbeda dengan metode ESI, APCI merupakan jenis *hard method* dan cocok untuk senyawa yang non-polar. Subramanian *et al.* menggunakan SIM untuk memperoleh data spketrometri massa yaitu m/z 237 untuk karbamazepin dan m/z 253 untuk karbamazepin-10,11-epoksida. Nilai tersebut dipilih berdasarkan *base peak* atau ion yang memiliki intensitas tertinggi (42).

Berdasarkan data yang telah dijabarkan sebelumnya determinasi karbamazepin dan karbamazepin-10,11-epoksida dengan kromatografi MS banyak yang menggunakan ESI + sebagai sumber ion, hal tersebut disebabkan karena metode ESI sesuai untuk analit yang rentang kepolarannya polar sampai semi-polar (karbamazepin merupakan senyawa semi-polar). Berbeda halnya dengan APCI yang digunakan untuk senyawa yang non-polar (48). Analisa massa yang banyak digunakan yaitu *quadrupole* baik jenis *single* maupun *triple*, metode tersebut dipilih karena sensitivitas yang tinggi dan harga yang paling terjangkau diantara analisa massa yang lain. Namun demikian, secara umum tidak terdapat perbedaan yang signifikan diantara metode-metode yang telah dijabarkan sebelumnya.

Tabel 6. Deteksi dengan MS

Analit	Sampel Matriks	Fase gerak	Sumber pengion	Analisa massa	Parent Ion	Produk Ion	tR (menit)	LoQ (mg/L)	Linear-itas	Ref
CBZ, CBZE, dan 6 metabolit CBZ lainnya	Plasma	A: ACN B: 0,1% Asam formate dalam air elusi gradient	ESI +	TQD	CBZ (m/z 237) CBZE (m/z 237)	CBZ (m/z 194) CBZE (m/z 181)	CBZ (3,3) CBZE (3,7)	CBZ dan CBZE 0,005	CBZ 0,005-5 CBZE 0,005-5	(14)
CBZ	Serum	65% ACN+2M amonium asetat dan 0,1% asam format	ESI+	TQD	CBZ (m/z 237) CBZE (m/z 253)	CBZ (m/z 194) CBZE (m/z 180)	CBZ (0,78)	CBZ 0,005	CBZ (0,005-0,05)	(15)
CBZ, CBZE, VPA, GBP, LEV	Plasma	5 M dapar amonium format pH 7,8 : 90% ACN+5M amonium format (60:40, v/v)	ESI +	TQD	CBZ (m/z 237) CBZE (m/z 253)	CBZ (m/z 194) CBZE (m/z 210)	CBZ (8,63) CBZE (5,02)	CBZ 0,4 dan CBZE 0,2	CBZ 0,4-20 dan CBZE 0,2-10	(16)
CBZ dan CBZE	plasma dan saliva	0,1% Asam Format dalam air dan MeOH (35:65)	ESI +	TQD	CBZ (m/z 237) CBZE (m/z 253)	CBZ (m/z 194) CBZE (m/z 180)	CBZE (1,6), CBZ (2,2)	CBZ 1,1 dan CBZE 0,23	CBZ 1,1-17,6 dan CBZE 0,23-5,47	(18)
CBZ dan CBZE serta 20 OAE lainnya	plasma	A: 0,1% Asam Format B: MeOH Elusi gradient	ESI +	TQD	CBZ (m/z 237) CBZE (m/z 253)	CBZ (m/z 194) CBZE (m/z 180)	CBZE (4,20), CBZ (4,95)	CBZ 1,3 dan CBZE 0,9	CBZ 1,3-13,5 dan CBZE 0,9-23,8	(19)
CBZ, CBZE, OXC, dan 7 meta-bolit CBZ lainnya	Plasma	A: Asetonitril B: formate buffer (2 mM, pH 3) elusi gradien	ESI+	SQD	CBZ (m/z 237) CBZ (m/z 236)	CBZ (m/z 194) CBZE (m/z 180)	CBZ (21,9) CBZE (15,7)	CBZ 0,5 CBZE 0,1	CBZ 0,5-20 mg/L, CBZE 0,1-5 mg/L	(21)

Tabel 6. Lanjutan

Analit	Sampel Matriks	Fase gerak	Sumber pengion	Analisa massa	Parent Ion	Produk Ion	tR (menit)	LoQ (mg/L)	Linear-itas	Ref
CBZ dan CBZE	DBS	A: Air + 0,1% Asam format B: ACN+ 0,1% Asam Format gradien elusi	ESI +	TQD	CBZ (m/z 237) CBZE (m/z 237)	CBZ (m/z 194) CBZE (m/z 180)	CBZE (4,71), CBZ (4,75)	CBZ 1 dan CBZE 0,25	CBZ 1 mg/L - 40 mg/L dan CBZE 0,25 mg/L - 20 mg/L	(23)
CBZ CBZE	Plasma	ACN: MeOH : asam format (0.1%) (10:70:20, v/v).	ESI +	TQD	CBZ (m/z 237) CBZE (m/z 253)	CBZ (m/z 194) CBZE (m/z 180)	CBZ (2,65) CBZE(2 ,73)	CBZ 0,000722 dan CBZE 0,00515	CBZ 0,000722 - 10,644 mg/mL dan CBZE 0,00515 - 1,204 mg/mL	(25)
CBZ, CBZE, PHT, LTG, Zonisamide, Topiramet	Plasma	A: 20 M dapar asetat (pH 5.6) B: 61,3% ACN + 32,2% MeOH + 6,5% tetrahydrofuran gradien elusi	APCI	SQD	CBZ (m/z 237) CBZE (m/z 253)	-	CBZE (11,1), CBZ (15,8)	CBZ 0,00016 CBZE 0,00026	CBZ dan CBZE 0,3125–25	(42)
CBZ, CBZE, LTG, PHT, PB	Plasma	ACN : MeOH : 10M dapar amonium asetat (pH=5.5) elusi gradien	HESI	Orbitrap	CBZ (m/z 237) CBZE (m/z 253)	CBZ (m/z 194) CBZE (m/z 210)	CBZE (8,69), CBZ (9,85)	CBZ dan CBZE (0,0016)	CBZ dan CBZE 0,0016-1	(45)

Detektor MS merupakan detektor yang memiliki sensitivitas yang baik. Berdasarkan tabel 6, nilai terbesar LoQ didapatkan oleh Shibata *et al.* yaitu 1,3 mg/L untuk karbamazepin dan 0,9 mg/L untuk karbamazepin-10,11-epoksida (19). Sedangkan, nilai LoQ terendah yang didapatkan ketika menggunakan metode ini didapatkan oleh Van *et al* yaitu 0,000722 mg/L untuk karbamazepin dan 0,00515 mg/L untuk karbamazepin-10,11-epoksida (25). Selain sensitivitasnya yang baik, detektor MS juga memiliki selektivitas yang baik, dibuktikan dengan penelitian Shibata *et al.* yang mampu menganalisis karbamazepin dan karbamazepin-10,11-epoksida beserta 20 OAE lainnya dengan nilai LoQ 1,3 mg/L untuk karbamazepin dan 0,9 mg/L untuk karbamazepin-10,11-epoksida (42).

4.3 Perbandingan Metode Deteksi UV dan MS

Metode deteksi yang paling umum digunakan untuk analisis karbamazepin dan karbamazepin-10,11-epoksida dengan KCKT yaitu UV dan MS. Pengembangan metode KCKT UV dan MS sudah banyak dilakukan untuk menghasilkan metode yang efektif dan efisien, rangkuman metode-metode tersebut dapat dilihat dalam tabel 5 dan 6. Kedua metode deteksi tersebut memiliki kelebihan dan kekurangannya masing-masing. Berdasarkan tabel 5 dan 6, UV merupakan metode deteksi yang memiliki nilai sensitivitas dan selektivitas dibawah MS. Namun, UV memiliki nilai sensitivitas, selektivitas, dan rentang linearitas yang masih berada pada rentang terapeutik karbamazepin dan karbamazepin-10,11-epoksida, sehingga dapat digunakan untuk pemantauan obat dalam darah (PKOD). Selain itu, biaya yang dibutuhkan untuk menggunakan UV jauh lebih terjangkau daripada MS. Oleh karena itu, penggunaan deteksi UV cocok digunakan untuk kepentingan klinis seperti PKOD.

Kelebihan MS dibandingkan dengan UV yaitu memiliki nilai sensitivitas dan selektivitas yang lebih baik. Namun, semakin tinggi nilai sensitivitas MS maka rentang linearitas yang dihasilkan tidak sesuai dengan rentang terapeutik karbamazepin dan karbamazepin-10,11-epoksida, seperti yang didapatkan oleh Van *et al* (25). Hal tersebut mengakibatkan deteksi MS tidak cocok digunakan untuk PKOD karena selain metode yang digunakan harus *sensitive* dan selektif,

rentang linearitas juga harus sesuai dengan rentang terapi suatu obat. Oleh karena itu, penggunaan deteksi MS lebih sesuai untuk studi pengembangan metode Bioavailabilitas dan Bioekivalensi (BABE) dan farmakokinetika obat, karena kedua studi tersebut dibutuhkan metode yang sangat *sensitive* dan selektif.

5. Kesimpulan

Pengembangan metode berbasis kromatografi untuk mengukur kadar karbamazepin dan karbamazepin-10,11-epoksida saat ini terus dikembangkan untuk memberikan analisis yang akurat dan cepat, sehingga dapat diaplikasikan untuk pemantauan obat dalam darah. Beberapa hal penting dalam menggunakan metode KCKT yaitu pemilihan metode preparasi sampel dan deteksi. Berdasarkan kajian yang telah dilakukan, metode preparasi sampel yang dikaji rata-rata memiliki nilai *recovery* diatas 90%, sehingga ketika dibandingkan dari sisi biaya pengendapan protein merupakan metode yang paling hemat biaya. Namun, metode yang hemat dari sisi waktu yaitu MEPS karena waktu ekstraksi yang dibutuhkan hanya 1,5 menit tiap sampel. Sedangkan untuk metode deteksi, UV lebih sesuai untuk kepentingan klinis karena nilai sensitivitas, selektivitas, dan linearitas yang dihasilkan sesuai rentang terapetik karbamazepin dan karbamazepin-10,11-epoksida. Namun, karena MS memiliki nilai sensitivitas dan selektivitas yang jauh lebih baik daripada UV, maka deteksi MS cocok untuk studi pengembangan metode BABE dan farmakokinetika obat.

DAFTAR PUSTAKA

1. WHO. Epilepsy: A public health imperative. Geneva: World Health Organization; 2019. 9–17 p.
2. PERDOSSI. Pedoman Tatalaksana Epilepsi. 5th ed. Kusumastuti K, Gunadharna S, Kustiowati E, editors. Surabaya: Airlangga University Press; 2014. 1–89 p.
3. Patsalos PN, Ph D, Spencer EP, Berry DJ. Therapeutic Drug Monitoring of Antiepileptic Drugs in Epilepsi. *Ther Drug Monit.* 2018;40(5):526–48.
4. Shakya G, Malla S, Kn S, Shrestha R. Therapeutic Drug Monitoring of Antiepileptic Drugs. *J Nepal Med.* 2008;47(171):94–7.
5. Kudriakova TB, Sirota LEVA, Rozova GI, Gorkov VA. Autoinduction and steady-state pharmacokinetics of carbamazepine and its major metabolites. *Br J Clin Pharmacol.* 1992;33:611–5.
6. Tolou-Ghamari Z, Zare M, Habibabadi JM, Najafi MR. A quick review of carbamazepine pharmacokinetics in epilepsy from 1953 to 2012. *J Res Med Sci.* 2013;18(1):1–5.
7. Sánchez-Alcaraz A, Quintana MB, Lopez E, Rodriguez I, Llopis P. Effect of vigabatrin on the pharmacokinetics of carbamazepine. *J Clin Pharm Ther.* 2002;27(6):427–30.
8. Datar PA. Quantitative bioanalytical and analytical method development of dibenzazepine derivative, carbamazepine: A review. *J Pharm Anal.* 2015;5(4):213–22.
9. Tuchila C, Vlasceanu AM. Therapeutic Drug Monitoring and Methods of Quantitation for Carbamazepine. *Therapeutic Drug Monitoring and Methods of Quantitation for.* *J Mind Med Sci.* 2017;4(2):100–14.
10. Liu H, Delgado M, Eggers CM, Montoya JL. Simultaneous determination of carbamazepine, primidone and their principal metabolites by high-performance liquid chromatography with detection. *J Chromatogr B Biomed Sci Appl.* 1993;616(1):105–15.
11. Bhatti MM, Hanson GD, Schultz L. Simultaneous determination of phenytoin, carbamazepine, and 10, 11-carbamazepine epoxide in human plasma by high-performance liquid chromatography with ultraviolet. *J Pharm Biomed Anal.* 1998;16(7):1233–40.
12. Levert H, Odou P, Robert H. Simultaneous determination of four antiepileptic drugs in serum by high-performance liquid chromatography. *Biomed Chromatogr.* 2002;16(1):19–24.
13. Yoshida T, Imai K, Motohashi S. Simultaneous determination of zonisamide, carbamazepine and carbamazepine-10, 11-epoxide in infant serum by high-performance liquid chromatography. *J Pharm Biomed Anal.* 2006;41(4):1386–90.
14. Jiang W, Xia T, Yun Y, Li M, Zhang F. UHPLC-MS/MS method for simultaneous determination of carbamazepine and its seven major metabolites in serum of epileptic patients. *J Chromatogr B.* 2019;1108:17–24.
15. Hamid MEA, Phillips OA. Determination of Carbamazepine, Pindolol, and Theophylline in Human Serum. *J Liq Chromatogr Relat Technol.*

- 2007;26(12):1937–57.
16. Kim K, Seo K, Kim S, Kyung S, Kim D, Shin J. Simple and accurate quantitative analysis of ten antiepileptic drugs in human plasma by liquid chromatography / tandem mass spectrometry. *J Pharm Biomed Anal.* 2011;56(4):771–7.
 17. Patil KM, Bodhankar SL. Simultaneous determination of lamotrigine , phenobarbitone , carbamazepine and phenytoin in human serum by high-performance liquid chromatography. *J Pharm Biomed Anal.* 2005;39(1–2):181–6.
 18. Andonie D, Gáll Z, Bosa P, Dogaru MT, Vancea S. Simultaneous Determination of Carbamazepine and Carbamazepine- 10 , 11-epoxide in Different Biological Matrices by LC-MS / MS. *J Interdiscip Med.* 2017;2(3):211–8.
 19. Shibata M, Hashi S, Nakanishi H, Masuda S. Detection of 22 antiepileptic drugs by ultra- performance liquid chromatography coupled with tandem mass spectrometry applicable to routine therapeutic drug monitoring. *Biomed Chromatogr.* 2012;26(12):1519–28.
 20. Dural E, Cetin S, Bolayir A, Cigdem B. Development and validation of an HPLC method for determination of carbamazepine in human plasma and applications to a therapeutic drug monitoring study. 2020;50(1):6–15.
 21. Breton H, Cociglio M, Bressole F, Peyriere H, Pierre J, Hillaire-buys D. Liquid chromatography – electrospray mass spectrometry determination of carbamazepine , oxcarbazepine and eight of their metabolites in human plasma. *J Chromatogr B.* 2005;828(1–2):80–90.
 22. Budikayanti A, Chaliana C, Louisa M, Setiabudy R. Development and validation of carbamazepine plasma concentrations measurement and its application on epilepsy patients. *Int J Pharm Pharm Sci.* 2017;9(9):87–91.
 23. Shokry E, Villanelli F, Malvagia S, Rosati A, Forni G, Funghini S, et al. Therapeutic drug monitoring of carbamazepine and its metabolite in children from dried blood spots using liquid chromatography and tandem mass spectrometry. *J Pharm Biomed Anal.* 2015;109:164–70.
 24. Kishore P, Rajnarayana K, Reddy MS, Sagar JV, Krishna DR. Validated High Performance Liquid Chromatographic Method for Simultaneous Determination of Phenytoin , Phenobarbital and Carbamazepine in Human Serum. *Arzneimittelforschung.* 2003;53(11):763–8.
 25. Van Rooyen GF, Badenhorst D, Swart KJ, Hundt HKL, Scanes T, Hundt AF. Determination of carbamazepine and carbamazepine 10 , 11-epoxide in human plasma by tandem liquid chromatography – mass spectrometry with electrospray ionisation. *J Chromatogr B.* 2002;769(1):1–7.
 26. Ates Z, Ozden T, Ozilhan S, Toptan S. Simultaneous Determination of Carbamazepine and its Active Metabolite Carbamazepine-10 , 11-epoxide in Human Plasma by UPLC. *Chromatogr Suppl.* 2007;66:123–7.
 27. Đorđević S, Kilibarda V, Stojanović T. Determination of carbamazepine in serum and saliva samples by high performance liquid chromatography with ultraviolet detection. *Vojnosanit Pregl.* 2009;66(5):347–52.
 28. Miller RB, Vrandeć M. A Validated HPLC Method For the

- Determination of Carbamazepine and in Human Plasma. *J Liq Chromatogr.* 1993;16(6):1249–61.
29. Ezzeldin E, Shahtat AA, Basudan OA. Development and Validation of an HPLC Method for the Determination of Carbamazepine in Human Plasma. *Life Sci J.* 2013;10(4):2159–63.
 30. Budakova L, Brozmanova H, Grundmann M, Fischer J. Simultaneous determination of antiepileptic drugs and their two active metabolites by HPLC. *J Sep Sci.* 2008;31(1):1–8.
 31. Oh E, Ban E, Woo JS, Kim C. Analysis of carbamazepine and its active metabolite , carbamazepine-10 , 11-epoxide , in human plasma using high-performance liquid chromatography. *Anal Bioanal Chem.* 2006;386(6):1931–6.
 32. Fortuna A, Sousa J, Alves G, Falcão A, Soares-da-silva P. Development and validation of an HPLC-UV method for the simultaneous quantification of carbamazepine , oxcarbazepine , eslicarbazepine acetate and their main metabolites in human plasma. *Anal Bioanal chemstry.* 2010;394(4):1605–15.
 33. Serralheiro A, Alves G, Fortuna A, Rocha M, Falcão A. First HPLC – UV method for rapid and simultaneous quantification of phenobarbital , primidone , phenytoin , carbamazepine , oxcarbazepine and licarbazepine in human plasma. *J Chromatogr B.* 2013;925:1–9.
 34. Mandrioli R, Albani F, Casamenti G, Sabbioni C, Raggi MA. Simultaneous high-performance liquid chromatography determination of carbamazepine and five of its metabolites in plasma of epileptic patients. *J Chromatogr B Biomed Sci Appl.* 2001;762(2):109–16.
 35. Vermeij TAC, Edelbroek PM. Robust isocratic high performance liquid chromatographic method for simultaneous determination of seven antiepileptic drugs including lamotrigine , oxcarbazepine and zonisamide in serum after solid-phase extraction. *J Chromatogr B.* 2007;857(1):40–6.
 36. Ribarska JT, Sterjev Z, Cvetkovska E, Kuzmanovski I, Kiteva G, Suturkova L, et al. Optimization and validation of bioanalytical SPE – HPLC method for the simultaneous determination of carbamazepine and its main metabolite , carbamazepine-10 , 11-epoxide , in plasma. *Maced Pharm Bull.* 2012;57(1–2):53–61.
 37. Shah NM, Hawwa AF, Millership JS, Collier PS, Mcelnay JC. A simple bioanalytical method for the quantification of antiepileptic drugs in dried blood spots. *J Chromatogr B.* 2013;923–924:65–73.
 38. Bugamelli F, Sabbioni C, Mandrioli R, Kenndler E, Albani F, Raggi MA. Simultaneous analysis of six antiepileptic drugs and two selected metabolites in human plasma by liquid chromatography after solid-phase extraction. *Anal Chim Acta.* 2002;472(1–2):1–10.
 39. Džodi P, Živanovi L, Proti ANA, Ivanovi I, Kovi RVČ, Spasi M, et al. Development and validation of a solid phase extraction-HPLC method for the determination of carbamazepine and its metabolites , carbamazepine epoxide and carbamazepine trans -diol , in plasma. *J Serbian Chem Soc.* 2012;77(10):1423–36.

40. Shimoyama R, Ohkubo T, Sugawara K. Monitoring of carbamazepine and carbamazepine 10 , 11-epoxide in breast milk and plasma by high-performance liquid chromatography. *Ann Clin Biochem.* 2000;37(2):210–5.
41. Franceschi L, Furlanut M. A simple method to monitor plasma concentrations of oxcarbazepine , carbamazepine , their main metabolites and lamotrigine in epileptic patients. *Pharmacol Res.* 2005;51(4):297–302.
42. Subramanian M, Birnbaum AK, Rimmel RP. High-Speed Simultaneous Determination of Nine Antiepileptic Drugs Using Liquid Chromatography – Mass Spectrometry. *Ther Drug Monit.* 2008;30(3):347–56.
43. Rani S, Malik AK, Baldev S. Novel micro-extraction by packed sorbent procedure for the liquid chromatographic analysis of antiepileptic drugs in human plasma and urine. *J Sep Sci.* 2012;35(3):359–66.
44. Ferreira A, Rodrigues M, Oliveira P, Francisco J, Fortuna A, Rosado L, et al. Liquid chromatographic assay based on microextraction by packed sorbent for therapeutic drug monitoring of carbamazepine , lamotrigine , oxcarbazepine , phenobarbital , phenytoin and the active metabolites carbamazepine-10 , 11-epoxide and licarbazepine. *J Chromatogr B.* 2014;971:20–9.
45. Qu L, Fan Y, Wang W, Ma K. Development, validation and clinical application of an online-SPE-LC-HRMS/MS for simultaneous quantification of phenobarbital, phenytoin, carbamazepine, and its active metabolite carbamazepine 10, 11-epoxide. *Talanta.* 2016;158:77–88.
46. Ahuja S, Rasmussen H. HPLC Method Development for Pharmaceuticals Volume 8. 1st ed. Ahuja S, Rasmussen H, editors. Elsevier Academic Press; 2007.
47. Queiroz RHC, Bertucci C, Malfará WR, Dreossi SAC, Chaves AR, Valério DAR, et al. Quantification of carbamazepine, carbamazepine-10,11-epoxide, phenytoin and phenobarbital in plasma samples by stir bar-sorptive extraction and liquid chromatography. *J Pharm Biomed Anal.* 2008;48(2):428–34.
48. Agilent Technologies. Agilent LC-MS Primer. 2001. p. U.S.A 5988-2045EN.