

PREPARASI KIT CAIR TETROFOSMIN UNTUK DETEKSI KANKER DAN PERFUSI JANTUNG

Widyastuti, Sri Setyowati, Cecep Taufik Rustendi, Yunilda
Pusat Radioisotop dan Radiofarmaka-BATAN

ABSTRAK

PREPARASI KIT CAIR TETROFOSMIN UNTUK DETEKSI KANKER DAN PERFUSI JANTUNG. Kit tetrofosmin yang ditandai dengan teknesium-99m telah digunakan secara luas di bidang kedokteran nuklir untuk deteksi perfusi jantung dan deteksi kanker, yang dikenal dengan nama Myoview. Telah dilakukan pembuatan kit cair tetrofosmin untuk ditandai dengan teknesium-99m sebagai studi awal dalam pengembangan radiofarmaka ^{99m}Tc -tetrofosmin untuk mempelajari teknik pembuatan, pengujian dan kestabilannya dalam penyimpanan. Metode uji kemurnian radiokimia menggunakan kromatografi lapis tipis (KLT), kromatografi kertas (KK) dan pemisahan dengan kolom SepPak C18 telah divalidasi menggunakan larutan perteknetat ^{99m}Tc dan ^{99m}Tc -tetrofosmin dari kit impor (Myoview) sebagai standar. Karakterisasi tetrofosmin, ^{99m}Tc dan ^{99m}Tc -tetrofosmin menggunakan kromatografi cair kinerja tinggi (HPLC) telah dilakukan dan menunjukkan perbedaan waktu retensi yang cukup signifikan antara ^{99m}Tc dan ^{99m}Tc -tetrofosmin yaitu 6 dan 8 menit. Pengujian kemurnian radiokimia terhadap 3 *batch* kit tetrofosmin yang dilakukan menggunakan KLT dengan fase diam ITLC-SG dan eluen campuran aseton dan diklorometan (35 : 65), KK dengan fase diam kertas Whatman-3 dan eluen etil asetat serta kolom SepPak C18 dengan eluen larutan NaCl fisiologis (salin) menunjukkan kemurnian radiokimia rata-rata 85,89% (SD=1,44%) dan stabil pada penyimpanan di suhu -80°C hingga 2 bulan. Hasil penelitian menunjukkan bahwa kit tetrofosmin dalam bentuk cair telah berhasil dibuat dan dapat ditandai dengan ^{99m}Tc -dengan kemurnian radiokimia yang cukup tinggi meskipun belum sesuai dengan persyaratan kit pada umumnya.

Kata kunci : ^{99m}Tc -Tetrofosmin, kemurnian radiokimia, diagnosis, perfusi jantung.

ABSTRACT

PREPARATION OF TETROFOSMIN FROZEN KIT FOR CANCER DETECTION AND MYOCARDIAL PERFUSION. Tetrofosmin labeled with technetium-99m has been widely used in nuclear medicine as myocardial perfusion imaging agent and for use in cancer detection, with brand name of Myoview. Preparation of tetrofosmin liquid kits labeled with ^{99m}Tc has been carried out as a preliminary study in development of tetrofosmin radiopharmaceuticals which focuses in the techniques of preparation, quality control and stability study upon storage. Analytical methods using thin layer chromatography (TLC), paper chromatography (PC) and SepPak C18 have been validated using pertechnetate ^{99m}Tc and ^{99m}Tc -tetrofosmin from commercial product (Myoview) as standards. Characterisation of tetrofosmin, ^{99m}Tc dan ^{99m}Tc -tetrofosmin using HPLC has also been carried out which showed significant difference in retention time between ^{99m}Tc and ^{99m}Tc -tetrofosmin i.e 6 and 8 minute. Radiochemical purity testing in 3 batches of tetrofosmin kits uses TLC with ITLC-SG and mixture of acetone and dichloromethane (35:65), PC with Whatman-3 and ethyl acetate as eluants and SepPak C18 cartridge eluted with saline showed radiochemical purity of 85,89% (SD=1,44%) which was stable up to 2 months upon storage in -80°C . Results showed that wet preparation of tetrofosmin kits can be labeled with ^{99m}Tc with high labeling efficiency although not sufficiently high as stated in the common requirements of radiopharmaceuticals.

Key-words : ^{99m}Tc -tetrofosmin, radiochemical purity, diagnosis, myocardial perfusion

PENDAHULUAN

Penyakit jantung dan kanker merupakan penyakit yang menduduki peringkat tertinggi penyebab kematian di Indonesia dan dari tahun ke tahun jumlah penderitanya semakin bertambah. Penyebabnya diduga akibat perubahan budaya antara lain pola makan, gaya hidup, polusi dan sebagainya disamping karena faktor genetika, dan kelainan anatomis-fisiologis [1].

Jenis kanker yang banyak ditemukan di Indonesia adalah kanker leher rahim (serviks), payudara, paru-paru, prostat dan kanker usus (kolorektal) [2]. Beberapa metode diagnosis telah digunakan di dunia kedokteran antara lain CT-Scan, ultrasonografi, MRI, pemeriksaan laboratorium patologi klinis melalui biopsi, radiofarmaka dan sebagainya. Metode diagnosis menggunakan radiofarmaka di Indonesia perkembangannya relatif lambat disebabkan antara lain biaya pemeriksaannya relatif mahal karena masih menggunakan produk impor dan masih ada keengganan sebagian besar klinisi untuk memilih metode menggunakan teknologi nuklir.

Pusat Radioisotop dan Radiofarmaka (PRR) BATAN telah mengembangkan radiofarmaka MIBI (metoksiisobutilisonitrit) sejak 15 tahun yang lalu dan pada tahun ini akan diproduksi secara komersial oleh industri farmasi setelah nomor ijin edarnya diperoleh dari Badan POM (Pengawasan Obat dan Makanan). Radiofarmaka MIBI atau biasa disebut kit MIBI yang ditandai dengan radionuklida teknesium ^{99m}Tc telah digunakan secara rutin di beberapa rumah-sakit besar di Indonesia yang mempunyai fasilitas kedokteran nuklir sebagai perangkat diagnosis penyakit jantung dan kanker,

tetapi sampai sekarang masih digunakan produk impor.

PRR sedang mengembangkan radiofarmaka lain yang fungsinya sama dengan kit MIBI yaitu tetrafosmin. Produk tetrafosmin impor telah pula digunakan secara rutin di beberapa rumah-sakit sebagai perangkat diagnosis penyakit jantung dengan nama dagang Myoview dan beberapa rumah-sakit lebih menyukai tetrafosmin dibandingkan dengan MIBI karena lebih praktis dalam hal preparasinya di rumah sakit.

Sebagai preparat pencitraan perfusi jantung, tetrafosmin memberikan kinerja yang mirip dengan MIBI, sedangkan untuk pentahapan kanker beberapa peneliti menyatakan bahwa MIBI lebih unggul daripada tetrafosmin, namun demikian penelitian mengenai perbandingan kinerja MIBI dan tetrafosmin dalam pentahapan/pencitraan kanker sampai saat ini masih dilakukan oleh peneliti di bidang kedokteran nuklir. Tetrafosmin dan MIBI bertanda ^{99m}Tc serta ^{201}Tl -klorida memberikan kinerja yang setara sebagai preparat penyidik miokardial (otot jantung), namun energi yang dipancarkan oleh ^{99m}Tc (140 keV) lebih memadai dibandingkan ^{201}Tl (70-80 keV). Preparasi ^{99m}Tc -tetrafosmin lebih mudah dan praktis dibandingkan ^{99m}Tc -MIBI karena tidak perlu pemanasan. [3]

Tetrafosmin mempunyai rumus kimia 1,2-bis[bis(2-etoksi etil)fosfino]etana yang akan berikatan dengan radionuklida teknesium ^{99m}Tc valensi 5 membentuk senyawa kompleks kation yang bersifat lipofil yaitu $^{99m}\text{Tc}(\text{tetrafosmin})_2\text{O}_2^+$ atau senyawa kation trans-dioxo-bis(diphosphine)-teknesium (V). Sebagaimana senyawa kationik bermuatan positif satu lainnya yaitu ^{99m}Tc -MIBI dan

^{201}Tl -klorida, $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -tetrofosmin akan mengalami penangkapan pada otot jantung, disamping organ-organ lainnya misalnya hati, paru-paru, ginjal dan sebagainya [3,4].

Reaksi penandaan/kompleksasi $^{99\text{m}}\text{Tc(V)}$ dengan tetrofosmin berlangsung lambat hingga 6 jam dan kompleks trans-diokso Tc(V) difosfin yang terbentuk bersifat labil secara termodinamika sehingga cenderung berubah menjadi $[\text{}^{99\text{m}}\text{Tc}(\text{tetrofosmin}_3)]^+$ yang tidak dapat masuk ke otot jantung, tetapi reaksi dapat dipercepat dengan meningkatkan konsentrasi tetrofosmin atau pemanasan [3,4].

Untuk mempercepat reaksi dan menstabilkan senyawa kompleks $[\text{trans-diokso } \text{Tc(V)} \text{ tetrofosmin}]^+$ dapat ditambahkan suatu senyawa koligan yang berfungsi sebagai transkhelator antara lain natrium D-glukonat, kemudian proses pertukaran ligan (penggeseran glukonat oleh tetrofosmin) dipercepat dengan penambahan natrium sulfosalisilat dan suasana pH basa dipertahankan dengan penambahan dapar bikarbonat [3,5,7].

Metode pengujian kemurnian radiokimia $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -tetrofosmin atau efisiensi penandaan tetrofosmin dapat dilakukan dengan metode HPLC dengan kolom Hamilton PRP-1 dengan eluen campuran dapar fosfat pH 7 dan asetonitril. Selain HPLC dapat digunakan pula kromatografi lapis tipis dengan ITLC-SG/campuran aseton-diklorometan (35:65) atau kromatografi kertas dengan kertas Whatman-1/etil asetat dan kolom Sep-Pak C18 dengan eluen salin [4,6].

Di beberapa negara telah didirikan *centralised radiopharmacy* yaitu pusat yang

melakukan pembuatan radiofarmaka (*compounding*) dan mendistribusikan ke berbagai rumah-sakit dalam bentuk sediaan siap-injeksi (*injectable radiopharmaceuticals*) misalnya Syncor (Amerika Serikat), GIPHARMA (Italia) dan Nihon Medi-Physics (Jepang) [10]. Sediaan radiofarmaka siap-injeksi sangat berguna apabila dikembangkan di Indonesia, terutama untuk mengantisipasi apabila ada kendala dalam hal suplai larutan perteknetat $^{99\text{m}}\text{Tc}$, sehingga pelayanan radiofarmaka di rumah-sakit tidak terhambat. Salah satu radiofarmaka siap-injeksi yang akan dikembangkan di PRR-BATAN adalah $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -tetrofosmin, sebagai alternatif dari kit kering tetrofosmin yang akan dikembangkan juga di PRR-BATAN.

Tujuan akhir penelitian ini adalah untuk memperoleh metode pembuatan kit tetrofosmin dan analisis radiofarmaka $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -tetrofosmin yang tervalidasi dilengkapi dengan data/informasi tentang spesifikasi yang meliputi data kemurnian radiokimia dan stabilitas serta data biodistribusi pada hewan coba dan manusia (relawan).

METODOLOGI

Karakterisasi ligan tetrofosmin dan tetrofosmin bertanda $^{99\text{m}}\text{Tc}$ serta $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -perteknetat dilakukan menggunakan HPLC dengan kolom PRP1 (Hamilton) dengan eluen campuran dapar fosfat 0,005 M pH 7 dan asetonitril serta puncak diamati pada panjang gelombang 254 nm.

Metode uji kemurnian radiokimia menggunakan kromatografi kertas (KK) dengan fasa diam kertas Whatman-3 dan fasa gerak etil asetat, kromatografi lapis tipis (KLT) dengan fasa diam

ITLC-SG dan fasa gerak campuran aseton dan diklorometan (35:65) serta kolom Sep-Pak C18 divalidasi menggunakan larutan perteknetat ^{99m}Tc (PRR-BATAN) dan kit komersial tetrafosmin (Myoview/GE-Healthcare) sebagai standar. Pada kromatografi kertas ^{99m}Tc -Tetrafosmin akan bergerak naik dengan Rf 1,0 sedangkan ^{99m}Tc bebas dan ^{99m}Tc koloid tetap pada titik penolatan. Pada kromatografi lapis tipis senyawa kompleks ^{99m}Tc -tetrafosmin akan terelusi pada Rf 0,3-0,7 sedangkan pengotor Tc koloid pada Rf 0 dan Tc bebas pada Rf 0,8-1,0. Analisis menggunakan kolom Sep-Pak C18 dilakukan dengan eluen larutan NaCl fisiologis (salin) untuk mengeluarkan ^{99m}Tc bebas (pengotor polar), kemudian etanol 95% untuk mengeluarkan ^{99m}Tc -tetrafosmin, sedangkan $^{99m}\text{TcO}_2$ (pengotor berupa ^{99m}Tc koloid) tertahan di kolom. [4,6]

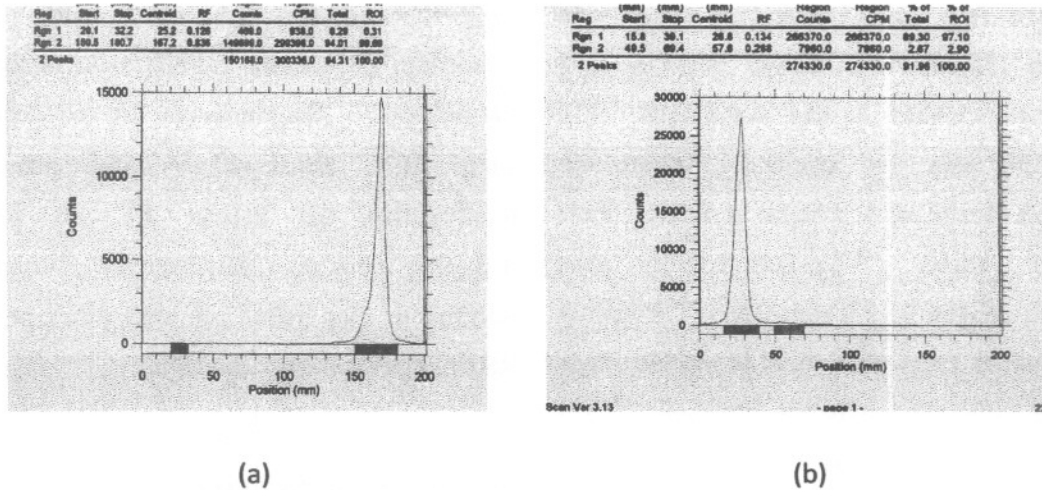
Komposisi kit tetrafosmin adalah 0,125 mg tetrafosmin, 0,5 mg natrium D-glukonat, 0,175 mg dinatrium sulfosalisilat, 0,025 mg stanoklorida dihidrat, 0,9 mg natrium bikarbonat dan larutan perteknetat ^{99m}Tc , serta pH larutan reaksi diatur pada pH 8-8,5.

Uji stabilitas dilakukan pada kit tetrafosmin yang disimpan pada suhu -80°C dengan menandai dengan ^{99m}Tc dan menguji kemurnian radiokimianya setiap bulan hingga diperoleh angka dibawah 90%

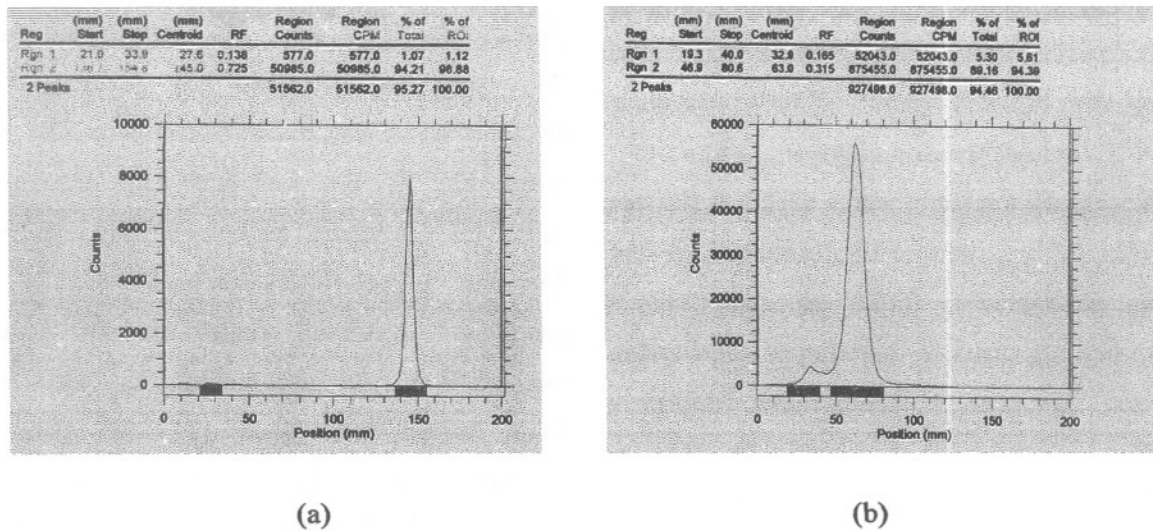
yang menunjukkan bahwa kit sudah tidak lagi memenuhi persyaratan radiofarmaka sesuai dengan Farmakope. Penyimpanan kit tetrafosmin pada suhu -80°C dimaksudkan untuk mengawetkan/menstabilkan kit karena kit cair tetrafosmin disiapkan untuk pembuatan senyawa bertanda ^{99m}Tc -tetrafosmin siap pakai, sehingga pihak pengguna di RS tidak perlu menyimpannya.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Metode uji kemurnian radiokimia menggunakan KLT, KK dan kolom SepPak C18 terlebih dahulu divalidasi menggunakan larutan perteknetat- ^{99m}Tc dan kit tetrafosmin impor (Myoview). Pada KLT dan KK perteknetat- ^{99m}Tc memberikan puncak berturut-turut pada Rf 1 dan 0, sedangkan ^{99m}Tc -tetrafosmin berimpit dengan ^{99m}Tc pada KLT dan terelusi pada jarak yang cukup dekat dari titik 0 pada KK (Gambar 1 dan 2). Hasil pengujian kemurnian radiokimia kit Myoview menggunakan gabungan metode Sep-Pak C18 dan TLC dengan fasa diam ITLC-SG dan eluen campuran aseton dan diklorometan (35:65) menunjukkan ^{99m}Tc -tetrafosmin sebesar 98,88%, pengotor polar ^{99m}Tc perteknetat atau Tc bebas sebesar 0,0% dan Tc koloid sebesar 1,12%.



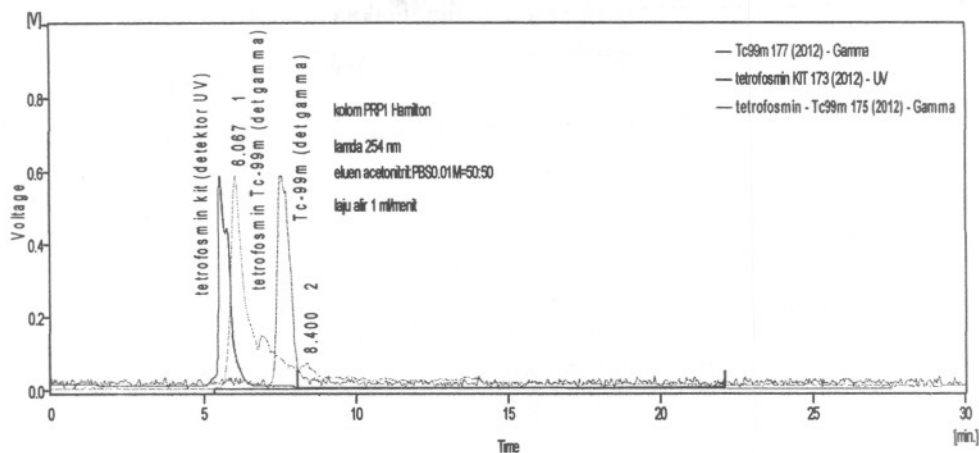
Gambar 1. Profil ^{99m}Tc (larutan perteknetat) pada kromatogram ITLC-SG (a) dan kertas Whatman-3 (b)



Gambar 2. Profil ^{99m}Tc -tetrofosmin (Myoview) pada kromatogram ITLC-SG (a) dan kertas Whatman-3 (b)

Karakterisasi tetrofosmin, dan ^{99m}Tc -tetrofosmin menggunakan HPLC dengan eluen campuran asetonitril dengan dapar fosfat 5 mM menggunakan kolom PRP1 pada panjang gelombang 254 nm menunjukkan puncak tetrofosmin yang

belum ditandai dan tetrofosmin bertanda ^{99m}Tc berada pada posisi yang berdekatan (~6 menit) sedangkan puncak ^{99m}Tc terletak pada menit ke 8,4. Hal ini menunjukkan bahwa tetrofosmin berhasil ditandai dengan ^{99m}Tc (Gambar 2).



Gambar 3. Puncak kiri menunjukkan tetrofosmin (sampel kit tetrofosmin percobaan; detektor UV), puncak tengah menunjukkan ^{99m}Tc -tetrofosmin (sampel kit tetrofosmin yang telah ditandai; detektor gamma) dan puncak kanan menunjukkan ^{99m}Tc (sampel larutan perteknetat ^{99m}Tc ; detektor gamma)

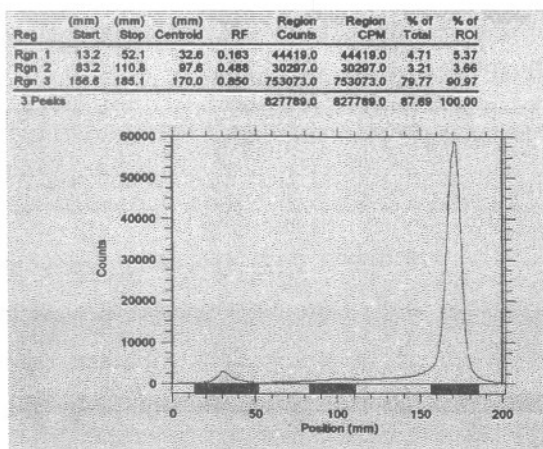
Tetrofosmin berhasil dilabel dengan ^{99m}Tc dengan kemurnian radiokimia yang cukup tinggi, namun masih belum memenuhi ketentuan Farmakope yang mempersyaratkan kemurnian radiokimia sediaan radiofarmaka di atas 90%. Hasil analisis kemurnian radiokimia kit cair tetrofosmin dapat dilihat pada Tabel 1.

Kit kering (liofilisasi) tetrofosmin telah berhasil dibuat dengan kemurnian radiokimia

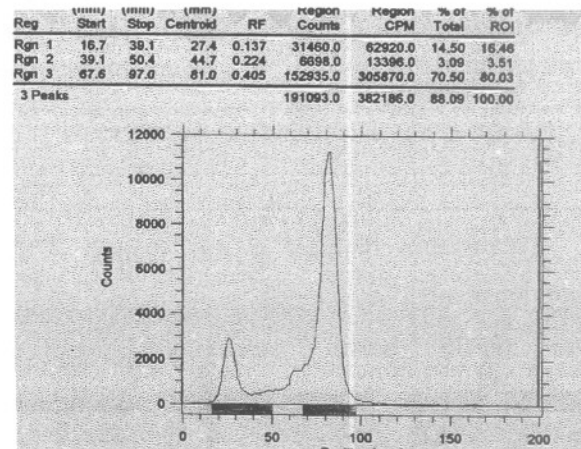
97,97%, sedangkan pada saat yang bersamaan kit Myoview diuji juga dan memberikan kemurnian radiokimia sebesar 99,82%. Namun demikian pembuatan kit kering tetrofosmin perlu divalidasi dengan melakukan pengulangan beberapa kali, minimal 3 *batch* dengan kemurnian radiokimia yang setara (di atas 90%)

Tabel 1. Hasil analisis kemurnian radiokimia menggunakan kombinasi kolom Sep-Pak C18 dan kromatografi lapis tipis (TLC)

No. Batch	^{99m} Tc bebas	^{99m} Tc-koloid	^{99m} Tc-tetrofosmin (%)
1	8,97	5,13	85,90
3	15,44	0,12	84,44
2	0,14	12,54	87,32
Rata-rata % kemurnian radiokimia ^{99m} Tc-tetrofosmin dari kit cair			85,89
Standar Deviasi (%)			1,44



(a)

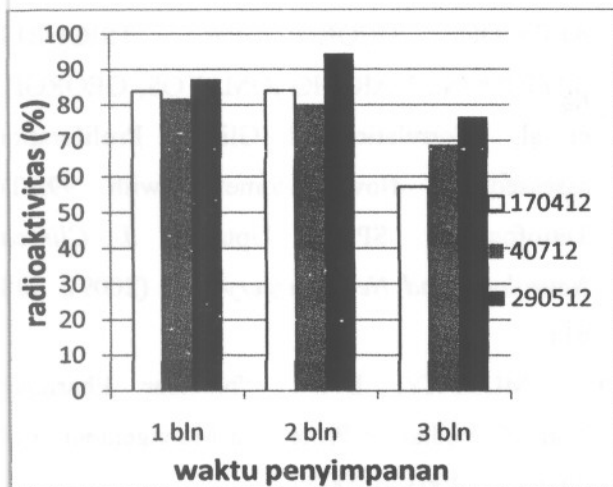


(b)

Gambar 4. Puncak ^{99m}Tc-tetrofosmin berimpit dengan puncak ^{99m}Tc bebas pada Rf 1,0, sedangkan puncak pada Rf 0,0 menunjukkan adanya ^{99m}Tc-koloid pada KLT (a), sedangkan pada KK ^{99m}Tc-koloid dan ^{99m}Tc bebas berimpit pada Rf 0,0 (b).

Stabilitas kit cair tetrofosmin telah diamati hingga bulan ke-3 setelah pembuatan, hasilnya menunjukkan hingga bulan ke-2 setelah pembuatan tidak menunjukkan adanya penurunan kemurnian radiokimia, sedangkan pada bulan ke-3 terlihat

penurunan kemurnian radiokimia yang berarti yaitu dibawah 80% (Gambar 4). Namun demikian akan dilakukan pengamatan pada beberapa batch lainnya untuk memperoleh data yang valid.



Gambar 5. Stabilitas kit cair tetrofosmin pada penyimpanan dalam freezer dengan suhu -80°C

KESIMPULAN

Telah dibuat kit tetrofosmin cair sebanyak 3 *batch* yang setelah disimpan dalam *freezer* dengan suhu -80°C menunjukkan kemurnian radiokimia rata-rata 85% dan stabil hingga 2 bulan. Disamping itu telah dibuat satu *batch* kit tetrofosmin yang dikeringkan (liofilisasi) dan setelah disimpan dalam lemari pendingin dengan suhu $2-8^{\circ}\text{C}$ menunjukkan kemurnian radiokimia 97,97% sementara kit tetrofosmin impor (Myoview) kemurnian radiokimianya hampir 100%. Kit cair tetrofosmin yang dihasilkan belum memenuhi persyaratan Farmakope karena kemurnian radiokimianya rata-rata dibawah 90%. Untuk itu perlu dicari solusi untuk meningkatkan kemurnian radiokimianya misalnya dengan mengalirkan gas nitrogen ke dalam tiap vial berisi kit cair sesaat sebelum penutupan vial pada saat pembuatan.

Disamping itu, mengingat kit dalam bentuk kering lebih stabil dalam penyimpanan, maka rencana ke depan akan diulang pembuatan kit kering tetrofosmin dan pengujian kualitasnya untuk

membuktikan validitas metode yang digunakan baik metode pembuatan kit maupun metode pengujian kemurnian radiokimianya. Target akhir penelitian ini adalah memperoleh protokol pembuatan kit cair dan kit kering tetrofosmin yang memenuhi syarat Farmakope dan stabil pada penyimpanan hingga beberapa bulan setelah pembuatan.

UCAPAN TERIMA KASIH

Ucapan terima kasih penulis sampaikan untuk staf Bidang Radioisotop dan Radiofarmaka khususnya yang terkait dengan penyediaan larutan perteknetat $^{99\text{m}}\text{Tc}$ atas bantuannya selama kegiatan penelitian ini dan pihak lainnya yang telah membantu baik secara langsung maupun tidak langsung.

DAFTAR PUSTAKA

1. KARDINAH, RS. Kanker Dharmais, Komunikasi Pribadi, Tahun 2009.
2. Globocan 2008 Indonesia, Summary Statistics of the most frequent cancers in Indonesia, www.globocan.iarc.fr, diakses tgl 4 April 2011, p. 1-8.
3. D'ARCEUIL, HELEN E., "Technetium-99m tetrofosmin: Use for myocardial perfusion imaging in the detection of coronary artery disease", Review, Reports in Medical Imaging 2010:3 1-10.
4. KELLY, J. D., ALAN, N., FORSTER, M., HIGLEY, B., ARCHER, COLIN M., BOOKER, FONG S., "Technetium-99m Tetrofosmin as a New Radiopharmaceutical for Myocardial

-
- Perfusion Imaging”, *J. Nucl. Med.* Vol 34, No. 2, Feb. 1993, 222-227.
5. Technetium-99m Radiopharmaceuticals: Manufacture of the Kits, Technical Reports Series No. 466, IAEA, Vienna, 2008, p. 126-129.
 6. HAMMES, R., JOAS, L.A., KIRSCHLING, T.E., LEDFORD, J.R., KNOX, T.L., et al, “A Better Method of Quality Control for ^{99m}Tc -Tetrofosmin”, *J Nucl Med Technol* 2004; 32:72-78.
 7. NOWOTNIK, D.P. AND VERBRUGGEN, A.M., “Practical and Physicochemical Aspects of the Preparation of ^{99m}Tc -labeled Radiopharmaceuticals”, Textbook of Radiopharmacy : Theory and Practice, 3rd Ed., Gordon and Breach Science Publishers, 37-56.
 8. LEE, JUNG SUB., KIM, SEONG-JANG., KIM, IN-JU., et al, “Characterization of breast lesion using double phase ^{99m}Tc Tetrofosmin scintimammography: Comparison of visual and quantitative analysis”, *Eur. J Radiol* 57 (2006), 76-80.
 9. ALEXIOU, GEORGE A., TSIOURIS, SPYRIDON., VARTHOLOMATOS, GEORGE., et al, “Correlation of Glioma Proliferation assessed by flow cytometry with ^{99m}Tc Tetrofosmin SPECT Uptake”, *J. Clinical Neurology and Neurosurgery* 111 (2009), 808-811.
 10. MURPHY, DAN., “Nuclear Pharmacy Primer”, Radiation Protection Management, Vol. 20, No. 5, 2003, p. 18-27.
 11. WIDYASTUTI, HANAFIAH. A, LAKSMI A, et al, "Formulasi Kit MIBI sebagai Preparat Penatah Jantung", *Jurnal Radioisotop dan Radiofarmaka*, Vol.2, No. 1,2, Juli 1999, hal. 1-18.
 12. WIDYASTUTI, LAKSMI A., ANNA R, et al, "Preparasi ^{99m}Tc -HYNIC-TOC yang akan digunakan untuk pencitraan tumor", *Prosiding Pertemuan dan Presentasi Ilmiah Penelitian Dasar Ilmu Pengetahuan dan Teknologi Nuklir*, Yogyakarta, 12 Juli 2005
-