

PENENTUAN SIKLAM SEBAGAI IMPURITY DALAM SENYAWA BERTANDA ^{99m}Tc -CTMP MENGUNAKAN METODE RADIO-ELEKTROFORESIS

Isti Daruwati, Misyetti, Maula Eka Sriyani dan Teguh Hafiz AW

Pusat Teknologi Nuklir Bahan dan Radiometri –BATAN, Jl Tamansari No. 71 Bandung, 40132
Email: isti@batan-bdg.go.id

ABSTRAK

PENENTUAN SIKLAM SEBAGAI IMPURITY DALAM SENYAWA BERTANDA ^{99m}Tc -CTMP MENGGUNAKAN METODE RADIO-ELEKTROFORESIS. *Senyawa bertanda CTMP yang digunakan sebagai sediaan radiofarmaka penyidik tulang harus memenuhi beberapa persyaratan, diantaranya adalah mempunyai kemurnian kimia yang tinggi. CTMP disintesis secara in house dari siklam dan formaldehida dalam suasana asam (HCl p) dengan metode Mannich. Senyawa CTMP yang dihasilkan kemungkinan mengandung beberapa pengotor berupa sisa reagen siklam, asam fosfit, formaldehida dan asam klorida. Formaldehida dan asam klorida berada dalam bentuk cair sehingga mudah hilang pada pencucian. Sedangkan siklam merupakan fase padat yang kemungkinan besar dapat tercampur dengan CTMP. Oleh karena itu perlu dilakukan penentuan siklam dalam CTMP. Dengan teknik nuklir, siklam dapat ditentukan bersamaan dengan penandaan CTMP dengan teknesium-99m. Pemisahan ^{99m}Tc -CTMP dan ^{99m}Tc -siklam yang ada dalam campuran dilakukan dengan metode radio-elektroforesis secara bersamaan. Kemurnian radiokimia ^{99m}Tc -CTMP ditentukan dengan metode kromatografi kertas sedangkan kandungan siklam dalam ^{99m}Tc -CTMP ditentukan dengan metode elektroforesis. Hasil penelitian menunjukkan bahwa kadar siklam dalam CTMP dapat ditentukan dengan teknik nuklir secara simultan dengan penandaan ^{99m}Tc -CTMP. Metode elektroforesis dapat memisahkan siklam bertanda teknesium-99m, CTMP bertanda teknesium-99m, $^{99m}\text{TcO}_4$ dan ^{99m}Tc -tereduksi dengan batas kuantitasi siklam hingga 0,4 % w/w.*

Kata kunci : siklam, impurity, ^{99m}Tc -CTMP, elektroforesis

ABSTRACT

DETERMINATION OF CYCLAM AS IMPURITY IN ^{99m}Tc -CTMP USING RADIO-ELECTROPHORESIS METHOD. *Labelled compound of CTMP that are used for bone seeking radiopharmaceuticals must have to fulfill the standard requirements, such as have high radiochemical purity. CTMP compounds was in house synthesized from cyclam and formaldehyde in an acidic condition (conc. HCl) using Mannich methods. Impurities in CTMP product are the residue of cyclam, phosphoric acid, formaldehyde and hydrochloric acid. Formaldehyde and hydrochloride acid in the aqueous form is easily removed through the rinse process in the synthesis, while cyclam in the solid phase could be mix with CTMP. Therefore the impurities of cyclam in ^{99m}Tc -CTMP must be determined. With nuclear technique, the determination of cyclam could be assessed simultaneously with labelled of CTMP with technetium-99m. Separation of ^{99m}Tc -CTMP and ^{99m}Tc -cyclam in solution was conducted with radio-electrophoresis method simultaneously. The radiochemical purity for both radiolabelled compound was determined by paper chromatography. The purity of radiolabelled ^{99m}Tc -CTMP from cyclam was determined using electrophoresis method. The result show that the amount of cyclam in CTMP can be determined simultaneously using nuclear techniques with the labeling of ^{99m}Tc -CTMP. Electrophoresis method can separated ^{99m}Tc -cyclam, ^{99m}Tc -CTMP, $^{99m}\text{TcO}_4$ and ^{99m}Tc -reduced with limit quantitation of cyclam until 0,4% w/w.*

Key words : cyclam, impurity, ^{99m}Tc -CTMP, electrophoresis

1. PENDAHULUAN

CTMP merupakan senyawa golongan siklotetrametilenfosfonat sebagai bahan dasar untuk pembuatan senyawa bertanda ^{99m}Tc -CTMP yang disintesis secara *in house* dengan metode *mannich* [1]. Prinsip dari metode *mannich* adalah mereaksikan siklam, asam fosfit dan formaldehida dalam suasana asam pekat. Reaksi dilakukan dengan merefluks siklam dan asam fosfit dalam suasana asam pekat hingga terbentuk endapan putih, kemudian ditambahkan formaldehida 37% tetes demi tetes. Campuran direfluks kembali, kemudian didinginkan. Endapan CTMP yang terbentuk, selanjutnya disaring lalu dicuci dengan akuades dingin [2].

CTMP sebagai bahan dasar sediaan radiofarmaka penyidik tulang harus murni dari senyawa yang dapat mempengaruhi kualitas pencitraan. Senyawa CTMP yang dihasilkan dari sintesis tersebut kemungkinan mengandung beberapa pengotor berupa sisa reagen seperti siklam, asam fosfit, formaldehida dan asam klorida [1]. Berdasarkan sifat-sifat kimianya, senyawa-senyawa tersebut mudah larut dalam air dingin [1]. Oleh sebab itu, setelah proses pencucian diharapkan senyawa CTMP sudah bebas dari pengotor. Dari beberapa kemungkinan senyawa pengotor dalam CTMP, hanya siklam yang perlu diwaspadai karena siklam dapat membentuk senyawa bertanda dengan teknesium-99m pada saat penandaan CTMP [3]. Siklam (1,4,8,11-tetraazacyclotetradecane) merupakan senyawa makrosiklik poliamina yang membentuk kompleks dengan berbagai logam [4], bersifat polar yang pada biodistribusi dapat masuk ke organ ginjal [3], sedangkan asam fosfit mudah teroksidasi menjadi asam fosfat dan tidak mengganggu pada pencitraan tulang.

Secara kimia, siklam dalam CTMP dapat dianalisis dengan metode kromatografi seperti *Thin Layer Chromatography* (TLC), *High Performance Liquid Chromatography* (HPLC) dan sebagainya. Penentuan siklam dalam CTMP menggunakan metode HPLC diperkirakan membutuhkan waktu, bahan dan alat-alat tertentu. Dengan teknik nuklir, siklam dapat ditentukan secara simultan pada saat penandaan senyawa bertanda ^{99m}Tc -CTMP sehingga dapat menghemat waktu, bahan dan tenaga.

Ruang lingkup penelitian ini adalah menganalisis siklam dalam CTMP dengan teknik nuklir menggunakan metode elektroforesis dan menentukan batas kuantitasi siklam.

2. TATAKERJA

2.1. Bahan dan peralatan

Bahan yang digunakan adalah 1,4,8,11-tetraazacyclotetradecil-1,4,8,11-tetrametilen fosfonat (CTMP) buatan PTNBR, siklam, SnCl_2 , aseton, NaHCO_3 dan Na_2HCO_3 buatan E. Merck, larutan NaCl fisiologis steril dan *aqua bidest* steril buatan IPHA, kertas kromatografi Whatman 1 dan 31ET dan radionulida teknesium-99m yang berasal dari generator $^{99}\text{Mo}/^{99m}\text{Tc}$ (Batan Teknologi).

Peralatan yang digunakan terdiri dari tabung reaksi, alat sentrifuga, *vortex-mixer* (*Retcsh*), jarum suntik *disposable* (*Terumo*), pencacah gamma saluran tunggal (*Ortec*), *Delux Isotop Calibrator* (*Victoreen*), pemanas dengan *magnetic stirrer* (*Nuova II*), satu perangkat alat kromatografi kertas, satu perangkat alat elektroforesis, timbangan analitis (*Mettler Toledo*), pipet mikro (*ependorf*) dan alat-alat gelas lainnya.

2.2. Penandaan CTMP dengan radionuklida teknesium-99m

Penandaan dilakukan dengan mereaksikan 500 $\mu\text{g}/100 \mu\text{L}$ larutan CTMP (konsentrasi 5 mg/mL dalam larutan dapar karbonat pH 9,2) dengan 50 $\mu\text{g}/50 \mu\text{L}$ larutan SnCl_2 (konsentrasi 1 mg/mL dalam larutan asam klorida encer). Larutan diatur pada pH 5,5-7,0 kemudian ditambahkan larutan natrium perteknetat ($^{99m}\text{TcO}_4^-$) dengan aktivitas 2-5 mCi, lalu diinkubasi dalam penangas air mendidih selama 15 menit sehingga terbentuk kompleks ^{99m}Tc -CTMP.

2.3. Penandaan siklam dengan radionuklida teknesium-99m [7]

Penandaan dilakukan dengan mereaksikan 500 $\mu\text{g}/100 \mu\text{L}$ larutan siklam (konsentrasi 5 mg/mL dalam larutan dapar karbonat pH 9,2) dengan 50 $\mu\text{g}/50 \mu\text{L}$ larutan SnCl_2 (konsentrasi 1 mg/mL dalam larutan asam klorida encer). Larutan diatur pada pH 5,5-7,0; kemudian ditambahkan larutan natrium perteknetat ($^{99m}\text{TcO}_4^-$) dengan aktivitas 2-5 mCi, lalu diinkubasi di air mendidih selama 15 menit sehingga terbentuk kompleks ^{99m}Tc -siklam

2.4. Penentuan kemurnian radiokimia ^{99m}Tc -CTMP dan ^{99m}Tc -siklam

Kemurnian radiokimia ditentukan dengan

metode kromatografi kertas menaik. Fase diam adalah kertas Whatman 31ET dengan ukuran 1 x 12 ditandai setiap satu cm dengan pensil dan diberi nomor dari -1 sampai 10. Larutan ^{99m}Tc -CTMP ditotolkan pada titik nol, kemudian dielusikan secara menaik dengan dua macam fase gerak, yaitu NaCl fisiologis dan aseton dari titik penotolan (skala 0) sampai skala 10. Fase gerak aseton digunakan untuk memisahkan pengotor radiokimia ^{99m}Tc -pereteknetat bebas sedangkan fase gerak NaCl digunakan untuk memisahkan pengotor radiokimia ^{99m}Tc -tereduksi bebas. Setelah dielusikan, kertas dikeringkan dan dipotong setiap satu skala (1 cm) dan setiap potongan dicacah dengan pencacah gamma saluran tunggal. Hal yang sama dilakukan untuk penentuan kemurnian radiokimia larutan ^{99m}Tc -siklam.

2.5. Penentuan larutan dapar yang sesuai

Penentuan larutan dapar dilakukan dengan menggunakan 2 macam larutan dapar, yaitu dapar fosfat 0,2 M pH 8,0 dan larutan dapar karbonat 0,2 M pH 9,2. Untuk mengetahui pemisahan senyawa bertanda ^{99m}Tc -CTMP terhadap pengotor radiokimia lainnya dilakukan pengujian menggunakan metode elektroforesis dengan jalan membandingkan 4 macam senyawa yaitu Tc-pereteknetat, Tc-tereduksi (diperoleh dari Tc-pereteknetat dengan reduktor SnCl_2), larutan ^{99m}Tc -siklam dan larutan ^{99m}Tc -CTMP (konsentrasi 5 mg/mL). Sebanyak 2 μL dari masing-masing larutan ditotolkan pada kertas Whatman 1 tepat pada titik nol (31 x 1,5 cm). Kemudian arus listrik dialirkan dengan tegangan listrik sebesar 350 Volt selama 2 jam dan arus 5 mA. Migrasi dari tiap larutan diketahui dari kurva hasil pencacahan dengan alat pencacah gamma saluran tunggal.

2.6. Penentuan batas kuantitasi siklam

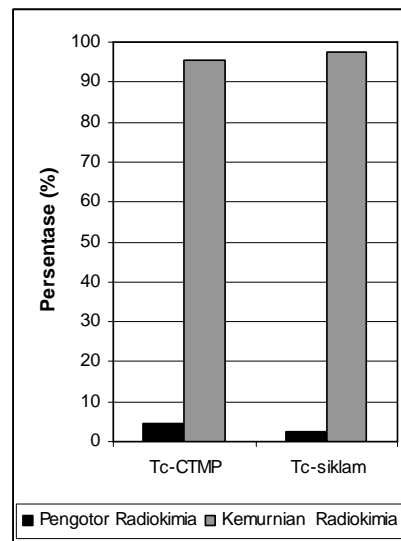
Sesuai dengan alur kerja pada Tabel 1, sejumlah tertentu larutan CTMP (konsentrasi 5 mg/mL dalam larutan dapar karbonat 0,2 M pH 9,2) ditambahkan pada sejumlah tertentu larutan siklam (konsentrasi 1 mg/mL). Kemudian 50 μL larutan SnCl_2 (konsentrasi 1 mg/mL dalam larutan asam klorida encer). Larutan diatur pada pH 6,5-7,0; kemudian pada masing-masing larutan tersebut ditambahkan larutan natrium pereteknetat ($^{99m}\text{TcO}_4^-$) dengan aktivitas 1-2 mCi, lalu diinkubasi dalam penangas air mendidih selama 15 menit. Persentase radiokimia siklam ditentukan dengan metode elektroforesis, sebagai berikut: larutan A s.d G, masing-masing

ditotolkan pada kertas Whatman 1 ukuran 31 x 1,5 cm. Kemudian dielektroforesis dengan menggunakan larutan elektrolit dapar karbonat 0,2 M pH 9,2 dengan tegangan listrik sebesar 350 Volt selama 2 jam dan arus 5 mA. Kertas diangkat dan dikeringkan, kemudian dipotong-potong tiap cm dan setiap potongan kertas dicacah dengan alat pencacah gamma saluran tunggal.

Tabel 1. Variasi volume CTMP dan siklam dalam penentuan batas kuantitasi

Vial	CTMP (μL)	Siklam (μL)
A	100	0
B	98	2
C	95	5
D	90	10
E	80	20
F	50	50
G	0	100

3. HASIL DAN PEMBAHASAN



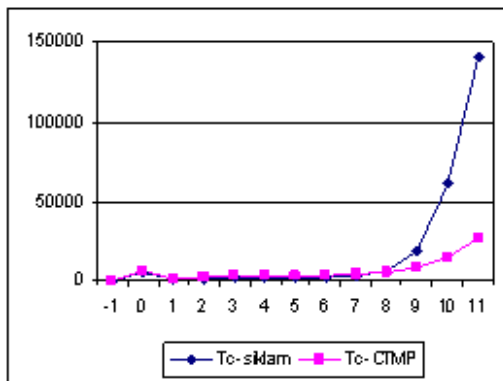
Gambar 1. Efisiensi penandaan ^{99m}Tc -siklam dan ^{99m}Tc -CTMP

Komposisi yang optimal dalam penandaan CTMP dengan teknesium-99m adalah 500 μg CTMP dan 50 μg $\text{SnCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ dalam suasana netral (5,5 – 7,0). Pada kondisi ini, efisiensi penandaan CTMP diperoleh sebesar 95,45 % \pm 0,25 (n=4). Efisiensi penandaan sediaan radiofarmasi sebagai penyidik tulang menurut Farmakope Inggris minimal 95% [5] sedangkan

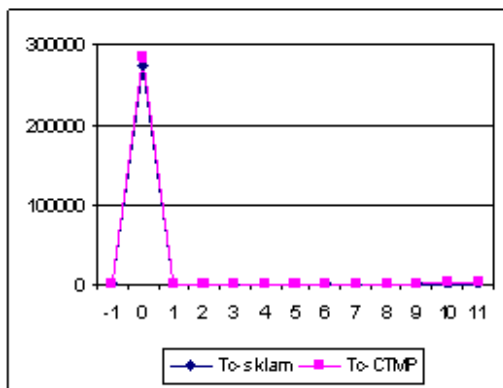
Farmakope Amerika minimal 90% [6]. Berdasarkan kondisi penandaan tersebut, maka senyawa bertanda ^{99m}Tc -CTMP memenuhi persyaratan Farmakope.

Dengan kondisi yang sama dilakukan pula penandaan siklam dengan teknesium-99m dan diperoleh efisiensi penandaan $97,58\% \pm 0,95$ ($n=4$). Efisiensi penandaan senyawa bertanda ^{99m}Tc -CTMP dan ^{99m}Tc -siklam dapat dilihat pada Gambar 1.

Tingginya efisiensi penandaan dari senyawa siklam dan CTMP pada kondisi yang sama, maka metode penandaan dengan teknesium-99m dapat dimanfaatkan untuk menentukan kandungan siklam dalam CTMP secara simultan.



(A)

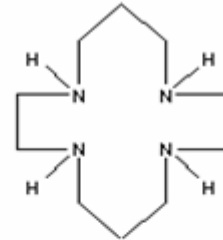


(B)

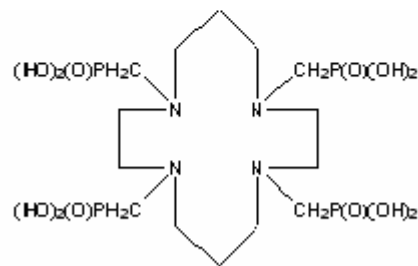
Gambar 2. Kurva senyawa bertanda ^{99m}Tc -CTMP dan ^{99m}Tc -siklam dengan metode kromatografi kertas. A. Eluen NaCl B. Eluen Aseton

Untuk menentukan seberapa besar *impurity* dari siklam terhadap CTMP, metode kromatografi kertas menaik tidak dapat digunakan karena kompleks siklam dan CTMP yang telah bertanda teknesium-99m berada pada puncak yang sama, artinya bahwa kedua senyawa tersebut tidak dapat dipisahkan dengan metode kromatografi kertas. Seperti ditampilkan

pada Gambar 2, puncak senyawa bertanda ^{99m}Tc -CTMP dan ^{99m}Tc -siklam berada pada Rf yang sama, baik dengan pelarut NaCl kedua senyawa bertanda ini berada pada Rf= 1, sedangkan dengan pelarut aseton berada pada Rf = 0.



(A)



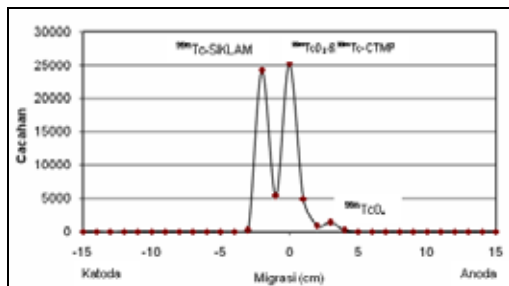
(B)

Gambar 3. Struktur kimia siklam (A) dan CTMP (B)

Sebagai solusinya, metode elektroforesis diharapkan merupakan metode yang tepat untuk memisahkan kedua senyawa tersebut. Prinsip dasar dari metode elektroforesis adalah pemisahan berdasarkan perbedaan muatan dari beberapa senyawa yang akan dipisahkan [8]. Dari struktur kimia CTMP dan siklam (Gambar 3) [3,9] dapat diprediksi bahwa kedua senyawa ini akan terpisah dengan elektroforesis. Senyawa CTMP memiliki gugus fosfonat akan membuat senyawa tersebut bersifat elektronegatif, sehingga dengan menggunakan metode elektroforesis senyawa tersebut akan bergerak ke anoda. Senyawa siklam tidak mempunyai gugus anion, tapi mempunyai gugus amin yang akan menjadi sisi ikat dengan teknesium-99m pada pembentukan kompleks khelat. Senyawa kompleks ini akan lebih cenderung bergerak ke arah katoda.

Penentuan migrasi senyawa bertanda ^{99m}Tc -siklam dan ^{99m}Tc -CTMP beserta pengotor radiokimia dengan menggunakan dapar fosfat belum memberikan hasil yang memuaskan. Berdasarkan kurva yang ditunjukkan pada Gambar 4, tampak bahwa larutan yang semula

ditotolkan tepat pada titik nol telah bergerak ke arah anoda maupun katoda. Puncak larutan $^{99m}\text{TcO}_2$ dan $^{99m}\text{Tc-CTMP}$ masih berada di titik nol sedangkan $^{99m}\text{Tc-siklam}$ sudah bergerak ke arah katoda. Dari pola migrasi tersebut, larutan dapar fosfat pH 8,0 tidak dapat digunakan dalam penentuan *impurity* siklam. Pemisahan yang dilakukan dengan menggunakan larutan dapar karbonat 0,2 M pH 9,2, tegangan 350 Volt dan waktu pemisahan 2 jam menunjukkan pemisahan yang sangat baik antara pengotor radiokimia dalam larutan senyawa bertanda CTMP (Gambar 5). Puncak 1 adalah puncak $^{99m}\text{Tc-siklam}$ yang bergerak 7 cm dari titik nol ke arah katoda (kanan gambar) yang menunjukkan bahwa $^{99m}\text{Tc-siklam}$ bermuatan positif. Muatan positif dari siklam didapat dari adanya gugus amina pada senyawa kompleks $^{99m}\text{Tc-Siklam}$ yang pada proses elektroforesis bergerak ke arah negatif.



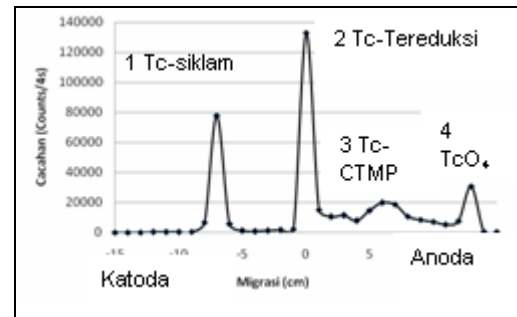
Gambar 4. Pola migrasi senyawa bertanda $^{99m}\text{Tc-CTMP}$ dan pengotornya dengan metode elektroforesis menggunakan larutan dapar fosfat 0,2M pH 8,0

Puncak 2 adalah Tc-tereduksi yang bersifat netral sehingga tidak bergerak ke arah anoda maupun katoda. Puncak $^{99m}\text{Tc-CTMP}$ bergerak ke anoda sejauh 7 cm dari titik nol ke arah anoda, menunjukkan $^{99m}\text{Tc-CTMP}$ bermuatan negatif. Muatan negatif dari senyawa kompleks $^{99m}\text{Tc-CTMP}$ dikarenakan senyawa tersebut memiliki beberapa gugus fosfonat yang bermuatan negatif.

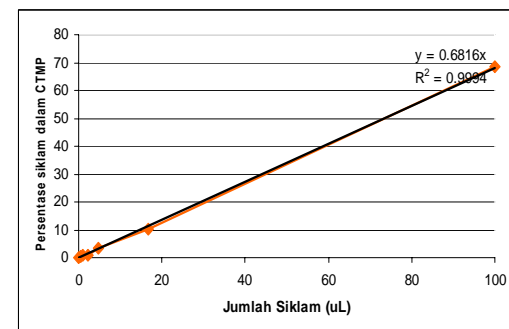
Puncak 4 merupakan puncak dari $^{99m}\text{Tc-perteknetat}$ yang lebih bermuatan negatif dibandingkan senyawa $^{99m}\text{Tc-CTMP}$ sehingga pergerakannya ke arah anoda lebih jauh (sejauh 13 cm dari titik nol). Dari hasil yang diperoleh dapat terlihat bahwa dengan menggunakan metode elektroforesis keempat senyawa tersebut dapat dipisahkan dengan baik.

Untuk menentukan batas kuantitasi siklam, dilakukan variasi konsentrasi siklam dalam CTMP, lalu dilakukan penandaan dengan

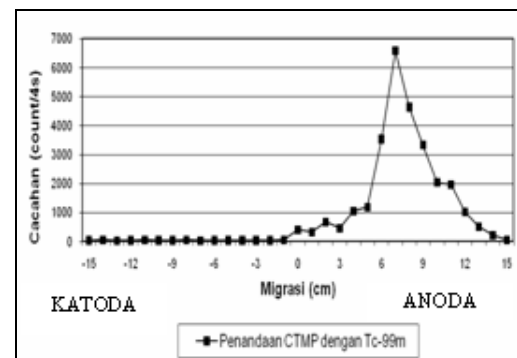
teknesium-99m. Hasil yang diperoleh ditampilkan dalam Gambar 6 yang merupakan kurva standar konsentrasi siklam dalam CTMP. Konsentrasi siklam hingga 0,4 % w/w masih bisa terkuantitasi sehingga untuk konsentrasi siklam dalam CTMP $\geq 0,4\%$ w/w dapat menggunakan metode ini.



Gambar 5. Pola migrasi senyawa bertanda $^{99m}\text{Tc-CTMP}$ dan pengotornya dengan metode elektroforesis menggunakan larutan dapar karbonat pH 9,2



Gambar 6. Grafik perbandingan siklam dalam CTMP terhadap $^{99m}\text{Tc-siklam}$



Gambar 7. Migrasi senyawa bertanda $^{99m}\text{Tc-CTMP}$ dengan elektroforesis

Seperti ditampilkan pada Gambar 7, CTMP hasil sintesis bersifat murni (tidak mengandung siklam). Dari gambar 7, dapat diperoleh keterangan bahwa pergerakan (migrasi) senyawa kompleks ^{99m}Tc -CTMP (untuk CTMP yang diperoleh dari hasil sintesis *in-house* di PTNBR-BATAN Bandung) bergerak ke arah anoda. Pengotor radiokimia yang diperoleh dari hasil migrasi hanya berada pada titik penolatan (titik 0) dan tidak ada yang bergerak ke arah katoda. Hal ini menunjukkan bahwa dari hasil sintesis CTMP yang dilakukan di PTNBR-BATAN Bandung tidak ditemukan adanya *impurities* siklam sebagai bahan dasar dari sintesis CTMP.

4. KESIMPULAN

Hasil penelitian menunjukkan bahwa penentuan kadar siklam dalam CTMP dapat ditentukan secara simultan dengan penandaan ^{99m}Tc -CTMP menggunakan metode elektroforesis. Dengan metode ini, senyawa siklam bertanda teknesium-99m, CTMP bertanda teknesium-99m, $^{99m}\text{TcO}_4$ dan ^{99m}Tc -tereduksi dapat dipisahkan dengan baik dan diperoleh batas kuantitasi siklam hingga 0,4 % w/w.

5. DAFTAR PUSTAKA

1. **MOEDRITZER, K., IRANI. R.R.**, The direct synthesis of α -aminomethyl phosphonic acid. Mannich-type reactions with ortho phosphorous acid., *J.Org.Chem.*, 31 (1966) 1603-1607.
2. **MISYETTI, DARUWATI I, SUSILAWATI E, ISABELA I.** 2005. Sintesis CTMP sebagai Bahan Dasar untuk Pembuatan CTMP bertanda Radioaktif. *Prosiding Seminar Sains dan Teknologi Nuklir PTNBR-BATAN*. Bandung 14-15 Juni 2005.
3. **HERZOG KM, DEUTSCH E.** Synthesis and Renal Excretion of Technetium-99m labeled Organic Cations. *The Journal Nuclear Medicine*. 33(12)(1992)2190-2195.
4. **LIANG X.**, Cyclam complexes and Their Applications in Medicine. *Chem. Soc. Rev.* 33(2004)246-66.
5. **BRITISH PHARMACOPOEIA**. crown.2003. available on cd.
6. **UNITED STATE PHARMACOPOEIA.**, 2002., available: <http://nuclearpharmacy.uams.edu/procl.htm>.
7. **MISYETTI, DARUWATI I.** 2008. Penandaan CMP dengan Teknesium-99m untuk Radiofarmaka Penyidik Kanker Tulang. *Jurnal Sains dan Teknologi Nuklir Indonesia* 19(2):79-88
8. **LEVIE, R.**, "Principles of Quantitative Chemical Analysis". Allanson K., Ed., McGraw Hill. Singapore. 1997.
9. **KOTHARI.K., SAMUEL G., BANERJEE.S., UNNI.P.R., SARMA, H.D.**, ^{186}Re -1,2,8,11-Tetraaza cyclotetradecyl-1,2,8,11-Tetramethylene phosphonic acid: A novel agent for possible use in metastatic bone-pain palliation, *Nucl.Med. and Biol.*, 28 (2001) 709-717.