

SINTESIS DAN KARAKTERISASI MEBROFENIN UNTUK PENYIDIK SISTEM HEPATOBILIARI

Purwoko*, Swasono R. Tamat*, Fitri Yunita* dan Eti Kristanti**

ABSTRAK

SINTESIS DAN KARAKTERISASI MEBROFENIN UNTUK PENYIDIK SISTEM HEPATOBILIARI. Mebrofenin bertanda Teknisium-99m adalah sediaan radiofarmaka yang mempunyai sifat ideal dan unggul untuk penyidikan dan uji fungsi hati dan empedu. Telah dilakukan penelitian sintesis dan karakterisasi Mebrofenin (3-bromo-2,4,6-trimetil asetanilida iminodiasetat), yang merupakan senyawa turunan IDA, melalui tiga tahap reaksi yaitu asetilasi senyawa 2,4,6 trimetil anilin untuk mendapatkan senyawa 2,4,6-trimetil khloro asetanilida, dilanjutkan brominasi sehingga diperoleh senyawa turunan bromotrimetil dan reaksi substitusi nukleofilik dengan asam Iminodiasetat (IDA) untuk menghasilkan mebrofenin. Reaksi asetilasi dan brominasi dilakukan dalam suasana asam asetat sedangkan reaksi substitusi dilakukan dengan cara refluks selama 5 jam dalam pelarut etanol dan air dengan pH 11. Pelarut etanol diuapkan melalui destilasi tekanan rendah, dan sisa larutan campuran kemudian disaring. Larutan filtrat dikondisikan menjadi pH 2-2,5 dan endapan mebrofenin yang diperoleh direkristalisasi 3 kali dengan etanol. Karakterisasi terhadap mebrofenin dilakukan dengan pengamatan titik leleh (197-199°C), analisis spektrum ultra ungu, spektrum infra merah, spektrum masa dan kromatografi cair – HPLC. Hasil karakterisasi menunjukkan bahwa sintesis menghasilkan mebrofenin dengan kemurnian tinggi dan dengan rendemen 20%.

ABSTRACT

SYNTHESIS AND CHARACTERIZATION OF MEBROFENIN FOR HEPATOBILLIARY IMAGING. Mebrofenin labeled with Technetium-99m is a new radiopharmaceutical having superior and ideal characteristic as a hepatobilliary-imaging agent. The synthesis and characterization of Mebrofenin (3-Bromo-2,4,6-trimethyl acetanilido iminodiacetic acid) as IDA derivative has been carried out involving three steps of reaction i.e. : acetyllization of 2,4,6-Trimethyl aniline to get 2,4,6-trimethyl chloro acetanilide which upon bromination gives the intermediate bromotrimethyl derivative and finally by nucleophylic substitution this intermediate product with iminodiacetic acid (IDA) gives mebrofenin. The acetylation and bromination reactions were carried out in acetic acid condition while the substitution was carried out by reflux for 5 hours in ethanol and water adjusted at pH 11. The ethanol was then removed under low pressure, and the unreacted compound was removed by filtration. The filtrate was adjusted to pH 2 - 2.5, and the resulting mebrofenin was isolated by filtration and recrystallized 3 times in ethanol. Characterization of the mebrofenin product was performed by observing its melting point (197-199°C), ultra violet and infra red spectra as well as mass spectrometric and high performance liquid chromatographic analysis. The results showed that the product was highly pure and the yield was around 20%.

*) Pusat Pengembangan Radioisotop dan Radiofarmaka, BATAN, Serpong.

***) Fakultas Farmasi -FMIPA, ISTN, Jakarta

PENDAHULUAN

Telah diketahui beberapa senyawa ligan bertanda Tc-99m turunan iminodiasetat (IDA) yang digunakan untuk diagnosa sistem Hepatobiliari (hati dan empedu). Senyawa-senyawa turunan IDA antara lain adalah 2,6-dietil-IDA, p-butil IDA, 2,6-diisopropil-IDA dan 2,6-dimetil-IDA [3].

Dari senyawa turunan IDA di atas, senyawa ligan trimetil bromo IDA yang dikenal dengan mebrotfenin dan diperdagangkan dengan nama 'choletec'[4] diketahui mempunyai beberapa keunggulan antara lain lebih mudah ditandai dengan Tc-99m dengan kemurnian tinggi, mudah serta cepat terakumulasi dan diekskresikan oleh sistem hati dan empedu [1].

Beberapa Rumah Sakit di Indonesia yang mempunyai fasilitas kedokteran nuklir telah menggunakan senyawa-senyawa tersebut di atas sebagai sediaan radiofarmaka dan ternyata sebagian masih diimpor dari luar negeri. Untuk mengurangi ketergantungan akan sediaan radiofarmaka dari luar negeri maka dilakukan penelitian untuk mensintesis senyawa 3-bromo-2,4,6 trimetil asetanilida iminodiasetat (mebrotfenin) melalui tiga tahap reaksi sesuai yang dikembangkan oleh E. Chiotellis [2].

Tahap pertama adalah reaksi asetilasi dari senyawa 2,4,6 trimetil anilin atau mesidin untuk mendapatkan 2,4,6 trimetil khloro asetanilida, kemudian dilanjutkan dengan brominasi terhadap senyawa hasil tahap pertama untuk mendapatkan 3-bromo-2,4,6-trimetil khloro asetanilida. Tahap selanjutnya adalah reaksi substitusi nukleofilik terhadap senyawa hasil tahap ke dua atau senyawa turunan bromotrimetil dengan senyawa iminodiasetat (IDA). Hasil dari reaksi ini akan diperoleh mebrotfenin dan dimurnikan dengan cara rekristalisasi berulang. Kemudian dilakukan karakterisasi terhadap produk mebrotfenin dengan penentuan titik leleh, kromatografi cair (HPLC), analisa spektrum ultra ungu, Infra merah, dan spektrometri masa.

Dari hasil sintesis ini diharapkan akan dapat dilakukan penelitian lanjutan, yaitu penelitian tentang penandaan mebrotfenin atau 3-bromo-2,4,6 trimetil asetanilida IDA dengan Tc-99m sampai pada tahap uji biodistribusi dan produksi kit sediaan radiofarmaka serta pengawasan kualitasnya.

BAHAN DAN PERALATAN

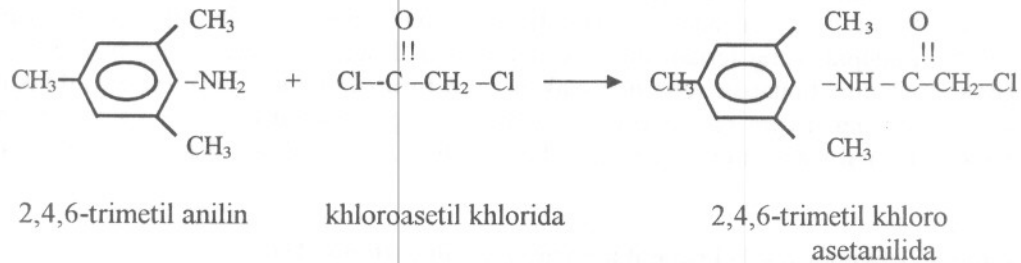
2,4,6-Trimetil anilin, khloroasetil khlorida dan asam iminodiasetat yang digunakan berasal dari Kasei-TCI sedangkan larutan bromin, asam asetat, metanol, etanol absolut, natrium hidroksida, natrium asetat, natrium metabisulfid, asam khlorida dan karbon aktif yang digunakan adalah buatan E. Merck dengan tingkat kemurnian pereaksi analisis.

Peralatan yang digunakan antara adalah peralatan gelas refluks, alat pemanas, termometer, penyaring Buchner, rotary evaporator (Buchi RE-11), pH meter (Orion), Spektrofotometer infra merah (FT/IR Shimadzu 8201 PC), alat uji titik leleh (Fisher-Johns), perangkat kromatografi cair - HPLC (Waters, model 484), spektrofotometri UV/VIS (Jasco V-550) dan alat spektrometri masa (Finigan model GCQ).

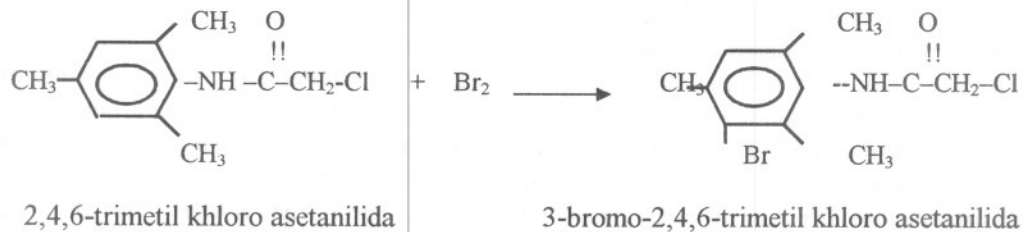
TATA KERJA

Senyawa Mebrofenin (3-bromo-2,4,6-trimetil asetanilida IDA) disintesis melalui tiga tahap reaksi sebagai berikut :

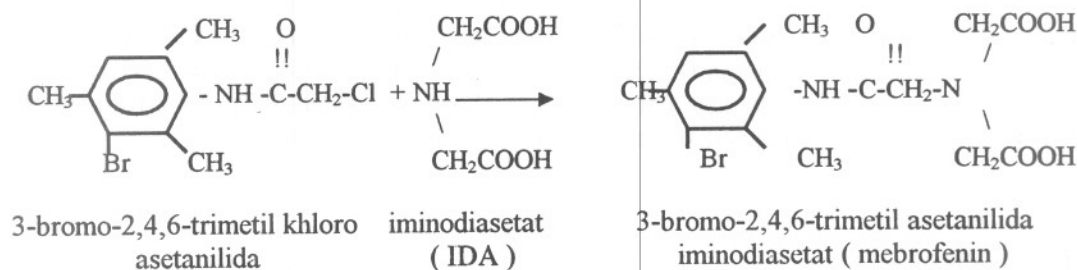
Tahap I : Sintesis 2,4,6- trimetil asetanilida



Tahap II: Sintesis 3-bromo-2,4,6-trimetil khloro asetanilida



Tahap III : Sintesis 3-bromo-2,4,6-trimetil-asetanilida iminodiasetat (mebromfenin)



Sintesis 2,4,6 trimetil khloro asetanilida (tahap I)

Ke dalam erlenmeyer 100 mL, 17 gram 2,4,6-trimetil anilin dilarutkan dalam 80 gram asam asetat glasial. Labu erlenmeyer dimasukkan ke dalam penangas es suhu 0-5°C dan ditambahkan tetes demi tetes 12 mL larutan khloroasetil khlorida sambil diaduk (selama penambahan suhu dijaga tidak lebih dari 10°C).

Ke dalam larutan campuran reaksi ditambahkan larutan natrium asetat (32 gram dalam 130 mL air), pengadukan dilanjutkan selama 1 jam dan suhu dipertahankan pada 0-5°C. Endapan yang terjadi disaring dan dicuci dengan air, kemudian dikeringkan di dalam desikator. Endapan yang merupakan 2,4,6-trimetil asetanilida (produk I) dilakukan pemurnian dengan cara rekristalisasi dua kali masing-masing dengan 50 mL etanol 96%. Rendemen hasil 8,87 gram atau 33,3%. Titik leleh 103-105°C (pustaka : 102-104°C) [2].

Sintesis 3-bromo-2,4,6-Trimetil khloro asetanilida (tahap II)

Sebanyak 7,5 gram senyawa 2,4,6-trimetil asetanilida (produk I) dimasukkan ke dalam labu bundar 100 mL. Kemudian dimasukkan larutan asam asetat glasial 50 mL dan dipanaskan dengan penangas air pada suhu 70°C. sehingga senyawa produk I larut sempurna. Larutan bromin (5,5 gram dalam 20 mL asam asetat glasial) ditambahkan tetes demi tetes sambil diaduk selama 2 jam ke dalam larutan produk I pada suhu 60°C. Pengadukan dan pemanasan dilanjutkan sampai 2 jam, kemudian dibiarkan sambil diaduk selama 16 jam pada suhu kamar. Sambil terus diaduk ditambahkan larutan natrium meta bisulfit (6,5 gram dalam 100 mL air). Endapan yang terjadi dipisahkan dan dicuci dengan air, kemudian dikeringkan dalam desikator. Endapan yang merupakan 3-bromo-2,4,6-trimetil khloro asetanilida (produk II) dimurnikan dengan cara rekristalisasi dua kali masing-masing dengan 50 mL etanol dan 50 mL campuran etanol : air (80 : 20). Rendemen hasil 10,86 gram (52,7 %). Titik leleh 177-179°C (pustaka : 175-177 °C) [2].

Sintesis 3-bromo-2,4,6-trimetil asetanilida iminodiasetat (mebrofenin)

Sebanyak 6,4 gram senyawa 3-bromo-2,4,6-trimetil khloro asetanilida (produk II) dimasukkan ke dalam labu bundar 100 mL leher dua. Kemudian dimasukkan 20 mL etanol dan diaduk hingga larut sempurna. Disediakan larutan asam iminodiasetat dengan cara melarutkan 2,1 gram dalam 10 mL air, pH diatur menjadi 12 dengan menambahkan larutan NaOH 1N dan air sehingga volume akhir menjadi 20 mL. Larutan iminodiasetat tersebut dimasukkan ke dalam labu bundar yang berisi larutan produk II, kemudian campuran direfluks selama 6 jam. Selama refluks berlangsung larutan campuran dipertahankan pada pH 11-12 dengan menambahkan larutan NaOH 10%. Setelah refluks selesai, etanol diuapkan dengan evaporator vakum, kemudian larutan sisanya disaring untuk memisahkan produk II yang tidak bereaksi. Filtrat yang diperoleh diatur pH nya menjadi 2 - 2,5 dengan menambahkan HCl 5N, dan campuran didinginkan semalam di dalam lemari es. Endapan yang terjadi disaring dan dicuci dengan air, kemudian direkristalisasi 3 kali masing-masing dengan 30 mL etanol absolut dan hasilnya merupakan senyawa mebrofenin murni dengan rendemen hasil 0,78 gram (20 %). Titik leleh 197-199°C (pustaka : 198-200°C) [4].

Penentuan kemurnian Mebrofenin dengan alat kromatografi-cair (HPLC)

Kurang lebih 1 mg dari senyawa mebrofenin ditimbang dan dilarutkan di dalam 10 mL metanol untuk memperoleh larutan dengan kadar kurang lebih 100 ppm. Kemudian larutan tersebut disaring dengan penyaring milipore 20 µL dari larutan tersebut diinjeksikan ke dalam alat HPLC dengan kondisi sebagai berikut :

Kolom : µ-Bondapak C18 (0,8 ID x 30 Cm stainless steel)

Fasa gerak : methanol : air (80:20)

Kecepatan aliran : 0,8 mL/menit

Detektor : UV, 254 nm

Sensitivitas : 0.01 AUFS

Hal yang sama dilakukan pula untuk senyawa produk I dan II .

Penentuan spektrum absorpsi Mebrofenin

Untuk membuat rekaman spektrum absorpsi dari mebrofenin, maka dibuat larutan dengan kadar 100 ppm dalam pelarut etanol, kemudian dimasukkan ke dalam kuvet dan diukur serapannya dengan alat spektrofotometer ultra-ungu/cahaya tampak. Hal yang sama dilakukan pula untuk senyawa produk I dan II.

Penentuan spektrum Infra merah Mebrofenin

Mebrofenin dalam fasa padat dicampur dengan KBr, digerus sampai diperoleh sebuk halus, kemudian dimasukkan ke dalam plat khusus pencetak pelet dan dipres. Kemudian spektrumnya direkam dengan alat spektrofotometer FT/IR .

Penentuan spektrum gas/masa Mebrofenin

Kurang lebih 5 mg dari mebrofenin ditimbang dan dilarutkan dalam etanol sehingga kadarnya 250 ppm. Spektrum masanya direkam dengan alat spektrometer gas/masa.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Pada sintesis 2,4,6 trimetil khloro asetanilida (tahap I), reaksi dilakukan pada suasana asam asetat (CH_3COOH). Adanya asam ini dapat mengkatalisis reaksi asetilasi karena adisi atom H^+ pada gugus karbonil dari khloro asetil khlorida akan meningkatkan sifat elektrofilik atom C dan mempermudah penyerangan 2,4,6-trimethyl anilin sebagai nukleofil. Disamping itu adanya tiga gugus metil yang merupakan gugus pendorong elektron pada anilin memberikan efek induksi dan memperkuat sifat nukleofil dari anilin sehingga akan mempermudah reaksi.

Pada sintesis 3-bromo 2,4,6-trimetil khloro asetanilida (tahap II), reaksi brominasi dilakukan pada suasana asam asetat. Adanya atom O dan Cl pada senyawa tahap I, (2,4,6 trimetil khloro asetanilida) menyebabkan posisi meta (C-3 atau C-5) menjadi lebih aktif untuk menerima penyerangan gugus atau atom Brom. Meskipun efek sterik dari ketiga gugus metil dapat menghambat, namun sebagai gugus pendorong elektron ketiga gugus metil tersebut juga mengaktifkan posisi C-3 atau C-5 untuk menerima penyerangan atom Brom.

Reaksi substitusi nukleofilik (tahap III) untuk sintesis mebrofenin dilakukan pada suasana basa (pH 11-12). Hal ini untuk meningkatkan sifat nukleofil dari asam iminodiasetat (IDA) [5].

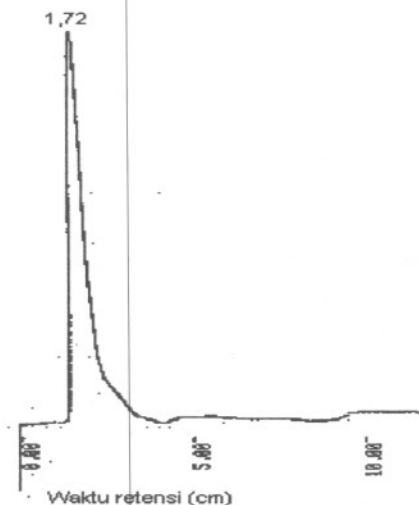
Hasil sintesis dari setiap tahapan reaksi di atas telah dilakukan pemeriksaan terhadap kemurnian dengan uji titik leleh dan kromatografi cairan (HPLC). Hasil pengujian titik leleh terhadap senyawa produk I, II dan mebrofenin menunjukkan hasil yang sesuai dengan yang dinyatakan dalam pustaka (Tabel 1).

Tabel 1. Hasil pengujian titik leleh hasil sintesis

| Senyawa hasil sintesis | Hasil pengujian (°C) | Pustaka (°C) |
|------------------------|----------------------|---------------|
| Produk I | 103 – 105 | 102 – 104 [2] |
| Produk II | 177 – 179 | 175 – 177 [2] |
| Mebrofenin | 197 – 199 | 198 – 200 [4] |

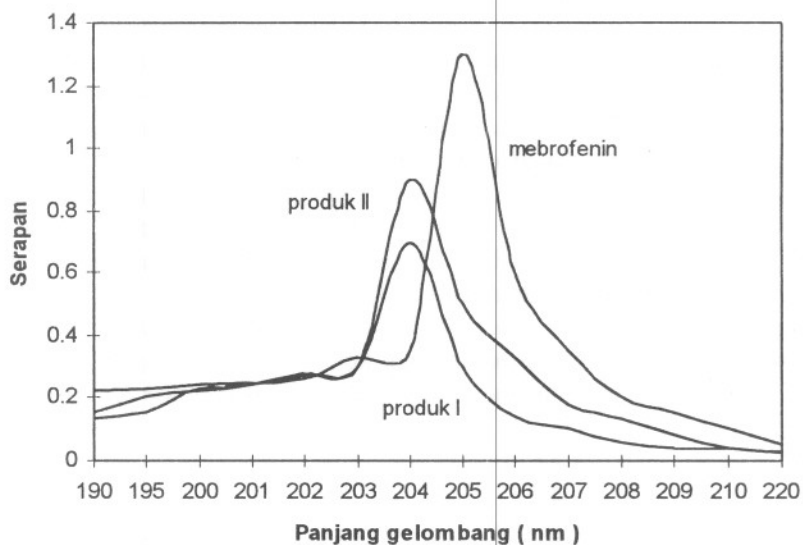
Untuk senyawa produk I dan II telah sesuai dengan hasil sintesis yang dilakukan oleh Chiotellis dan kawan [2] sedangkan untuk mebrofenin data dari Chiotellis menunjukkan titik leleh 219°C , namun menurut data dari Merck Index edisi 11 [4] menunjukkan bahwa titik leleh mebrofenin adalah $198\text{-}200^{\circ}\text{C}$.

Hasil pengujian senyawa mebrofenin menggunakan kromatografi cair (HPLC) dengan kolom μ -Bondapak C18 (0,8 ID x 30 cm stainless steel), eluen metanol/air (80:20), laju aliran 0,8 mL/menit dan detektor UV pada panjang gelombang 254 nm, memberikan puncak tunggal dengan waktu (jarak) retensi 1,72 cm (Gambar 1), dan berbeda dengan puncak-puncak dari pereaksi sebelumnya. Hal ini memberi petunjuk bahwa produk sintesis mebrofenin mempunyai kemurnian yang tinggi. Hasil elusi produk I dan produk II masing-masing menunjukkan waktu (jarak) retensi 2,7 cm dan 3,3 cm.



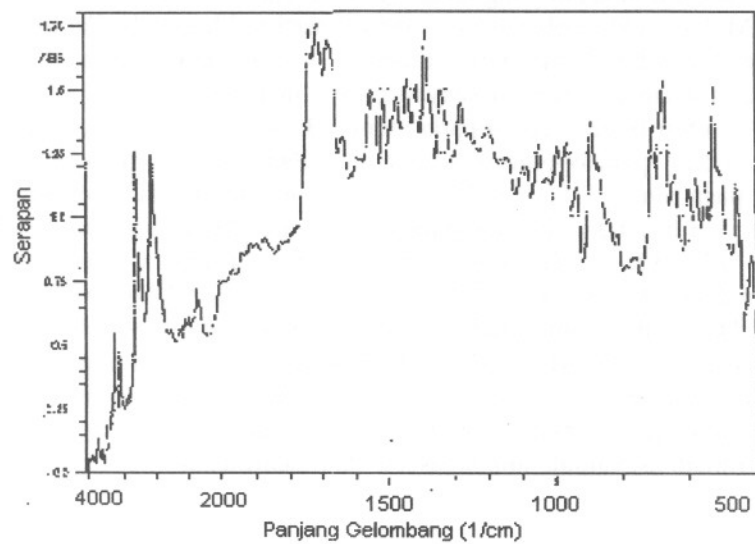
Gambar 1. Kromatogram HPLC dari senyawa mebrofenin

Hasil pengujian senyawa mebprofenin dengan spektrofotometer ultra ungu/cahaya tampak memberikan puncak serapan maksimum pada 205,5 nm, sedangkan produk I dan II memberikan serapan maksimum masing-masing pada 203 nm dan 203,5nm (seperti terlihat pada Gambar 2). Dari spektrum absorpsi terhadap ke tiga produk tersebut memperlihatkan pola struktur yang bersesuaian, hal ini disebabkan karena masing-masing mempunyai gugus kromofor yang hampir sama yaitu cincin aromatik yang tersubstitusi kromofor amida.

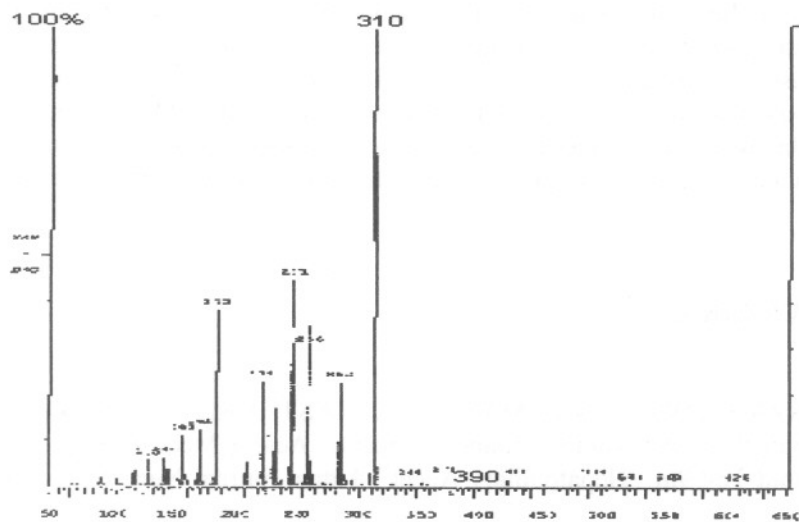


Gambar 2. Spektrum absorpsi senyawa produk I, II dan mebprofenin

Hasil pengujian senyawa hasil sintesis dengan spektrofotometer infra merah memberikan spektrum pita-pita serapan pada daerah frekuensi atau bilangan gelombang 3030 - 3101 cm^{-1} (uluran C-H aromatik); 2923 - 2995 cm^{-1} (C-H metil); 1709 - 1732 cm^{-1} (C=O stretching, karboksilat); 1631 cm^{-1} (HN-C-, amida); 1342 (HN-C aromatik) dan 524 - 673 cm^{-1} (C-Br) seperti terlihat pada Gambar 3. Pita-pita serapan tersebut merupakan indikasi kesesuaian gugus fungsi senyawa hasil sintesis dengan gugus fungsi pada struktur mebprofenin.



Gambar 3 . Spektrum infra merah senyawa mebrofenin



Gambar 4. Spektrum masa dari senyawa mebrofenin

Hasil pengujian senyawa mebrofenin dengan alat spektrometri masa GC-MS memberikan puncak ion molekul yang lemah (kurang dari 5%) pada $m/e = 390 (M^+ + 4)$, dimana Berat Molekul (M) mebrofenin = 386 (seperti terlihat pada Gambar 4). Puncak ion molekul tersebut lebih besar dari hitungan, hal ini dapat disebabkan oleh tidak sempurnanya daya pisah dan adanya senyawa yang mengandung atom atau isotop yang lebih berat dari isotop biasa seperti pada atom ^{81}Br sehingga menghasilkan puncak ion molekul ($M^+ + 4$) dan puncak-puncak sibirian +4. Pada spektrum ditemukan puncak ion fragmen pada $m/e = 310; 311 (M^+ + 4 - 79)$ yang merupakan puncak kuat (100%) akibat pelepasan ion bromida. Puncak-puncak lainnya terdapat pada $m/e = 241$, $m/e = 161$ dan $m/e = 145$ yang masing-masing diduga merupakan puncak-puncak ion fragmen dari molekul $\text{C}_6\text{HBr}(\text{CH}_3)_3\text{N}^+\text{H}=\text{C}=\text{O}$, $\text{C}_6\text{H}_2(\text{CH}_3)_3\text{N}^+\text{H}=\text{C}=\text{O}$ dan $-\text{CH}_2\text{N}(\text{CH}_2\text{COOH})_2$ akibat pemutusan ikatan tunggal dari $-\text{CO}-\text{---CH}_2-$ serta setelah mengalami penyusunan ulang Mc. Lafferty. Sedangkan puncak ion $m/e = 256 (M^+ + 4 - 132)$ merupakan puncak ion fragmen akibat pelepasan molekul $-\text{N}=(\text{CH}_2\text{COOH})_2$. Puncak-puncak ion fragmen tersebut apabila dihubungkan akan sesuai dengan struktur 3-bromo-2,4,6-trimetil asetanilida iminodiasetat atau mebrofenin.

KESIMPULAN

Dalam penelitian ini telah dapat disintesis senyawa murni 3-bromo-2,4,6-trimetil asetanilida iminodiasetat atau mebrofenin dengan kemurnian tinggi dan rendemen hasil sekitar 20 %. Senyawa tersebut disintesis melalui tiga tahap reaksi yaitu asetilasi, brominasi dan substitusi nukleofilik dari bahan-bahan 2,4,6-trimetil anilin, khloroasetil khlorida, Bromin dan asam imino diasetat (IDA). Reaksi asetilasi dan brominasi dilakukan dalam suasana asam asetat sedangkan reaksi substitusi nukleofilik dilakukan dalam suasana basa (pH 11-12) sesuai yang dikembangkan oleh E.Chiotellis dan kawan.

DAFTAR PUSTAKA

1. D.V.S. NARASIMHAN, R.S. MANI, T.R. KASTHURI, S. DEVARU, "3-Bromo-2,4,6 Trimethyl Acetanilido Imino Diacetic Acid (Mebrofenin) : Synthesis for use as rapid Tc-99m Hepatobiliary Agent", Indian Journal Nucl. Med. vol.3 (1998), 9-12.
2. E. CHIOTELLIS, N. FORAMATIKUL, " Report of research contract IAEA Fellow ", OAEP Bangkok, Thailand, January (1992)

3. B. ZMBOVA, D. K. DJOKIC, I.TADZER, "Synthesis and Quality Control of ^{99m}Tc -p-Butyl IDA ", *Journal Appl.Radiat. Isotop.* Vol.36, No.5, (1985), 389-394.
4. THE MERCK INDEX, An Encyclopedia of Chemicals, Drugs and Biologicals, "Mebrofenin", Centennial Edition, 11th, Merck & Co., Inc , Rahmy , N.Y., USA (1989) , 904.
5. R.S. WAYAN, M. FARUQ, B.S. NURLAILA , "Sintesis dan Penandaan N-(2,6-Diethyl Asetanilide) Iminodiasetat (HIDA) Dengan ^{99m}Tc " *Majalah BATAN* Vol. XVIII, No.3 Oktober, (1985), 67-81.