

TEKNIK ISOTOPE DILUTION-MASS SPECTROMETRY DALAM ANALISIS SENYAWA ORGANIK: KAJIAN LITERATUR

Yosi Aristiawan^{1*}, Dyah Styarini²

¹ Pusat Riset dan Pengembangan SDM – Badan Standardisasi Nasional
Gedung 420 Kawasan Puspiptek Serpong, Tangerang Selatan, Indonesia

² Direktorat SNSU Termoelektrik dan Kimia – Badan Standardisasi Nasional
Gedung 420 Kawasan Puspiptek Serpong, Tangerang Selatan, Indonesia

* Untuk korespondensi: Tel/Fax (021)7560532, e-mail penulis*: yosi@bsn.go.id

ABSTRAK

Banyak keputusan yang berkaitan dengan masalah keamanan, kesehatan, dan kebijakan lainnya harus diambil berdasarkan hasil pengujian yang absah dalam menentukan keberadaan senyawa organik. Metode analisis dalam pengukuran kimia memiliki peranan penting dalam menyediakan hasil pengujian yang dapat dipercaya. Sehingga, metode analisis berakurasi tinggi sangat dibutuhkan sebagai salah satu pondasi jaminan hasil pengukuran. Teknik *isotope dilution-mass spectrometry* (ID-MS) diakui sebagai teknik analisis yang dapat memberikan akurasi dan presisi metode yang tinggi melalui penambahan senyawa isotopik dari target analit yang diukur, menyebabkan gangguan yang ada selama proses preparasi sampel dapat dihilangkan. Karena sifat metrologi berkualitas tinggi ini, teknik ID-MS, yang berkembang seiring dengan keuntungan analisis senyawa organik menggunakan detektor *mass spectrometry* (MS), dikenal sebagai metode primer dalam pengukuran kimia. Kajian literatur ini menyampaikan prinsip dasar, perkembangan dan karakteristik ID-MS, tantangan ID-MS dalam penentuan senyawa organik di beberapa matriks sampel, serta aplikasi ID-MS terkini di bidang metrologi kimia, khususnya dalam mengkarakterisasi bahan acuan bersertifikat (*Certified Reference Material*).

Kata kunci: *isotope dilution-mass spectrometry; analisis senyawa organik; pengukuran kimia; metrologi kimia*

ABSTRACT

There are many decisions related to safety, health, and other policies should be made based on valid measurements in determining the presence of organic compounds. An analytical method in chemical measurements has an important role in providing reliable testing results. Consequently, a high-accuracy analytical method is needed as one of quality assurance supports. Isotope dilution-mass spectrometry (ID-MS) technique is recognized as an analysis technique which can give a high accuracy and precision of the method through the spike of isotopic target analytes into the interested sample, causing interferences from sample preparation process can be eliminated. Because of the high metrological property, ID-MS technique, which has greatly developed along with the advantage of organic analysis using mass spectrometry (MS) detector, is known as a primary method in chemical measurements. This literature review delivers basic principles, developments and characteristics of ID-MS, challenges of ID-MS technique for organic compound determination in some matrices sample, and the ID-MS recent application in metrology in chemistry field, especially in certified reference material characterization.

Key word: *isotope dilution-mass spectrometry; organic analysis; chemical measurements; metrology in chemistry*

PENDAHULUAN

Berbagai faktor dapat mempengaruhi keakuratan suatu metode analisis dalam pengukuran senyawa organik. Faktor-faktor ini dapat berupa efisiensi ekstraksi, stabilitas analit, hingga keandalan pemisahan dalam sistem kromatografi yang digunakan. Pada umumnya hal-hal ini dapat diinvestigasi dan dioptimalkan selama pengembangan dan validasi metode analisis [1]. Faktor-faktor yang dipelajari dan menjadi sumber kesalahan yang diketahui dalam proses pengukuran (dapat dikuantisasi) ini dikenal dengan istilah kesalahan sistemik.

Penggunaan *Certified Reference Material* (CRM), matriks CRM khususnya, menjadi cara yang umum untuk mengkarakterisasi adanya suatu bias atau kesalahan sistemik [2]. Sehingga dari studi yang dilakukan, metode analisis yang dikembangkan dapat terukur secara jelas apakah hasil pengukuran perlu dikoreksi atau tidak. Namun, dalam memberikan jaminan hasil pengukuran yang lebih akurat, metode analisis dengan kesalahan sistemik yang minim lebih dipilih. Sebagai salah satu tren yang berkembang akhir-akhir ini dan keuntungan dari analisis menggunakan *Mass Spectrometry* (MS) adalah perkembangan teknik *isotope dilution mass spectrometry* (ID-MS).

Prinsip dasar ID-MS ditemukan oleh Hevesy dan Paneth saat melakukan penelitian penentuan kelarutan timbal sulfida di dalam air menggunakan radioaktif timbal sulfida pada tahun 1913, yang kemudian saat

ini dikenal sebagai analisis *radiochemical isotope dilution* [3], [4]. Perkembangan aplikasi teknik isotope dilution ini diperkuat dengan berkembangnya *mass spectrometer* dalam analisis kimia, sehingga dikenal dengan *isotope dilution-mass spectrometry* (ID-MS). Aplikasi ID-MS kemudian semakin marak hingga pada tahun 1990 aplikasi pertama ID-MS pada alat *inductively couple plasma* (ICP) berhasil dipublikasikan [5].

Metode ID-MS diakui oleh CCQM (*Comité Consultatif pour la Quantité de Matière*) sebagai salah satu metode primer dalam pengukuran kimia karena memberikan kualitas metrologi tingkat tinggi [6]. Teknik ID-MS dapat menghilangkan kesalahan sistemik melalui koreksi akurat dari perolehan kembali (*recovery*) target analit sepanjang proses preparasi sampel [7]. Dengan menambahkan bentuk isotopik dari target analit dalam jumlah yang diketahui, dikenal juga *spike*, jumlah analit dapat dihitung berdasarkan perubahan rasio isotop, rasio kelimpahan dari dua isotop [8].

Dalam analisis senyawa organik dan biomolekul, *spike* tersebut atau bentuk isotop target analit tersedia secara komersial dalam bentuk ^{13}C atau ^2H [9]. Kondisi kesetimbangan antara analit natural dan isotopik menghasilkan rasio yang stabil di antara dua bentuk analitik tersebut dalam setiap sub-sampel dari suatu campuran yang mengandung target analit di dalamnya selama preparasi sampel. Sehingga hasilnya, kehilangan analit selama ekstraksi, *clean-up* (pemurnian), penguapan tidak akan

mempengaruhi akurasi [10]. Hal ini disebabkan karena semua proses yang terjadi selama preparasi sampel akan sama dialami oleh kedua bentuk target analit. Pada dasarnya hal ini menyerupai teknik internal standar, namun dalam ID-MS ini yang ditambahkan adalah target analit tersebut dengan modifikasi isotopik. Internal standar tersebut memiliki sifat kimia dan fisika yang sama, terkecuali sifat spektrofotometrinya. Beberapa studi yang sukses mengaplikasikan ID-MS dalam menentukan substansi organik telah dipublikasi dalam tahun-tahun terakhir ini baik menggunakan *gas chromatography* (GC) atau *liquid chromatography* (LC) [11]–[14].

Bagaimanapun juga, tantangan dalam analisis menggunakan teknik ID-MS ini tetap ada, salah satunya karena matriks dari sampel yang diukur. Makalah ini ditujukan untuk memberikan ulasan perkembangan dan berbagai hal penting terkait aplikasi-aplikasi teknik ID-MS dalam menentukan senyawa-senyawa organik.

METODE

Metode penelitian yang digunakan dalam penelitian ini adalah pengumpulan literatur-literatur berupa jurnal/prosiding yang sudah dipublikasikan dan buku-buku yang sudah diterbitkan, dan menganalisisnya untuk melihat hubungan dan keterkaitannya terhadap penggunaan teknik ID-MS dalam pengukuran senyawa-senyawa organik di berbagai matriks. Teori fundamental tentang ID-MS juga ditambahkan untuk memperkuat kajian ini.

HASIL DAN PEMBAHASAN

1. Prinsip Dasar

ID-MS pada prakteknya didasarkan pada proses penimbangan (baik larutan standard dan isotop senyawa target yang ditambahkan, biasa juga disebut “*spike*”, ke dalam sampel) dan perhitungan rasio isotop spektrometri massanya [15], [16].

ID-MS merupakan metode analisis yang sangat baik untuk kuantitasi senyawa organik dalam matriks sampel yang kompleks, dimana teknik ini mampu mengatasi kesulitan mendapatkan nilai perolehan kembali (*recovery*) yang baik selama preparasi sampel dan juga mampu menunjukkan nilai akurasi dan presisi pengukuran yang tinggi, ketika diaplikasikan dengan tepat. Oleh karena itu, ID-MS dipilih sebagai metode primer (*reference method*) untuk menyediakan acuan metrologi tingkat tinggi dalam analisis senyawa organik di berbagai bidang seperti proteomik, kimia klinis, toksikologi, makanan, dan lingkungan [6], [16]–[21].

Dalam ID-MS, jumlah target analit dalam sampel yang diukur dihitung dari perubahan rasio jumlah isotop yang dibawa akibat penambahan sejumlah senyawa isotopik dari target analit yang diukur, dengan jumlah yang diketahui secara tepat.

Bila diturunkan ke dalam konsep mol dan menggunakan *one-point calibration* (dengan *isotope-ratio matching*), jumlah target analit dalam sampel dapat dihitung

berdasarkan rasio target analit dan isotop analit di dalam campuran sampel dan standar, mengikuti persamaan:

$$C_x = \frac{C_{std} m_{is,x} m_{std} R_x}{W_s m_{is,std} R_{std}} \quad (1)$$

Dalam persamaan (1) tersebut C_x dan C_{std} merupakan notasi untuk konsentrasi analit dalam sampel dan konsentrasi analit dalam larutan standar, sedangkan $m_{is,x}$, m_{std} , dan $m_{is,std}$ diartikan sebagai massa larutan isotop analit yang ditambahkan ke dalam sampel, massa larutan standar analit yang ditambahkan ke dalam campuran standar, dan massa larutan isotop analit yang ditambahkan ke dalam campuran standar, berturut-turut. R_x diartikan sebagai rasio terhitung antara besar respon alat pengukuran (detektor) target analit dengan isotop analit di sampel dan R_{std} diartikan sebagai rasio terhitung antara besar respon alat pengukuran (detektor) target analit dengan isotop analit di campuran standar. W_s adalah berat sampel yang diambil untuk analisis [17].

Konsep dasar dan persamaan matematis ID-MS ini memiliki kesamaan dengan apa yang sudah dikenal sebelumnya dengan teknik standard internal. Standard internal dalam kimia analitik adalah teknik menambahkan dalam jumlah tetap suatu senyawa kimia ke dalam sampel yang diukur, blanko, dan standard kalibrasi untuk suatu analisis kimia. Dalam penelitian pengukuran ion amonium dalam asap rokok menggunakan kromatografi ion dengan detektor konduktivitas, teknik standar internal

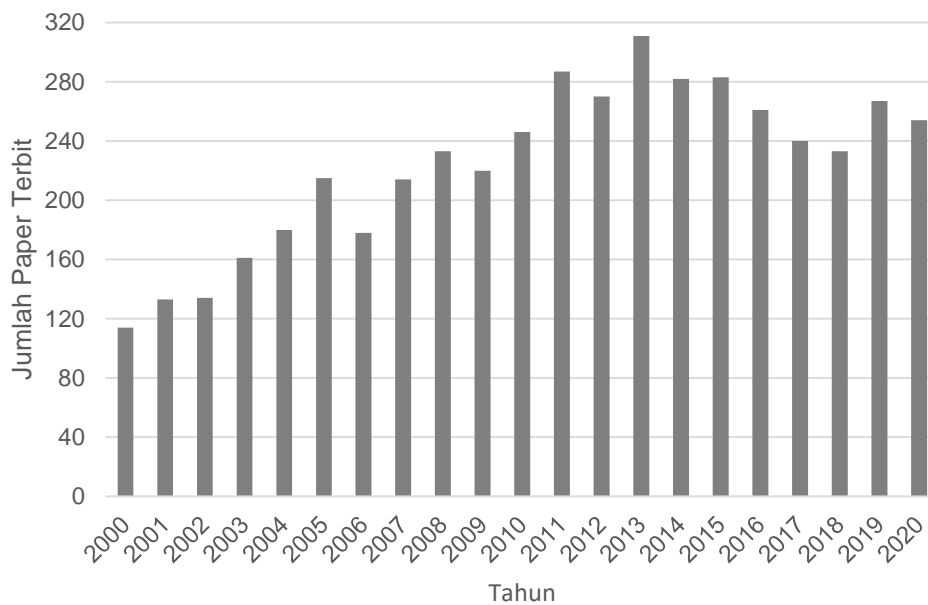
menunjukkan hasil analisis kuantitatif yang lebih efektif dan memiliki ketidakpastian yang lebih kecil bila dibandingkan dengan standardisasi eksternal [22]. Standar internal ini biasanya dipilih sedemikian rupa memiliki keterkaitan dengan target analitik sehingga mewakili karakteristik target analit semaksimal mungkin. Namun standar internal ini berbeda secara kimia perilakunya dari target analit. Untuk itu, konsep ID-MS lebih menguntungkan dalam praktek dan analisis karena menggunakan target senyawa yang dilabel isotopik sehingga memiliki karakteristik yang identik [23]. Pada pengukuran sulfadiazine, sulfadimidine, dan sulfadimethoxine dalam susu menggunakan LC dengan detektor Tandem Mass Spectrometry, studi Han et al., menunjukkan nilai recovery signifikan lebih baik dengan teknik kuantitatif ID-MS (berada pada 99,7-100,7%) dibandingkan dengan metode standar eksternal (17,8-61,2%) yang sangat dipengaruhi oleh matriks sampel [24].

Teknik ID-MS juga berkembang seiring dengan meluasnya aplikasi MS dalam analisis senyawa organik yang dapat mengukur baik senyawa target analit maupun target analitik yang dilabel isotopik. Dalam 20 tahun terakhir, telah terbit sebanyak 1919 karya tulis ilmiah yang mengulas hasil penelitian berkaitan ID-MS. Gambar 1 mendeskripsikan sebaran karya tulis ilmiah yang terbit tiap tahunnya, yang diamati menggunakan program pencarian data mining Dimensions menggunakan kata kunci *isotope-dilution* dan *mass spectrometry*.

2. Preparasi sampel

Sebagaimana ekstraksi sampel dan pemurnian adalah tahap umum dan penting dalam analisis senyawa organik, teknik ID-MS pun tetap menghendaki adanya tahap ini dalam proses analisisnya. Hal ini didasari dengan tujuan dari preparasi sampel di analisis organik untuk mengisolasi senyawa target dari matriks sampel yang diukur dalam kondisi yang cocok pada metode analisis yang dipilih [25]. Preparasi sampel biasanya

dilakukan dengan metode *off-line* dan manual seperti *liquid-liquid extraction* dan *solid-phase extraction*. Prosedur-prosedur ini kompleks dan mengambil waktu pengerjaan yang panjang, serta memiliki potensi turunnya presisi dan akurasi dari prosedur analisis yang dilakukan [26]. Untuk itu konsep internal standar dan ID-MS hadir dalam analisis untuk mengurangi gangguan dari proses preparasi sampel yang dapat mengorbankan akurasi dan presisi.



Gambar 1. Jumlah publikasi terbit yang dihubungkan dengan *isotope-dilution* dan *mass spectrometry* per tahun. Sumber: Penelusuran data dari Dimensions [27]

Namun, tidak selamanya teknik ID-MS ini dapat mengkompensasi efektifitas ekstraksi selama proses preparasi sampel, khususnya ekstraksi target analit dari matriks sample. Ini dapat terjadi karena terjadi

perbedaan proses ekstraksi antara standar internal atau isotop yang ditambahkan dengan senyawa asli target analit di dalam sampel. Isotop ditambahkan ke dalam sampel sebelum proses ekstraksi dan

senyawa asli target analit terikat di dalam matriks sehingga mengalami proses yang berbeda lingkungannya, menyebabkan perbedaan laju ekstraksi antara kedua senyawa ini [28].

Untuk itu, studi kesetimbangan senyawa isotop dan senyawa asli target analit dari dalam sampel yang diukur menjadi hal yang harus dipertimbangkan. Sin *et al.* [28] pada penentuan pestisida di dalam teh membiarkan *internal standard* bersama sampel selama satu malam untuk memberikan waktu yang cukup untuk mencapai kesetimbangan. Hal ini penting untuk dilakukan dalam mencapai keakuratan yang maksimal dari aplikasi ID-MS sebagai metode primer.

3. ID-MS dalam analisis pangan

Analisis senyawa organik dalam bahan makanan banyak dilakukan untuk mendapatkan informasi tentang komposisi kimia, nilai nutrisi makanan, persepsi sensorik, dan juga keberadaan senyawa organik berbahaya atau yang jumlahnya dibatasi. Berbagai tipe teknik analisis modern telah dikembangkan untuk memenuhi tantangan dalam menyediakan informasi tersebut seperti *capillary electrophoresis* (CE), spektroskopi inframerah, *nuclear magnetic resonance* (NMR), *polymerase chain reaction* (PCR), *enzyme-linked immunosorbent assay* (ELISA), dan *mass spectrometry* (MS) yang dipasangkan dengan *liquid chromatography* (LC) atau *gas chromatography* (GC) [29].

Untuk meningkatkan akurasi metode analisis dalam sampel makanan, teknik ID-MS juga diaplikasikan dalam analisis senyawa organik dalam makanan. Metode analisis *isotope dilution-liquid chromatography/tandem mass spectrometry* (ID-LC-MS/MS) telah dikembangkan oleh Lee *et al.* [30] dalam menentukan secara akurat dalam fluoroquinolon dalam produk daging hewan. Fluoroquinolon merupakan antibiotik yang dapat membunuh dan melawan infeksi yang disebabkan oleh bakteri Gram-positif dan Gram-negatif [31]. Fenomena perbedaan pengukuran rasio isotop karena *matrix effect* ditemukan dalam studi ini. Kecenderungan bias dari rasio isotop terjadi pada analisis ID-MS menggunakan isotop deuterium senyawa target. Sedangkan pada analisis ID-MS menggunakan ^{13}C dan ^{5}N bias pengukuran tidak ditemukan (dalam studi tersebut diamati pada rasio Ciprofloxacin/ciprofloxacin- $^{13}\text{C}_3^{5}\text{N}$). Selain itu, yang juga perlu dipertimbangkan dan diamati dalam suatu pengembangan metode analisis adalah efek matriks. Dari studi ini, juga ditemukan bahwa perbedaan matriks suatu sampel (*porcine*, *bovine*, dan ayam) dapat menghasilkan rasio isotop yang berbeda. Pengamatan ini juga menguatkan rasio isotop dari internal standard ^{13}C dan ^{5}N cenderung lebih stabil terhadap gangguan efek matriks [30].

Efek matriks cenderung dapat dikaji lebih mendalam pada analisis MS menggunakan sistem *liquid chromatography* (LC). Hal ini karena dalam sistem LC

memungkinkan pengaturan instrumen untuk melihat secara langsung perbandingan kromatogram antara dengan dan tanpa kehadiran sampel matriks, dikenal dengan teknik *post-column infusion* (penggunaan blanko matriks dalam evaluasi akan memudahkan pengamatan). Efek matriks pada sistem LC-MS akan terlihat berupa penurunan atau kenaikan sinyal ion, karena adanya gangguan pada proses ionisasi sampel yang sedang dianalisis [32]–[34]. Skema *post-column infusion* digambarkan secara umum pada Gambar 2.

Laboratorium Standard Nasional Satuan Ukuran (SNSU) Kimia Organik – Badan Standardisasi Nasional telah mengembangkan teknik ID-MS ini dalam pengukuran senyawa aditif pangan yang berfungsi sebagai pengawet (asam benzoat, metil paraben, dan butil paraben) dalam kondimen dan pestisida (alfa-BHC dan lindan) dalam ginseng [35], [36]. Sebagaimana tugas pokok Lembaga Metrologi Nasional (*National Metrology Institute* – NMI), Laboratorium SNSU Kimia Organik mengaplikasikan teknik ini untuk penentuan nilai acuan CRM dan material uji profisiensi.

2. ID-MS dalam analisis proteomik

Proteomik merupakan lingkup penelitian yang berpusat pada analisis protein yang menyangkut dengan sistem kehidupan secara komprehensif. Perkembangan besar teknologi MS memiliki peranan penting dalam analisis protein, khususnya yang berhubungan erat secara

biologi dan klinis [37]. Dalam aplikasinya yang begitu dekat dengan sistem biologi manusia, penentuan ini pun juga mengharuskan akurasi pengukuran yang tinggi dan dapat diandalkan. Sehingga, perkembangan ID-MS pun masuk ke dalam bidang aplikasi ini untuk mencari alternatif dalam menyediakan teknis analisis kuantitatif yang akurat dan berpresisi tinggi [38], [39]. Sama seperti analisis senyawa organik pada umumnya, teknik ID-MS dalam penentuan senyawa protein juga memiliki keuntungan dalam mengatasi dan mengeliminasi adanya variasi intensitas sinyal yang dihasilkan oleh sistem MS, efek matriks, dan juga adanya tahap pemurnian yang mungkin harus dilakukan dalam suatu prosedur analisis [18].

Sebelumnya, aplikasi ID-MS untuk kuantifikasi protein dengan massa molekul tinggi terbatas karena permasalahan teknis yang menyulitkan hasil pengukuran akurat dan presisi. Protein dengan massa molekul tinggi memiliki keterbatasan untuk sistem MS yang memberikan respon pada rentang 100–2000 m/z . Seiring dengan kemajuan teknologi dalam dekade terakhir, beberapa protein dapat diukur dan teknik ID-MS dapat diaplikasikan untuk pengukuran dalam sampel-sampel biologi. Selain mahalnya standar isotop, ketersediaan standar isotop dari protein tertentu juga masih menjadi tantangan dalam aplikasi ID-MS untuk analisis proteomik [39].

Secara umum, ID-MS mampu memfasilitasi linieritas dan presisi yang begitu baik. Namun, ketika masuk ke dalam

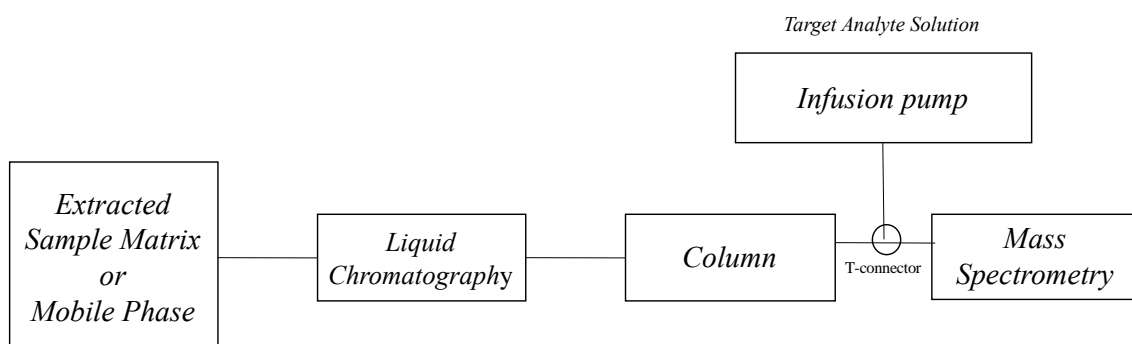
akurasi analisis protein, hal ini menjadi lebih rumit. Akurasi ID-MS dalam menentukan jumlah suatu target protein di dalam sampel akan bergantung pada pilihan strategi analisis protein [38]. Kuantitasi pada analisis protein dapat mengandalkan perbandingan sinyal antara senyawa target dan internal standard yang digunakan. Dari konsep ini, dalam analisis proteomik dikenal pendekatan *Absolute Quantification* (AQUA), *Quantification Concatamers* (QconCAT), dan *Protein Standard Absolute Quantification* (PSAQ) [18], [38].

Salah satu aplikasi ID-MS menggunakan pendekatan AQUA adalah penelitian oleh Arsene *et al.* (2008) pada penentuan fragmen proteolitik T6 dan T12 dari sampel *recombinant human growth hormone* (hGH; 22 kDa isoform) menggunakan isotop asam amino dengan label ^{13}C dan ^{15}N . Hasil yang dilaporkan menunjukkan tingkat keakurasian sebesar 4%, hasil yang baik dan cukup dekat dengan

keakurasian analisis senyawa organik kecil [40]. Penelitian ini memicu untuk mengulas lebih jauh kuantifikasi di berbagai tipe proteomik.

3. ID-MS dalam aplikasi pembuatan CRM

Dalam tujuan penggunaannya sebagai *quality control* dan *quality assurance* untuk hasil pengujian yang dilakukan oleh laboratorium pengujian dan juga validasi dalam pengembangan metode analisis, CRM matriks yang diproduksi harus dikarakterisasi nilai acuannya menggunakan metode analisis yang memiliki kualitas metrologi yang tinggi. Hal ini ditujukan guna menyediakan hasil pengukuran tanpa bias dan ketidakpastian yang lebih kecil dari metode analisis yang digunakan oleh laboratorium pengujian tersebut. Sehingga dapat dikatakan, karakterisasi CRM merupakan bagian penting dari sertifikasi CRM dan ketidakpastiannya juga memiliki peran penting terhadap kualitas CRM tersebut [41], [42]



Gambar 2. Deskripsi *post-column infusion* pada studi efek matriks. Sumber: Modifikasi dari Trufelli *et al.* (2010) [32]

Selain akurasi dan presisi, *traceability* atau ketertelusuran ke International System of Units (SI) juga menjadi pertimbangan

besar dalam penentuan nilai acuan dari CRM. Teknik ID-MS yang memiliki keuntungan dan kedekatan metode yang

menghasilkan ketertelusuran ke satuan SI menjadi alasan kuat bagi semua NMI yang memiliki tanggung jawab dalam mendiseminasikan ketertelusuran pengukuran, untuk mengaplikasikan ID-MS dalam karakterisasi dan evaluasi ketidakpastiannya.

Government Laboratory of Hong Kong [28] berhasil mengaplikasikan teknik ID-MS pada GC-NCI-MS dan GC-EI-HRMS untuk sertifikasi CRM tiga senyawa target (alfa-endosulfan, beta-endosulfan, dan endosulfan sulfat) dalam teh (GLHK-11-03). Standar isotop yang digunakan adalah alfa-endosulfan- $^{13}\text{C}_9$, beta-endosulfan- $^{13}\text{C}_9$, dan endosulfan sulfat- $^{13}\text{C}_9$. Metode analisis ini juga telah ditunjukkan dalam uji banding internasional *key comparison* CCQM-K95 yang diorganisir oleh *Consultative Committee for Amount of Substance-Metrology in Chemistry*.

Pada produksi CRM etil karbamat dalam minuman beralkohol di tahun 2019, Vicentim, et al. [43] mengembangkan metode ID-MS menggunakan instrumen GC untuk mengidentifikasi dan mengkuantitasi etil

karbamat. Dalam analisisnya, penelitian ini menggunakan etil karbamat *deuterated* (d5-etil karbamat) sebagai standar internal. Metode analisis ini menghasilkan ketidakpastian dari presisi sebesar 0.28 ng/g dengan nilai acuan CRMnya adalah 149.2 ± 5.7 ng/g.

NMI Korea Selatan, KRIS, mengembangkan CRM untuk susu formula bayi (KRIS CRM 108-02-003) dengan analit yang disertifikasi di antaranya adalah tiamin (5.344 ± 0.073 mg/kg) dan retinol (6.21 ± 0.23 mg/kg). Metode ID-LC-MS digunakan untuk penentuan nilai, uji homogenitas, uji stabilitas jangka pendek, dan uji stabilitas jangka panjang dari CRM 108-02-003 [44].

Informasi beberapa CRM beserta metode analisis dan nilai acuannya diringkas pada Tabel 1. Kelima sampel CRM yang diamati menunjukkan hasil sertifikasi CRM menggunakan teknik ID-MS menunjukkan hasil yang memuaskan, persentase ketidakpastian yang diperluas ($\% U_{\text{CRM}}$) lebih kecil dari standar deviasi relatif yang diestimasi oleh persamaan Horwitz ($\% \text{RSD}_R$) untuk masing-masing analit [45].

Tabel 1. Informasi CRM beserta metode analisis yang digunakan dan nilai acuannya

CRM	Metode	Nilai Acuan	$\% U_{\text{CRM}}$	$\% \text{RSD}_R$	Rujukan
-----	--------	-------------	---------------------	-------------------	---------

Endosulfan sulfat dalam teh	GC-NCI-MS GC-EI-HRMS ¹³ C ₉ -alpha-endosulfan-	502 ± 33 µg/kg	6.6	17.6	[28]
Etil karbamat dalam minuman beralkohol	GC-ID-MS d ₅ -etil karbamat	149.2 ± 5.7 ng/g	3.8	21.1	[43]
Melamin dalam susu	LC-ID-MS GC-ID-MS ¹³ C ₃ ¹⁵ N ₃ -melamine	1.14 mg/kg	7.1	15.6	[46]
Tiamin	LC-ID-MS ¹³ C ₄ -thiamine HCl	5.344 ± 0.073 mg/kg	1.4	12.4	[44]
Retinol	LC-ID-MS Retinyl palmitate-d4 (10, 19, 19, 19-d4)	6.21 ± 0.23 mg/kg	3.7	12.1	[44]

KESIMPULAN

Kajian ini mendiskusikan teknik *isotope dilution-mass spectrometry* (ID-MS) yang digunakan dalam analisis organik di matriks makanan dan proteomik serta aplikasinya dalam penentuan nilai acuan CRM. Dari kajian literatur, secara umum aplikasi ID-MS menunjukkan hasil yang sesuai dengan peruntukannya, yaitu sebagai metode primer dalam penentuan kuantitatifnya. Keandalan metode ID-MS ini juga dimanfaatkan oleh berbagai NMI dalam mensertifikasi CRM yang diproduksi untuk menghasilkan nilai yang akurat dan tertelusur ke SI, serta memiliki nilai ketidakpastian yang kecil sebagai salah satu parameter dalam penentu kualitas CRM yang diproduksi. Meskipun demikian, analisis kuantitatif protein menggunakan ID-MS masih menjadi tantangan besar dalam bidang proteomik, khususnya protein dengan massa molekul tinggi, yang secara sistem pengukuran MS masih relatif sulit.

DAFTAR RUJUKAN

- [1] J. M. Betz, P. N. Brown, and M. C. Roman, "Accuracy, precision, and reliability of chemical measurements in natural products research," *Fitoterapia*, vol. 82, no. 1, pp. 44–52, Jan. 2011, doi: 10.1016/j.fitote.2010.09.011.
- [2] B. King, "The selection and use of reference materials - a basic guide for laboratories and accreditation bodies," *Accredit. Qual. Assur.*, vol. 8, no. 9, pp. 429–433, Sep. 2003, doi: 10.1007/s00769-003-0601-4.
- [3] G. V. Hevesy and F. Paneth, "Die Löslichkeit des Bleisulfids und Bleichromats," *Zeitschrift für Anorg. Chemie*, vol. 82, no. 1, pp. 323–328, 1913, doi: 10.1002/zaac.19130820125.
- [4] J. Vogl and W. Pritzkow, "Isotope dilution mass spectrometry — A primary method of measurement and its role for RM certification," *MAPAN*, vol. 25, no. 3, pp. 135–164, 2010.
- [5] Y. Igarashi, K. Shiraishi, Y. Takaku, K. Masuda, R. Seki, and M. Yamamoto, "Application of Isotope Dilution for the Determination of Thorium in Biological Samples by Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry," *Anal. Sci.*, vol. 8, no. 4, pp. 475–479, 1992, doi: 10.2116/analsci.8.475.
- [6] T. J. Quinn, "Primary methods of measurement and primary standards," *Metrologia*, vol. 34, no. 1, pp. 61–65, Feb. 1997, doi: 10.1088/0026-1394/34/1/9.
- [7] H. Shin, B. Kim, and J. Lee, "Investigation of isotope dilution mass spectrometric (ID-MS) method to determine niacin in infant formula, breakfast cereals and multivitamins," *Food Chem.*, vol. 138, no. 2–3, pp. 1109–1115, Jun. 2013.
- [8] A. Henrion, "Reduction of systematic errors in quantitative analysis by isotope dilution mass spectrometry (IDMS): an iterative method," *Fresenius. J. Anal. Chem.*, vol. 350, no. 12, pp. 657–658, 1994, doi: 10.1007/BF00323658.
- [9] P. Rodríguez-González and J. I. García Alonso, "Isotope Dilution Mass Spectrometry ☆," in *Reference Module in Chemistry, Molecular Sciences and Chemical Engineering*, Elsevier, 2018.
- [10] P. Bedson, "Guidelines for Achieving High Accuracy in Isotope Dilution Mass Spectrometry (IDMS)," in *Guidelines for Achieving High Accuracy in Isotope Dilution Mass Spectrometry (IDMS)*, M. Sargent, R. Harte, and C. Harrington, Eds. Cambridge: Royal Society of Chemistry, 2007, pp. 1–34.

- [11] S. Lee, J. Lee, S. Ahn, S.-Y. Baek, and B. Kim, "Determination of fatty acid contents in infant formula by isotope dilution-gas chromatography/mass spectrometry," *J. Food Compos. Anal.*, vol. 80, pp. 33–39, Jul. 2019.
- [12] L. Wang, R. B. Cardenas, and C. Watson, "An isotope dilution ultra high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry method for the simultaneous determination of sugars and humectants in tobacco products," *J. Chromatogr. A*, vol. 1514, pp. 95–102, 2017, doi: 10.1016/j.chroma.2017.07.079.
- [13] J. Peng, M. Wei, Y. Hu, Y. Yang, Y. Guo, and F. Zhang, "Simultaneous Determination of Maltol, Ethyl Maltol, Vanillin, and Ethyl Vanillin in Foods by Isotope Dilution Headspace Solid-Phase Microextraction Coupled with Gas Chromatography-Mass Spectrometry," *Food Anal. Methods*, vol. 12, no. 8, pp. 1725–1735, Aug. 2019, doi: 10.1007/s12161-019-01518-3.
- [14] R. J. Goldschmidt and W. R. Wolf, "Simultaneous determination of water-soluble vitamins in SRM 1849 Infant/Adult Nutritional Formula powder by liquid chromatography–isotope dilution mass spectrometry," *Anal. Bioanal. Chem.*, vol. 397, no. 2, pp. 471–481, May 2010, doi: 10.1007/s00216-009-3373-9.
- [15] Anonymous, "The measurement technique of isotope dilution inductively coupled plasma mass spectrometry (ICP- MS)." .
- [16] K. G. Heumann, "Isotope dilution mass spectrometry of inorganic and organic substances," *Fresenius' Zeitschrift für Anal. Chemie*, vol. 325, no. 8, pp. 661–666, Jan. 1986, doi: 10.1007/BF00470971.
- [17] B.-J. Kim, E.-J. Hwang, H.-Y. So, E.-K. Son, and Y.-S. Kim, "Development of a Model System of Uncertainty Evaluations for Multiple Measurements by Isotope Dilution Mass Spectrometry: Determination of Folic Acid in Infant Formula," *Bull. Korean Chem. Soc.*, vol. 31, no. 11, pp. 3139–3144, Nov. 2010, doi: 10.5012/bkcs.2010.31.11.3139.
- [18] K. Kabytaev and A. Stoyanov, "Quantitative Proteomics with Isotope Dilution Analysis: Principles and Applications," *Curr. Proteomics*, vol. 13, no. 1, pp. 61–67, 2016.
- [19] L. M. Thienpont *et al.*, "State-of-the-Art of Serum Testosterone Measurement by Isotope Dilution–Liquid Chromatography– Tandem Mass Spectrometry," *Clin. Chem.*, vol. 54, no. 8, pp. 1290–1297, Aug. 2008, doi: 10.1373/clinchem.2008.105841.
- [20] A. P. de Leenheer and L. M. Thienpont, "Applications of isotope dilution-mass spectrometry in clinical chemistry, pharmacokinetics, and toxicology," *Mass Spectrom. Rev.*, vol. 11, no. 4, pp. 249–307, Jul. 1992, doi: 10.1002/mas.1280110402.
- [21] J. Hrdlička, T. Gucký, J. van Staden, O. Novák, and K. Doležal, "A stable isotope dilution method for a highly accurate analysis of karrikins," *Plant Methods*, vol. 17, no. 1, p. 37, Dec. 2021.
- [22] E. C. de Oliveira, E. I. Muller, F. Abad, J. Dallarosa, and C. Adriano, "Internal standard versus external standard calibration: an uncertainty case study of a liquid chromatography analysis," *Quim. Nova*, vol. 33, no. 4, pp. 984–987, 2010, doi: 10.1590/S0100-40422010000400041.
- [23] L. Cuadros-Rodríguez, M. G. Bagur-González, M. Sánchez-Viñas, A. González-Casado, and A. M. Gómez-Sáez, "Principles of analytical calibration/quantification for the separation sciences," *J. Chromatogr. A*, vol. 1158, no. 1–2, pp. 33–46, Jul. 2007.
- [24] C. Han, X. Li, H. Jiao, Y. Gao, and Q. Zhang, "Accurate Determination,

- Matrix Effect Estimation, and Uncertainty Evaluation of Three Sulfonamides in Milk by Isotope Dilution Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry," *J. Food Qual.*, vol. 2021, pp. 1–7, Sep. 2021.
- [25] J. Begerow and L. Dunemann, "Sample Preparation for Trace Analysis," in *Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry*, Weinheim, Germany: Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, 2006.
- [26] R.-I. Olariu, D. Vione, N. Grinberg, and C. Arsene, "Sample Preparation For Trace Analysis By Chromatographic Methods," *J. Liq. Chromatogr. Relat. Technol.*, vol. 33, no. 9–12, pp. 1174–1207, Jul. 2010, doi: 10.1080/10826076.2010.484371.
- [27] Dimensions, "Publications for 'isotope dilution' and 'mass spectrometry' (Accessed on 22 August 2021)," 2021. [Online]. Available: https://app.dimensions.ai/discover/publication?search_mode=content&order=date&search_text=%22isotope+dilution%22+AND+%22mass+spectrometry%22&search_type=kws&search_field=text_search&fav_open=true.
- [28] D. W. M. Sin *et al.*, "S1 certification of alpha-endosulfan, beta-endosulfan, and endosulfan sulfate in a candidate certified reference material (organochlorine pesticides in tea) by isotope dilution gas chromatography-mass spectrometry," *Anal. Bioanal. Chem.*, vol. 407, no. 11, pp. 3009–3021, 2015, doi: 10.1007/s00216-015-8455-2.
- [29] F. Tang, M. Vasas, E. Hatzakis, and A. Spyros, "Magnetic resonance applications in food analysis," in *Annual Reports on NMR Spectroscopy*, G. A. Webb, Ed. 2019, pp. 239–306.
- [30] S. Lee, B. Kim, and J. Kim, "Development of isotope dilution-liquid chromatography tandem mass spectrometry for the accurate determination of fluoroquinolones in animal meat products: Optimization of chromatographic separation for eliminating matrix effects on isotope ratio measurement," *J. Chromatogr. A*, vol. 1277, pp. 35–41, 2013.
- [31] NHS, "Fluoroquinolone Antibiotics (Ciprofloxacin, Moxifloxacin, Levofloxacin, Ofloxacin) What you need to know."
- [32] H. Trufelli, P. Palma, G. Famigliani, and A. Cappiello, "An overview of matrix effects in liquid chromatography-mass spectrometry," *Mass Spectrom. Rev.*, vol. 30, no. 3, pp. 491–509, May 2011.
- [33] H. Stahnke, T. Reemtsma, and L. Alder, "Compensation of matrix effects by postcolumn infusion of a monitor substance in multiresidue analysis with LC-MS/MS," *Anal. Chem.*, vol. 81, no. 6, pp. 2185–2192, 2009, doi: 10.1021/ac802362s.
- [34] H. Lee, J. Lee, K. Choi, and B. Kim, "Development of isotope dilution-liquid chromatography/tandem mass spectrometry for the accurate determination of trans- and cis-vitamin K1 isomers in infant formula," *Food Chem.*, vol. 221, pp. 729–736, Apr. 2017.
- [35] N. Aryana, D. P. Ramadhanyngtyas, D. Styarini, and Y. Aristiawan, "First Indonesian proficiency testing using reference value from isotope dilution mass spectrometry method for benzoic acid, methyl paraben, and n-butyl paraben in sweet soy sauce," *Accredit. Qual. Assur.*, vol. 24, no. 6, pp. 427–435, Dec. 2019.
- [36] Y. Aristiawan, D. Putri Ramadhanyngtyas, I. Komalasari, D. Styarini, and N. Hamim, "Method Validation For Organochlorine Insecticides Determination In Ginseng By Using Isotope-Dilution Gas Chromatography-Mass

- Spectrometry (ID-GC-MS)," *Periódico Tchê Química.*, vol. 17, no. 34, pp. 343–351, 2020.
- [37] R. Aebersold and M. Mann, "Mass-spectrometric exploration of proteome structure and function," *Nature*, vol. 537, no. 7620, pp. 347–355, Sep. 2016, doi: 10.1038/nature19949.
- [38] V. Brun, C. Masselon, J. Garin, and A. Dupuis, "Isotope dilution strategies for absolute quantitative proteomics," *J. Proteomics*, vol. 72, no. 5, pp. 740–749, Jul. 2009.
- [39] J. Villanueva, M. Carrascal, and J. Abian, "Isotope dilution mass spectrometry for absolute quantification in proteomics: Concepts and strategies," *J. Proteomics*, vol. 96, pp. 184–199, 2014.
- [40] C. G. Arsene, W. Burkitt, C. Pritchard, G. O. Connor, D. M. Bunk, and B. Gu, "Protein Quantification by Isotope Dilution Mass Spectrometry of Proteolytic Fragments: Cleavage Rate and Accuracy," *Anal. Chem.*, vol. 80, no. 11, pp. 4154–4160, 2008.
- [41] J. Han *et al.*, "Development of Isotope Dilution-Liquid Chromatography/Mass Spectrometry for the Accurate Determination of Capsaicinoids in Fermented Cabbage Kimchi," *Food Anal. Methods*, vol. 13, no. 8, pp. 1603–1612, Aug. 2020.
- [42] J. Vogl, "Characterisation of reference materials by isotope dilution mass spectrometry," *J. Anal. At. Spectrom.*, vol. 22, no. 5, p. 475, 2007.
- [43] M. P. Vicentim, T. M. Monteiro, R. R. R. de Almeida, A. D. A. Soares, J. M. Rodrigues, and E. C. P. do Rego, "Isotope dilution gas chromatography - mass spectrometry for the development of certified reference material of ethyl carbamate in hydroalcoholic matrix," *Microchem. J.*, vol. 147, pp. 497–506, 2019.
- [44] J. Lee *et al.*, "Development of an infant formula certified reference material for the analysis of organic nutrients," *Food Chem.*, vol. 298, p. 125088, Nov. 2019, doi: 10.1016/j.foodchem.2019.125088.
- [45] M. Thompson, S. L. R. Ellison, and R. Wood, "The International Harmonized Protocol for the proficiency testing of analytical chemistry laboratories: (IUPAC technical report)," *Pure Appl. Chem.*, vol. 78, no. 1, pp. 145–196, 2006.
- [46] P. Y. T. Hon *et al.*, "Development of melamine certified reference material in milk using two different isotope dilution mass spectrometry techniques," *J. Chromatogr. A*, vol. 1218, no. 39, pp. 6907–6913, Sep.