

PEMBUATAN DAN KARAKTERISASI FISIKOKIMIA KIT RADIOFARMAKA ^{99m}Tc -HIDA UNTUK PENYIDIK SISTEM HEPATOBILIAR

Rukmini Ilijas, Epy Isabela

Pusat Teknologi Nuklir Bahan dan Radiometri - BATAN

ABSTRAK

PEMBUATAN DAN KARAKTERISASI FISIKOKIMIA KIT RADIOFARMAKA ^{99m}Tc -HIDA UNTUK PENYIDIK SISTEM HEPATOBILIAR. Senyawa HIDA atau [N-(2,6-dietil asetanilid)-iminodiasetat] setelah ditandai dengan radionuklida teknesium- ^{99m}Tc mempunyai kemampuan farmakodinamik untuk mempelajari sistem hepatobiliar. Penelitian terdahulu baru sampai pada tahap pembuatan kit cair radiofarmaka HIDA, maka pada penelitian ini dilakukan pembuatan kit kering HIDA dan penentuan sifat fisikokimianya yang meliputi: kestabilan kit kering dalam penyimpanan, lipofilisitas (P) dalam oktanol-air, ikatan dengan protein plasma, dan kestabilan radiofarmaka ^{99m}Tc -HIDA setelah disimpan pada temperatur kamar. Kemurnian radiokimia ditentukan secara kromatografi kertas menggunakan kertas Whatman I dengan dua macam pelarut yaitu aseton kering dan natrium klorida fisiologis. Lipofilisitas (P) ^{99m}Tc -HIDA ditetapkan melalui penentuan koefisien partisinya dalam pelarut oktanol-air. Ikatan protein plasma sediaan ditentukan secara *in-vitro* dengan metode pengendapan menggunakan larutan asam trikloro asetat (TCA) 5%. Uji stabilitas kit kering HIDA menunjukkan bahwa kit tetap stabil sampai 4 bulan penyimpanan pada temperatur $\pm 4^\circ\text{C}$ dengan kemurnian radiokimia $85,58 \pm 0,78\%$, lipofilisitas (P) sebesar $0,833 \pm 0,14$, ikatan protein plasma manusia sebesar $40,42 \pm 2,85\%$. Demikian pula sediaan ^{99m}Tc -HIDA masih stabil setelah disimpan pada temperatur kamar selama 6 jam dengan kemurnian radiokimia sebesar $94,40 \pm 0,92\%$.

Kata kunci : kit kering, radiofarmaka, HIDA, ^{99m}Tc -HIDA

ABSTRACT

PREPARATION AND PHYSICO-CHEMICAL CHARACTERIZATION OF ^{99m}Tc -HIDA RADIOPHARMACEUTICAL KIT FOR HEPATOBILIARY IMAGING. HIDA or [N-(2,6-diethyl acetanilide)-iminodiacetic acid] after being labelled with technetium- ^{99m}Tc having pharmacodynamic ability suitable for hepatobiliary imaging. The previous research come up with the preparation of the radiopharmaceutical kit in a liquid phase. This study deals with the preparation of HIDA dry kit and the determination of the radiopharmaceutical character such as: stability of the dry kit, lipophilicity (P) in oktanol-water, the plasma binding protein and stability of the ^{99m}Tc -HIDA radiopharmaceuticals after kept at room temperature. Radiochemical purity was determined by paper chromatography method on Whatman I paper using two kinds of eluents e.g. dry acetone and physiological sodium chloride. The lipophilicity (P) of ^{99m}Tc -HIDA was determined by oktanol-water partition, while the determination of plasma binding protein was carried out *in-vitro*, by precipitation method using 5% of trichloro acetic acid solution. The result show that HIDA dry kit remained stable for 4 months of storage at $\pm 4^\circ\text{C}$. It revealed that the radiochemical purity was $85.58 \pm 0.78\%$, the lipophilicity (P) was 0.833 ± 0.14 and the human plasma binding protein was $40.42 \pm 2.85\%$. The stability determination showed that ^{99m}Tc -HIDA was still able to be used until 6 hours after labelling with the radiochemical purity of $94.40 \pm 0.92\%$.

Key words : dry kit, radiopharmaceuticals, HIDA, ^{99m}Tc -HIDA

kromatografi, trikloro asetat (E. Merck), kertas kromatografi Whatman I (Whatman), natrium klorida fisiologis, akuabides steril untuk injeksi (IPHA), n-oktanol (TCI), plasma manusia dari 2 orang volunteer dan gas nitrogen (Aneka Gas).

Peralatan yang digunakan adalah neraca analitis semi mikro dan pH meter (Mettler Toledo), seperangkat alat kromatografi, pengaduk magnetik (Nouva), batang pengaduk magnetik (Cole Parmer), syringe 1 dan 2,5 mL (Terumo), cawan petri dan gelas piala (Pyrex), vial (Igar Jaya), *laminar air flow* (Clemco), *freeze dryer* (Lab Conco) dan pencacah saluran tunggal (Ortec).

Penyiapan larutan HIDA

Sebanyak 200 mg HIDA dilarutkan dalam akuabides steril bebas oksigen untuk injeksi, pH larutan diatur menjadi 13,0 – 13,5 dengan penambahan NaOH 10 N. Larutan diaduk dengan pengaduk magnetik selama 30 menit, kemudian pH larutan diturunkan menjadi 5,5 – 6,0 dengan penambahan HCl 6 N. Wadah ditutup dan larutan dialiri gas nitrogen selama 15 menit.

Pembuatan larutan $\text{SnCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$

Sebanyak 5 mg $\text{SnCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ dilarutkan dengan 0,5 mL HCl 1 M, kemudian volume ditepatkan menjadi 1 mL dengan akuabides steril untuk injeksi. Wadah ditutup dan larutan dialiri gas nitrogen selama 5 menit.

Pembuatan kit kering HIDA

Ke dalam vial steril 25 mL dimasukkan larutan HIDA dan larutan $\text{SnCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, pH campuran diatur menjadi 5,5 – 6,0. Larutan disaring ke dalam vial steril 25 mL dengan penyaring bakteri steril 0,22 μm , kemudian dibagikan ke dalam vial steril 10 mL masing-masing sebanyak 0,5 mL. Vial steril 10 mL yang telah berisi kit cair HIDA disusun ke dalam baki khusus *freeze dryer*, lalu dimasukkan ke dalam alat *freeze dryer* dan dikeringkan selama 48 jam.

Penandaan kit kering HIDA

Ke dalam vial yang berisi kit kering HIDA ditambahkan 0,1 - 0,3 ml larutan $\text{Na}^{99\text{m}}\text{TcO}_4$ ($\approx 3 - 5$ mCi), dikocok dan diinkubasi pada temperatur kamar selama ± 5 menit lalu ditentukan kemurnian radiokimianya.

$$\text{Lipofilisitas} = \text{Koef. partisi O/A (P)} = \frac{\text{cacahan fase oktanol}}{\text{cacahan fase air (NaCl fisiologis)}}$$

Penentuan ikatan protein plasma senyawa ^{99m}Tc-HIDA

Dua ratus mikroliter senyawa ^{99m}Tc-HIDA dimasukkan ke dalam tabung sentrifuga yang telah berisi 2000 µL plasma darah manusia (dari 2 orang yang berbeda) dan campuran diaduk dengan alat *vortex mixer* lalu diinkubasi pada temperatur 37 °C selama 10 menit (percobaan dibuat duplo, dengan 3 kali pengulangan). Ke dalam tabung sentrifuga, ditambahkan 1 mL NaCl fisiologis dan 1 mL trikloro asetat 5% dalam air. Campuran diaduk dengan alat *vortex mixer* lalu disentrifuga pada 3000 rpm selama 15 menit. Supernatan dan endapan dipisahkan, endapan dicuci dengan 1 mL NaCl fisiologis dan 1 mL trikloro asetat. Larutan hasil cucian digabung dengan supernatan. Supernatan dan endapan masing-masing dicacah dengan pencacah saluran tunggal.

Ikatan protein plasma dapat dihitung dengan persamaan berikut :

$$\text{Persen ikatan protein plasma} = \frac{\text{cacahan endapan}}{\text{cacahan total}} \times 100\% .$$

Penentuan kestabilan ^{99m}Tc-HIDA setelah disimpan pada temperatur kamar

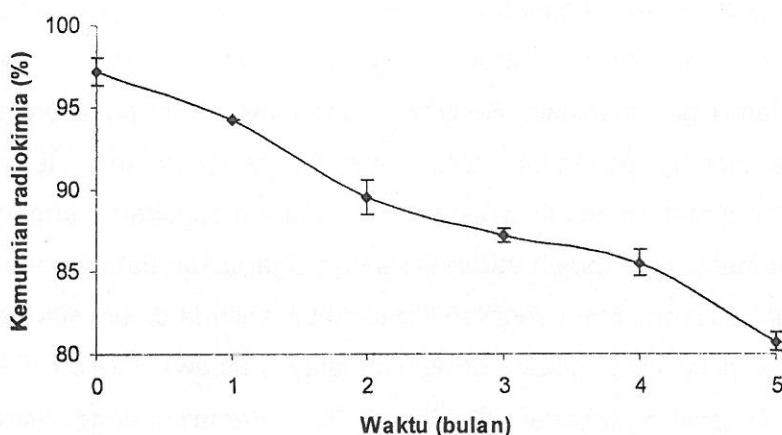
Kit kering HIDA yang telah ditandai dengan teknesium-99m, disimpan pada temperatur kamar dan ditentukan kemurnian radiokimianya setelah disimpan selama 1, 2, 3, 4, 5 dan 6 jam.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Senyawa HIDA disintesis melalui reaksi substitusi nukleofilik senyawa 2,6-dietil kloro asetanilid dengan asam iminodiasetat dalam suasana basa, dan struktur kimianya hampir sama dengan obat lidocaine. HIDA merupakan senyawa pengkhelat sehingga dengan mudah dapat ditandai oleh radionuklida teknesium-99m dan stabil baik secara *in vivo* maupun *in vitro* (Gambar 1).

rumah sakit. Untuk itu seharusnya dilakukan pemeriksaan kemurnian radiokimia dalam skala waktu tertentu, tetapi dalam penelitian ini pemeriksaan dilakukan dengan skala waktu tidak beraturan, bergantung pada tersedianya radionuklida teknesium-99m.

Dari Gambar 2 dapat dilihat bahwa kit kering radiofarmaka HIDA mengalami degradasi kemurnian selama penyimpanan pada temperatur 4°C, yang diindikasikan dengan menurunnya kemurnian radiokimia pada pengujian selama rentang waktu 4 bulan, namun sampai 5 bulan penyimpanan, sediaan masih menunjukkan kemurnian radiokimia di atas 80%. Menurunnya kualitas kit dalam penyimpanan ini mungkin disebabkan oleh terlepasnya gugus OH⁻ dari senyawa HIDA [4] yang menyebabkan naiknya pH pada saat dilarutkan. Hal ini terlihat dari terbentuknya pengotor ^{99m}Tc tereduksi yang terus bertambah seiring dengan lamanya penyimpanan.



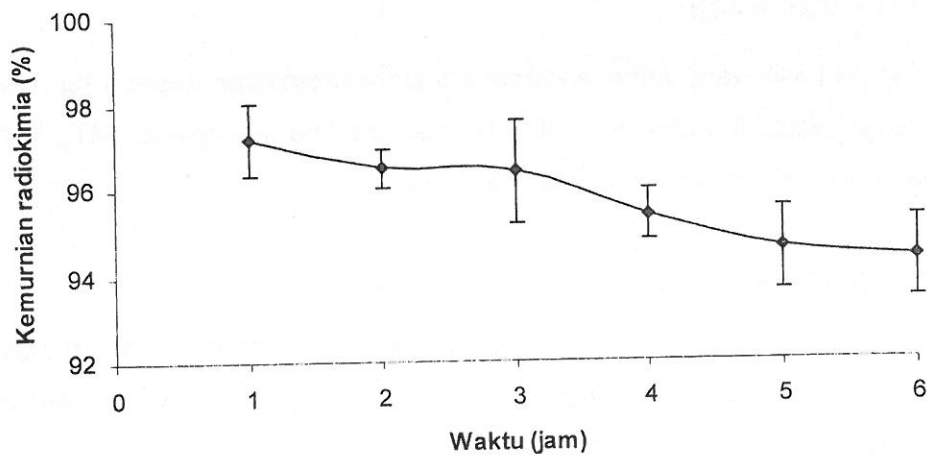
Gambar 2. Kestabilan kit kering radiofarmaka HIDA dalam penyimpanan.

Radiofarmaka ditargetkan pada organ tertentu, tidak bersirkulasi dalam aliran darah atau terakumulasi dalam jaringan, harus mampu menembus membran lipid yang terisolasi pada dinding dalam sel. Beberapa mekanisme yang ada untuk memfasilitasi transfer ini adalah proses aktif (memerlukan molekul lain yang dikenal sebagai reseptor pada dinding luar sel) karena kebanyakan obat dan radiofarmaka berdifusi secara pasif. Dengan mekanisme ini, lipofilisitas dari senyawa haruslah sedemikian rupa sehingga dapat menembus membran lipid dan keluar pada sisi lain. Dalam proses menembus membran lipid, senyawa harus mempunyai lipofilisitas yang cukup untuk dapat melewati membran, karena senyawa yang sangat hidrofobik dapat berdifusi dalam kecepatan yang sangat rendah [9, 10].

Lipofilisitas didefinisikan sebagai afinitas suatu senyawa terhadap fase lipid yang menggambarkan kemampuan senyawa tersebut berpenetrasi ke dalam membran

Tabel 1. Stabilitas sediaan ^{99m}Tc -HIDA

| Waktu pemeriksaan sediaan (jam) | Pengotor | | Kemurnian radiokimia ^{99m}Tc -HIDA |
|---------------------------------|------------------------|----------------------|--|
| | $^{99m}\text{TcO}_4^-$ | $^{99m}\text{TcO}_2$ | |
| Segera | $0,64 \pm 0,42$ | $2,20 \pm 0,53$ | $97,16 \pm 0,85 \%$ |
| 1 | $0,33 \pm 0,25$ | $3,17 \pm 0,55$ | $96,50 \pm 0,43 \%$ |
| 2 | $0,82 \pm 0,72$ | $2,74 \pm 0,54$ | $96,44 \pm 1,20 \%$ |
| 3 | $1,05 \pm 0,52$ | $3,05 \pm 0,38$ | $95,91 \pm 0,60 \%$ |
| 4 | $3,20 \pm 1,25$ | $2,39 \pm 0,33$ | $94,40 \pm 0,96 \%$ |
| 5 | $2,75 \pm 0,78$ | $2,62 \pm 0,22$ | $94,63 \pm 0,92 \%$ |
| 6 | $1,82 \pm 0,44$ | $3,54 \pm 0,24$ | $94,63 \pm 0,43 \%$ |
| 24 | $7,30 \pm 1,20$ | $10,93 \pm 0,74$ | $81,77 \pm 0,80 \%$ |



Gambar 3. Stabilitas radiofarmaka ^{99m}Tc -HIDA setelah disimpan pada temperatur kamar.

Dari Tabel 1 dan Gambar 3 dapat dilihat bahwa segera setelah penandaan, pengotor ($^{99m}\text{TcO}_2$ dan $^{99m}\text{TcO}_4^-$ bebas) yang terbentuk sekitar 1,84 %, tetapi setelah disimpan pada temperatur kamar selama 6 jam persentase pengotor naik menjadi 5,37 % dan pada penyimpanan selama 24 jam persentase pengotor menjadi 18,23 %. Hal ini mungkin disebabkan terlepasnya gugus OH^- dari senyawa HIDA seperti telah dibahas sebelumnya.

Penelitian ini akan dilanjutkan dengan uji biodistribusi terhadap hewan percobaan sehingga kit kering HIDA ini betul-betul layak digunakan sebagai sediaan radiofarmasi.

7. HWANG, I., Hepatobiliary scintigraphy, Walter Reed Medical Center, <http://www.wramc.amedd.army.mil/departements/nuclear/lectures/hepatobil/sld001.htm> (2003) 5.
8. GOPAL B. SAHA, "Fundamental of Nuclear Pharmacy", 2nd ed., Springer-Verlag, N.Y., 1984:74 – 75.
9. THEOBALD, A., "Radiopharmaceuticas Using Radioactive Compound in Pharmaceutics and Medicine", John Willey & Sons, N. Y., 1989: 29 – 37.
10. NICHOLSON, R. W., HERMAN, K. J., SHIELDS, R. A. AND TESTA, H. J., The plasma protein binding of HIDA, Eur J. Nucl. Med 5 (1980) 311 – 312.
11. OEKAR, N.K., KUSTIWA, RD. SUKENDAR, EPY, I., Karakteristik dan uji klinis radiofarmaka ^{99m}Tc -L,L-EC untuk sidik fungsi ginjal, J. Radioisotop dan Radiofarmaka 5 (1/2) (2002) 25-41.
12. NANNY, K. H., ILJAS, R., ISWAHYUDI, Karakteristik radiofarmaka sidik otak ^{99m}Tc -L,L-ECD, J. Sains dan Teknologi Nuklir Indonesia 1 (2) (2000) 43-58.