

UREA BERTANDA ^{14}C : PEMBUATAN DAN ANALISANYA. *)

Oleh : Sunarhadijoso Soenarjo **) ,

Amri Syawaalx **) ,

Abdul Muthalib **) ,

Hidayat Muchsinuddin ***) .

ABSTRAK.

Telah dilakukan usaha pembuatan urea bertanda ^{14}C melalui reaksi sederhana antara kaliumcyanat (^{14}C) dengan ammoniumsulfat dalam suasana ammonia pada suhu air mendidih. Pemisahan urea (^{14}C) yang dihasilkan dilakukan dengan ekstraksi menggunakan etanol terhadap residu penguapan campuran reaktan. Dengan menggunakan pengembalian kaliumcyanat sebanyak 2,5 - 5,0 mmol dengan perbandingan mol 1 : 1 terhadap ammoniumsulfat, rendemen kimia setelah 60 - 75 menit waktu reaksi berkisar antara 65 - 73 %, sedang rendemen penandaan berkisar antara 70 - 80 %. Pemeriksaan pada daerah ultra violet menunjukkan bahwa urea mempunyai panjang gelombang maksimum pada 198 nm, disebabkan oleh transisi elektron $n \rightarrow \pi^*$ pada gugus karbonil yang juga dipengaruhi oleh pergeseran merah akibat adanya gugus amina. Pemeriksaan spektrum massa menunjukkan adanya fragmentasi karakteristik urea pada garis spektrum 44 dan 43. Spektrum utama diduga pada garis spektrum 28, tetapi ini sukar diamati karena berimpit dengan garis spektrum nitrogen alam. Analisa yang lain menunjukkan juga bahwa urea (^{14}C) yang dihasilkan mempunyai kemurnian fisika, kimia dan radiokimia yang tinggi.

ABSTRACT.

The preparation of ^{14}C labeled urea has been carried out by means of simple reaction between potassium cyanate (^{14}C) with ammonium sulfate in the presence of ammonia at the temperature of boiling water. The separation of the resulting urea (^{14}C) was done by ethanol extraction from the evaporated reaction mixture. By using of 0.0025 - 0.0050 mole of potassium cyanate carrier with mole ratio of 1 : 1 to the ammonium sulfate, the chemical yield of 60 - 75 minutes reaction time ranged between 65 - 73 % and the labeling yield ranged between 70 - 80 %. In the ultra violet region, urea has a maximum wavelength of 198 nm, caused by $n \rightarrow \pi^*$ electron transition which was influenced by red shift of $-\text{NH}_2$ substitution. Identification using mass spectrometry showed the characteristic fragmentation of urea at the spectrum line of 44 and 43. The base peak of mass spectrum was presumed at the spectrum line of 28 but it was difficult to be distinguished from the spectrum line of natural nitrogen. Another analysis showed that the resulting urea (^{14}C) has high physical, chemical and radio-chemical purity.

PENDAHULUAN.

Kebutuhan akan senyawa bertanda radiokarbon di Indonesia, dewasa ini telah mulai dirasakan. Berbeda dengan pembuatan senyawa bertanda radiohalogen yang kebanyakan dibuat melalui reaksi penukaran dan/atau adisi ataupun senyawa bertanda radioteknesium yang umumnya dibuat melalui reaksi pembentukan kompleks, maka kebanyakan senyawa bertanda radiokarbon dibuat melalui reaksi sintesa langsung (1) yang menyangkut pembentukan struktur yang lebih rumit dari senyawa bertanda yang lebih sederhana.

Senyawa bertanda ^{14}C dapat digunakan untuk pemeriksaan "in vivo" maupun "in vitro" (2) tetapi sering kali untuk tujuan pengadaan suatu senyawa ^{14}C yang tertentu harus dilakukan beberapa tahap yang saling berturutan (3) sehingga rendemen sintesa sering kali menjadi sangat rendah.

Mengingat di satu pihak ketrampilan dan peralatan untuk pembuatan senyawa bertanda ^{14}C di Pusat Penelitian Teknik Nuklir memang belum memadai, sementara di pihak lain telah semakin terasa tuntutan untuk memulai usaha memproduksi senyawa ^{14}C , maka di sini dilakukan usaha pembuatan urea bertanda ^{14}C .

Ditinjau dari segi kegunaan, urea (^{14}C) merupakan bahan baku pada rantai pembuatan beberapa macam senyawa lain yang dipergunakan untuk studi metabolisme, misalnya untuk pembuatan 2 (^{14}C)-D-riboflavin (4) dan 2 (^{14}C)- β -5-etil-2'-deoksiuridin (5).

Pada umumnya pembuatan urea (^{14}C) dilakukan dengan mereaksikan $^{14}\text{CO}_2$ dengan ammonia untuk membentuk ammoniumkarbamat dan selanjutnya ammoniumkarbamat ini dipanaskan untuk memperoleh urea (^{14}C) (6). Ta-

pi tahap yang terakhir ini merupakan reaksi bolak-balik dan mencapai kesetimbangan dengan hanya 40 % perolehan menjadi urea (6).

Murray dan Ronzio (7) melakukan pembuatan urea (^{14}C) dengan bahan dasar $\text{Ba}^{14}\text{CO}_3$. Walaupun rendemen dapat dianggap kuantitatif, tetapi proses yang dilakukan menyangkut tiga tahap reaksi dengan perlengkapan dan peralatan yang rumit sehingga praktis juga sukar dilaksanakannya.

Dalam percobaan ini, dengan memodifikasi metoda yang dikemukakan oleh Wohler (8) dan Haley (4), maka pembuatan urea (^{14}C) dapat dilakukan dengan cara sederhana dengan bahan dasar kaliumsianat (^{14}C) dan ammonium sulfat.

TATA KERJA.

Persiapan bahan dan peralatan.

Sebagai bahan dasar bertanda ^{14}C dipergunakan kaliumsianat (^{14}C) CFA 280 dari Amersham International Ltd. dengan keaktifan jenis 57 mCi/mmole. Sediaan dengan keaktifan total sebesar 250 uCi dilarutkan dalam 3 ml "aquabidest" steril dari IPHA Laboratories dan digunakan sebanyak 25 ul setiap kali pemakaian.

Kaliumsianat diproduksi Fluka, sedang ammoniumsulfat, ammonia dan bahan kimia lainnya diproduksi Merck. Semuanya dengan tingkat kemurnian p.a.

Untuk pemeriksaan hasil sintesa, dipergunakan spektrofotometer Beckman model 25 yang dilengkapi dengan pesawat perekam gambar, perangkat kromatografi cairan tekanan tinggi model 440 dari Waters dengan detektor indeks refraksi, spektrofotometer infra merah dari Shimadzu,

perangkat detektor sintilasi cairan LS 7500 dari Beckman dan spektrometer massa JMS D 300 dari Jeol.

Pembuatan urea (^{14}C).

Sebanyak 202,5 - 405 mg kaliumisianat dicampur dengan ammoniumsulfat dengan perbandingan mol 1 : 1 dan dilarutkan dalam 6 ml air. Kemudian ditambahkan 3 ml ammonia 25 % dan 25 ul larutan kaliumisianat (^{14}C). Campuran direfluks pada suhu didih air selama 60 - 75 menit. Setelah didinginkan campuran dikisatkan pada tekanan rendah (10^{-5} Torr) dan residunya diekstrak dengan 15 ml etanol. Endapan yang tidak larut dipisahkan dengan penyaringan biasa dan kemudian filtrat dikisatkan lagi pada tekanan 10^{-5} Torr. Urea bertanda ^{14}C diperoleh sebagai residu pengeringan yang terakhir ini.

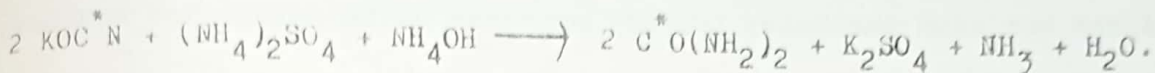
Analisa.

Analisa urea hasil sintesa meliputi pemeriksaan fisika, kimia dan radiokimia. Untuk pemeriksaan fisika dan kimia dilakukan penentuan titik leleh, spektrofotometri ultra lembayung, spektrofotometri infra merah, kromatografi cairan tekanan tinggi dan spektrometri massa.

Untuk pemeriksaan radiokimia, urea hasil sintesa dilarutkan dalam 50 ml metanol, dan kemudian sebanyak 20 ul dari larutan ini dilewatkan dalam kolom fasa diam sistim kromatografi cairan tekanan tinggi. Dengan kecepatan aliran 2 ml/menit serta kondisi lain yang sama dengan yang dilakukan pada pemeriksaan kimia, dilakukan fraksinasi penampungan eluat dalam fraksi-fraksi penampungan setiap 0,5 menit. Tiap fraksi dicacah dengan detektor sintilasi cairan menggunakan sintilator Picofluor-30 dari Packard. Pola kurva cacahan dibandingkan dengan pola kromatogram yang dihasilkan.

HASIL PERCOBAAN DAN PEMBAHASAN.

Reaksi pembentukan urea bertanda radiokarbon dalam percobaan ini dapat digambarkan sebagai berikut :



Stoikiometri reaksi menunjukkan perbandingan mol sebesar 2 : 1 antara kaliumsianat dan ammoniumsulfat. Untuk memperoleh rendemen kimia yang lebih baik, di sini ammoniumsulfat diberikan berlebihan dengan perbandingan mol sebesar 1 : 1 terhadap kaliumsianat.

Dengan pemakaian kaliumsianat sebesar 202,5 - 405 mg (2,5 - 5,0 mmol) diperoleh rendemen kimia yang tidak jauh berbeda satu sama lain, yaitu berkisar antara 65 - 73 %. Rendemen penandaan ditentukan dengan membandingkan keradioaktifan urea (^{14}C) hasil sintesa dengan keradioaktifan kaliumsianat (^{14}C) yang sesuai dengan yang digunakan. Diperoleh bahwa rendemen penandaan berkisar antara 70 - 80 %.

Pemeriksaan kualitas dari hasil sintesa dilakukan untuk mendapatkan gambaran mengenai kemurnian fisika, kimia dan radiokimia dari sediaan. Karena itu untuk keperluan ini dipergunakan standar urea dengan tingkat kemurnian p.a.

Gambar 1 menunjukkan kurva serapan pada daerah panjang gelombang antara 180 - 360 nm. Pemeriksaan lebih lanjut menunjukkan bahwa urea standar (Fluka, p.a., kurva A) dan urea hasil sintesa (kurva B) dalam metanol mempunyai pola serapan yang sama dengan serapan maksimum pada panjang gelombang 198 nm.

Bila dihubungkan dengan struktur urea, maka serapan maksimum pada panjang gelombang ini mungkin sekali disebabkan oleh transisi elek

tron $n \rightarrow \pi^*$ pada gugus karbonil yang menyebabkan serapan maksimum pada panjang gelombang 188 nm (9). Adanya gugus amina yang merupakan gugusan "auxochrome" yang terikat pada gugusan "chromophore" karbonil menyebabkan pergeseran merah sehingga panjang gelombang maksimum menjadi 198 nm.

Pemeriksaan spektrum infra merah, baik untuk standar maupun urea hasil sintesa ditunjukkan pada gambar 2. Terlihat bahwa urea hasil sintesa mempunyai pola spektrum transmisi yang sama dengan urea standar. Interpretasi pola spektrum transmisi tersebut dapat dilihat pada Tabel 1 berikut (9).

Tabel 1. Interpretasi pola transmisi pada spektrum infra merah urea *).

Pola transmisi. **)	Bilangan gelombang (cm^{-1}).	Interpretasi.
A	$\pm 3400 - 3250$	- regangan N - H gugus amina.
B	$\pm 2850 - 2750$	- nujol.
C	$\pm 1650 - 1580$	- vibrasi N - H gugus amina primer.
		- regangan C - O gugus karbonil.
D	$\pm 1460 - 1450$	- nujol.
E	± 1370	- nujol

*) Urea disuspensikan dalam nujol.

**). Lihat gambar 2.

Kemurnian kimia yang baik dari urea hasil sintesa ditunjukkan pada kromatogram kromatografi cairan tekanan tinggi seperti terlihat pada gambar 3. Dengan kecepatan aliran 2 ml/menit, tekanan 1200 psi dan detektor indeks refraksi, terlihat urea mempunyai waktu retensi kira-kira 1,5 menit, menunjukkan sifat kepolaran yang tidak jauh berbeda dengan fasa gerak metanol yang digunakan dan perbedaan kepolaran yang tinggi dengan resin uBondapak C-18 yang digunakan sebagai fasa diam.

Hasil pemeriksaan dengan spektrofotometer massa juga menunjukkan bahwa urea standar dan urea hasil sintesa memberikan spektrum massa yang identik seperti terlihat pada gambar 4.

Didapati spesi $M^+ = 60$ yang menunjukkan bahwa ion molekul urea dihasilkan pada pengionan pertama. Fragmentasi selanjutnya menghasilkan ion fragmen yang khas pada penguraian ion molekul urea pada garis spektrum 44 dan 43. Spesi ini dihasilkan akibat penglepasan radikal $\cdot NH_2$ dan diikuti dengan penglepasan radikal $\cdot H$ untuk menghasilkan struktur-struktur yang distabilkan oleh bentuk-bentuk resonansinya seperti terlihat pada gambar 5.

Sebagai garis spektrum utama diduga pada garis spektrum 28 yaitu spesi radikal ion karbonil yang juga distabilkan oleh bentuk resonansi sebagai berikut :



Tetapi dengan spektrofotometri massa manual seperti yang dilakukan di sini, spesi radikal ion karbonil ini sukar diamati karena kedudukannya berimpit dengan kedudukan garis spektrum nitrogen alam.

Kemurnian radiokimia dari setiap "batch" pembuatan yang dilakukan didapatkan lebih besar dari 99,5 %. Contoh pola keradioaktifan terhadap fraksi penampungan ditunjukkan pada gambar 6. Terlibat di sini bahwa waktu retensi keradioaktifan maksimum berada pada posisi yang sama dengan waktu retensi indeks refraksi maksimum.

Pemeriksaan titik leleh secara konvensional menghasilkan titik leleh pada tekanan kamar sebesar $(128,1 \pm 1,3)^{\circ}\text{C}$. Hasil ini tidak berbeda jauh dengan data yang telah dilaporkan terdahulu, yaitu $131,5^{\circ}\text{C}$ (6), $125^{\circ}\text{C} - 130^{\circ}\text{C}$ (7) atau $132,7^{\circ}\text{C}$ (10).

Hasil-hasil pemeriksaan seperti dikemukakan di atas menunjukkan bahwa dengan cara yang telah dikemukakan dapat dihasilkan urea (^{14}C) dengan kemurnian fisika, kimia maupun radiokimia yang tinggi.

KESIMPULAN.

Telah dilakukan pembuatan urea bertanda ^{14}C dengan cara sederhana melalui reaksi antara kaliumsianat (^{14}C) dengan ammoniumsulfat dalam suasana ammonia pada suhu didih air. Dengan menggunakan pengembalian kaliumsianat antara 2,5 - 5,0 mmol dalam perbandingan mol 1 : 1 terhadap ammoniumsulfat dan dengan waktu reaksi 60 - 75 menit, diperoleh rendemen kimia antara 65 - 73 % dan rendemen penandaan sebesar 70 - 80 %. Pemeriksaan yang dilakukan membuktikan bahwa urea (^{14}C) hasil sintesa mempunyai kemurnian fisika, kimia dan radiokimia yang baik.

UCAPAN TERIMAKASIH.

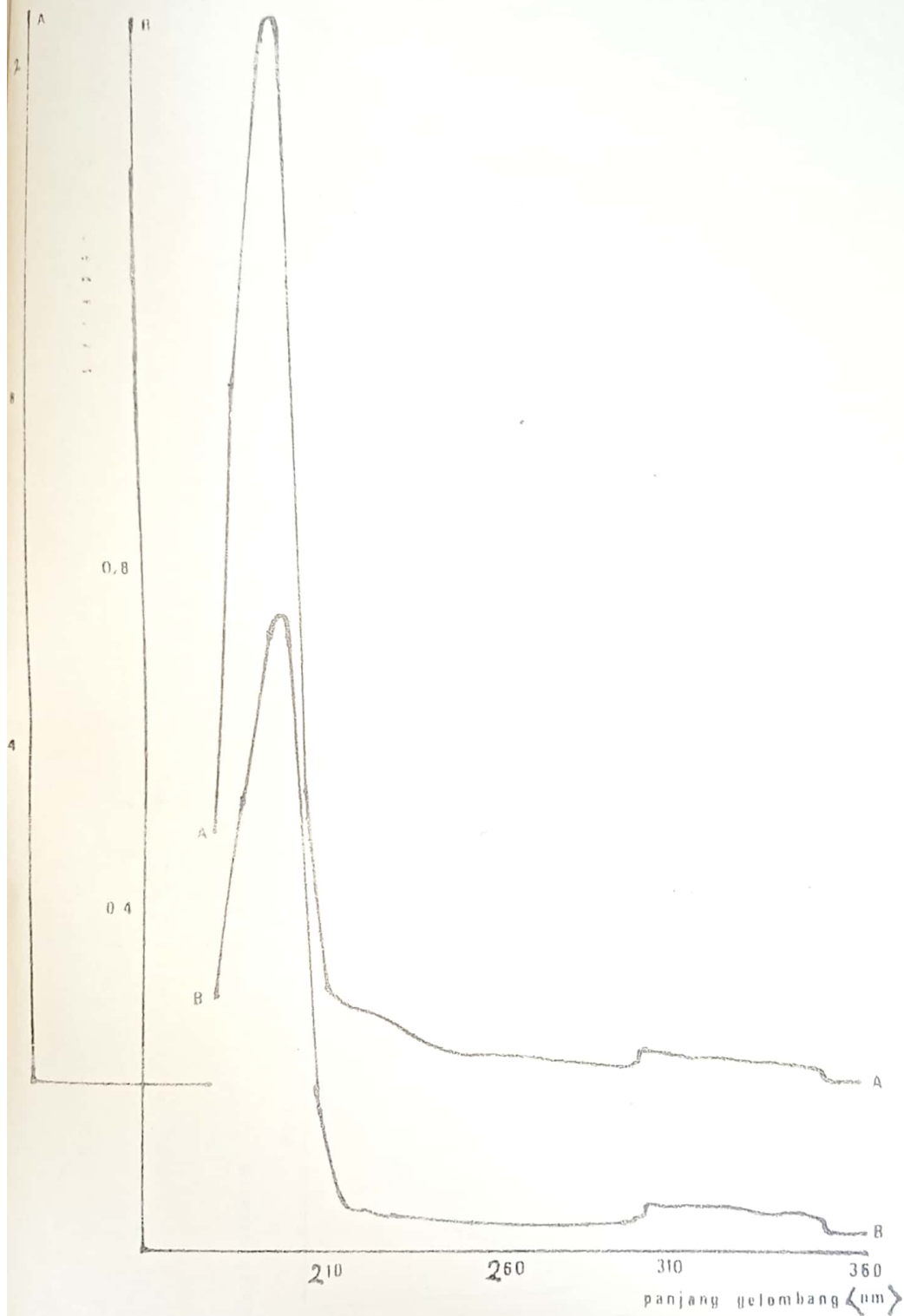
Terimakasih yang sebesar-besarnya disampaikan kepada Drs. Swasono R. Tamat, MSc. yang telah memberikan support pada pelaksanaan penelitian ini.

PUSTAKA.

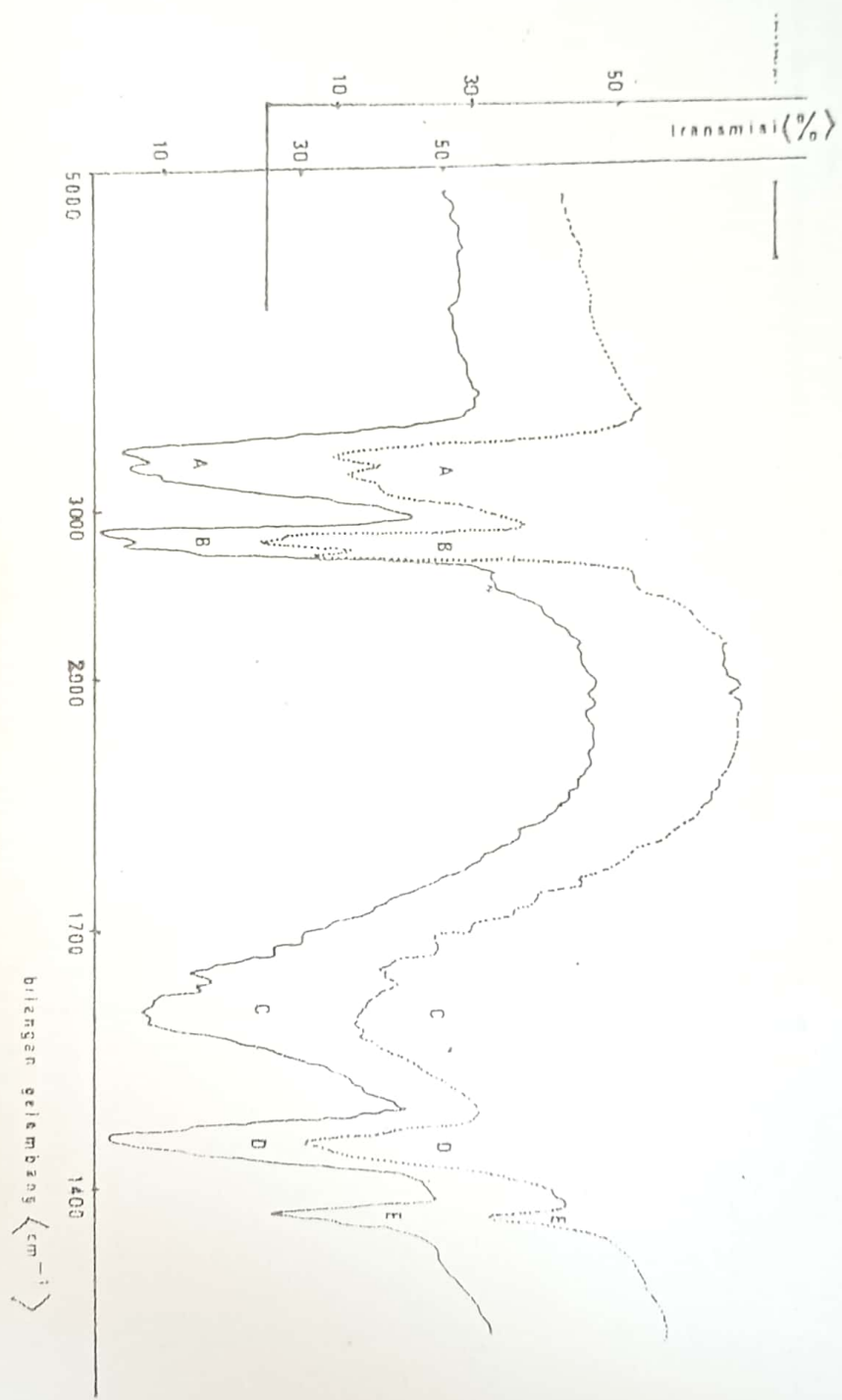
1. S. Soenarjo, "Aspek Kimia Senyawa Bertanda", Kursus Teknisi Radioisotop, Proyek P-3 BATAN, Bandung (1982).
2. S.R. Tamat, "Pembuatan Senyawa bertanda", Kursus Teknisi Radioisotop, Proyek P-3 BATAN, Bandung (1982).
3. A. Murray III, D.L. Williams, "Organic Synthesis with Isotopes", Part 1, Interscience Publisher, Inc., New York (1958).
4. E.E. Haley, J.P. Lambooy, "Synthesis of D-Riboflavin-2-¹⁴C and Its Metabolism by *Lactobacillus casei*", J. Am. Chem. Soc., 76 (1954) 2926.
5. R. Kaul, et al, "2-¹⁴C-1-(2'-deoxy-β-D-Ribofuranosyl)-5-ethyluracil : Synthesis and Biotransformation in Rats", J. Pharm. Scien., 69, (1980) 531.
6. A.L. Myerson, "Synthesis of Carbon-14 Labeled Urea", J. Am. Chem. Soc., 74 (1952) 2437.
7. A. Murray III, A.R. Monzio, "Micro-synthesis with Tracer elements. I. A New Synthesis of Cyanamide. The Synthesis of Urea Labeled with C¹⁴", J. Am. Chem. Soc., 71 (1949) 2245.
8. F. Wohler, Pogg. Ann., 12 (1828) 253, dikutip dari Pustaka 3.
9. R.M. Silverstein, et al, "Spectrometric Identification of Organic Compounds", edisi 3, John Wiley & Sons, Inc., New York (1974).
10. C.D. Hodgman, et al, "Handbook of Chemistry and Physics", edisi 37, Chemical Rubber Publishing Co., Ohio (1955).

DAFTAR GAMBAR.

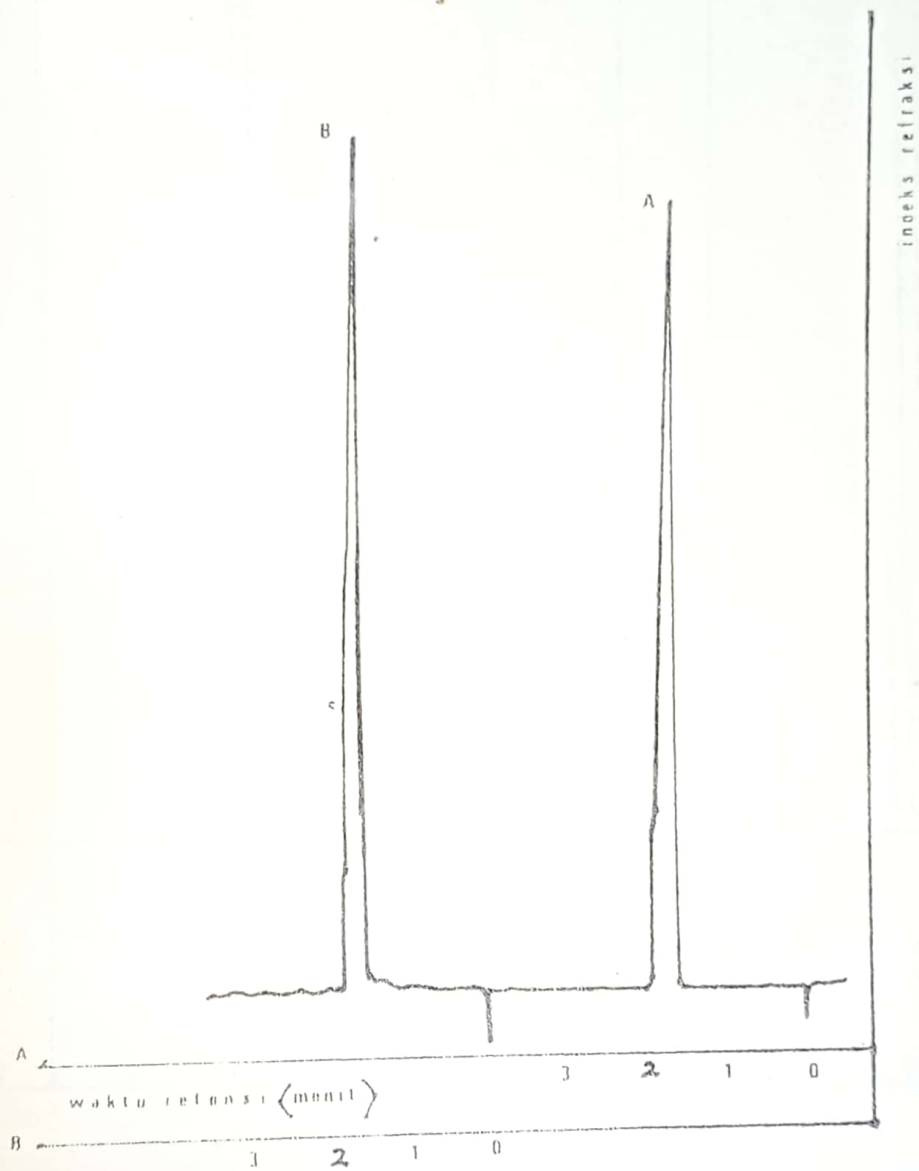
1. Gambar 1. Kurva serapan urea pada daerah ultra lembayung.
A. Urea standar. B. Urea hasil sintesa.
Pelarut : metanol. Temperatur : suhu kamar.
2. Gambar 2. Pola transmisi spektrum infra merah urea dalam nujol.
Urea standar. Urea hasil sintesa.
3. Gambar 3. Pola kromatogram kromatografi cairan tekanan tinggi.
A. Urea standar. B. Urea hasil sintesa.
Kecepatan aliran : 2 ml/menit.
Kecepatan kertas : 0.5 cm/menit.
Detektor : Indeks refraksi, 4 X.
Fasa gerak : metanol.
Fasa diam : uBondapak C-18.
4. Gambar 4. Spektrum massa urea.
A. Urea standar. B. Urea hasil sintesa.
Sistem pengisian suplikan : "direct probe".
Energi ionisasi : 70 eV.
Temperatur kamar pengion : 180°C.
Tekanan vakum : 10^{-6} Torr.
Arus ion : 300 uA. Perlipatan ion : 1 X.
5. Gambar 5. Fragmentasi karakteristik ion molekul urea.
6. Gambar 6. Pola keradioaktifan hasil fraksinasi kromatografi cairan tekanan tinggi.



Gambar 1.



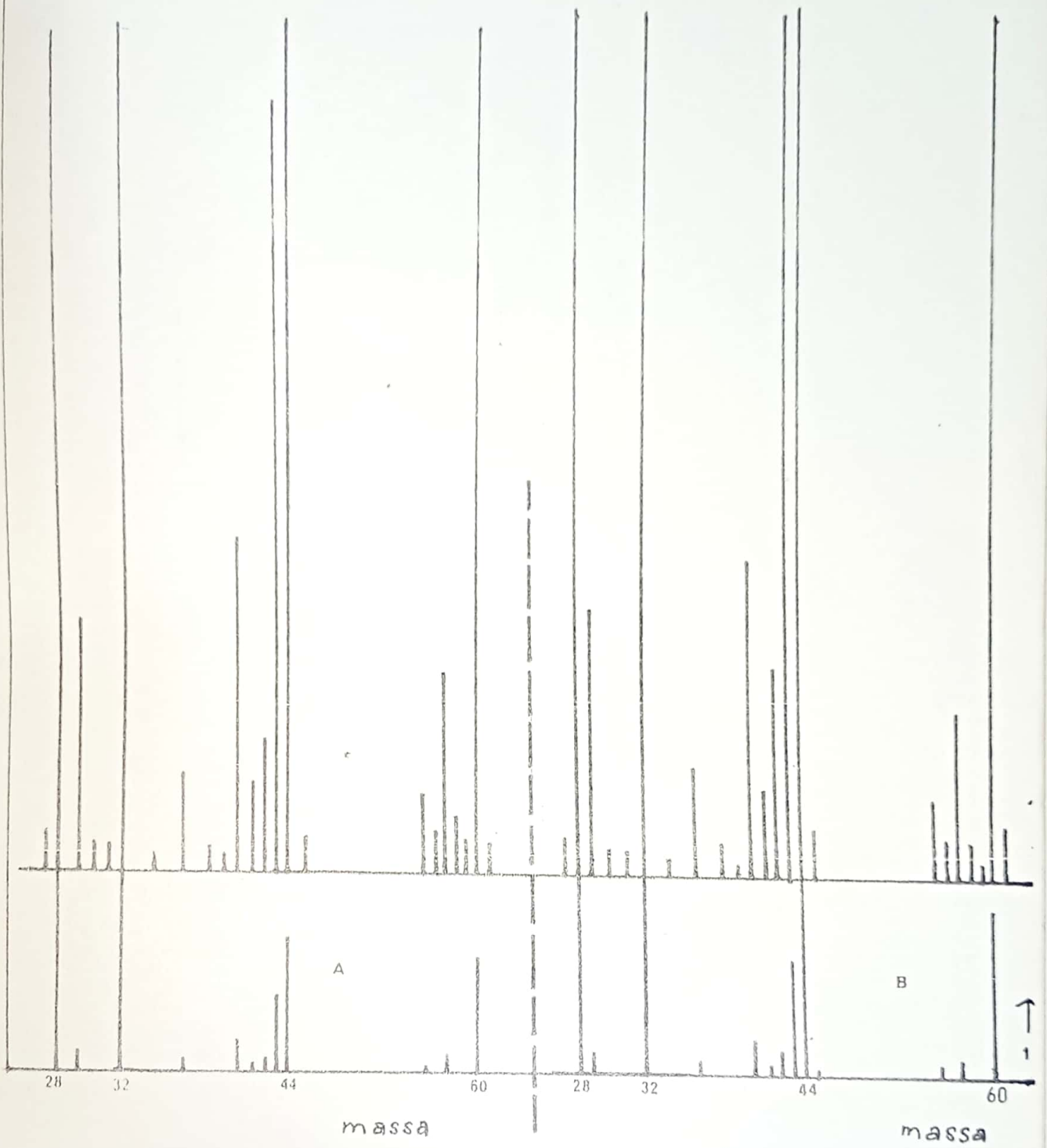
Gambar 2.



Gambar 3.

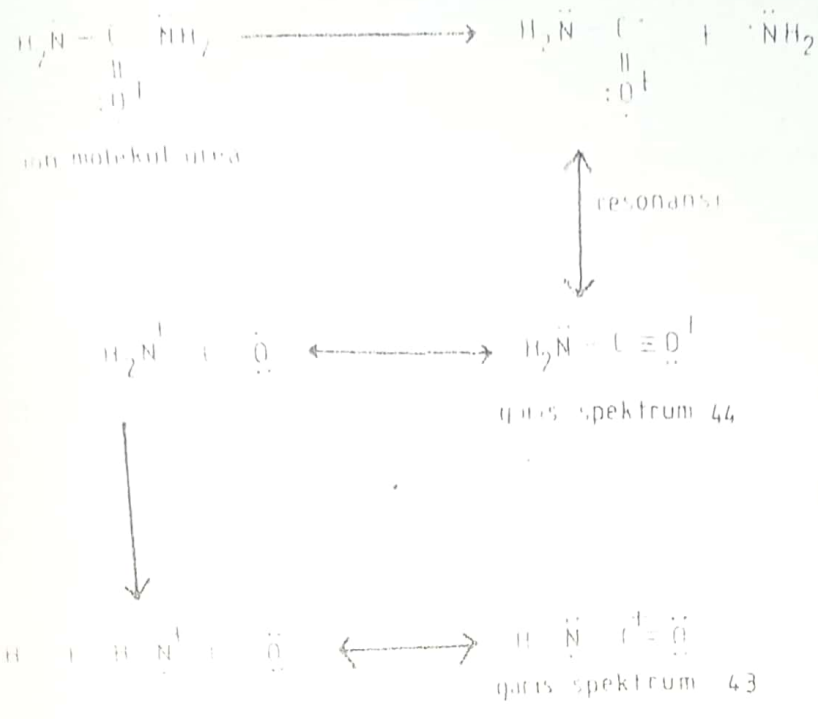
C19-14

sterilitas.

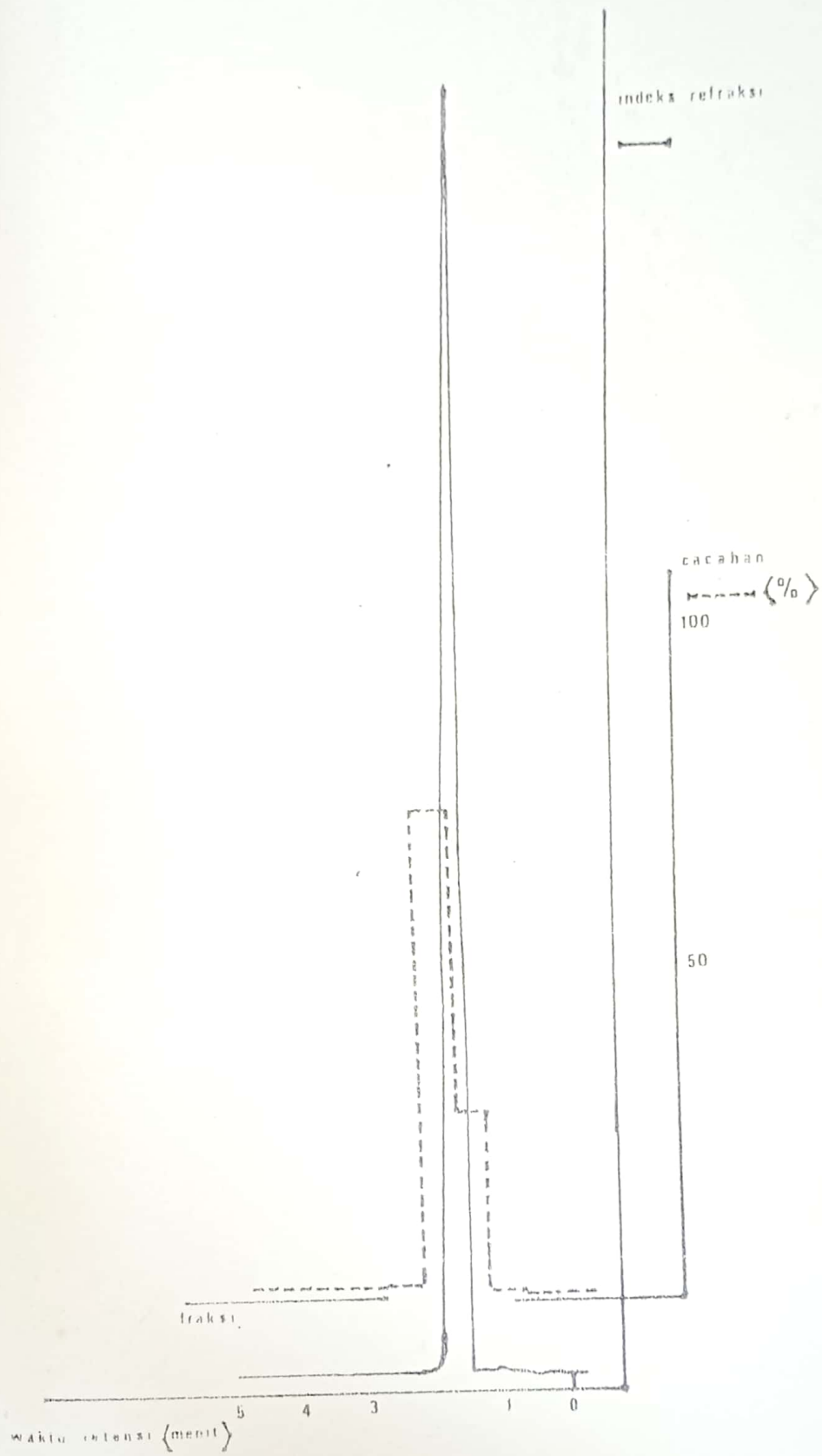


Gambar 4.

019-15



Gambar 5.



Gambar 6.