

Sintesis Senyawa (1,4,7,10- Tetraazasiklodosekana 1,4,7,10-Tetraasetat)-Folat Sebagai Prekursor Senyawa Pengontras Terarah [Gadolinium-(1,4,7,10- Tetraazasiklodosekana 1,4,7,10-Tetraasetat)-Folat]

ERIANTI SISKA PURNAMASARI^{1*}

¹)Program Studi Kimia Fakultas Sains dan Teknologi Universitas Wanita Internasional, Jl. Pasir Kaliki
No.179 Bandung 40173

*alamat email korespondensi: eriantisiska@iwu.ac.id

Informasi Artikel

Abstrak/Abstract

Kata Kunci: Tulis
kata/frasa kunci
sebanyak 5 – 8 kata;
antar kata/frasa kunci
dipisahkan dengan
tanda semikolon,

Magnetic Resonance Imaging (MRI) merupakan modalitas pencitraan non-ivasi yang paling fleksibel dan kuat untuk penggunaan klinis dalam beberapa waktu terakhir. Untuk meningkatkan kualitas gambar yang dihasilkan dalam MRI, sejauh ini telah digunakan senyawa-senyawa kimia yang disebut senyawa pengontras (*contrast agent*). Gd-DOTA-Folat dengan linker etilendiamin merupakan salah satu senyawa pengontras terarah yang sedang dikembangkan. Sintesis Gd-DOTA-Folat melalui tiga tahap reaksi utama, yaitu 1). Reaksi pembentukan EDA-Folat (etilendiamina-folat), 2). Reaksi pembentukan DOTA-Folat, dan 3). Reaksi pembentukan Gd-DOTA-Folat. Tujuan dari penelitian ini adalah mensintesis prekursor DOTA-Folat sebagai salah satu prekursor dalam sintesis senyawa pengontras Gd-DOTA Folat melalui dua tahap reaksi, yaitu 1). Aktivasi DOTA menggunakan DCC dan NHS menghasilkan DOTA-NHS-Ester, 2). Konjugasi DOTA-NHS-Ester dengan prekursor EDA-Folat menghasilkan DOTA-Folat. Produk senyawa kompleks DOTA-Folat yang dihasilkan dimurnikan dan dikarakterisasi menggunakan metode spektrofotometri ultraviolet (UV), *Fourier Transform Infrared Spectroscopy (FTIR)* dan spektrometri massa (MS). Prekursor DOTA-Folat telah berhasil disintesis melalui dua tahap reaksi dengan karakteristik spektrofotometri UV menghasilkan dua puncak pada Panjang gelombang 280 nm dan 362 nm diduga berasal dari transisi elektron π ke π^* . Data interpretasi FTIR menunjukkan ada beberapa gugus yang khas bilangan gelombang 3444,33 cm^{-1} merupakan gugus yang khas untuk regang O-H, bilangan gelombang 2915,04 cm^{-1} merupakan gugus yang khas untuk regang C-H sp^3 , bilangan gelombang 1436,01 cm^{-1} merupakan gugus yang khas N-H, dan untuk bilangan gelombang 722,85 cm^{-1} merupakan gugus khas untuk C-H benzen pada posisi para. Hasil karakterisasi dengan spektrometri massa diperoleh nilai m/z sebesar 870,7224, DOTA-Folat dengan penambahan sebuah proton $[\text{M-H}^+]$ (DOTA-Folat secara teoritis memiliki m/z sebesar 869,8810).

Keywords: Tulis
kata/frasa kunci
sebanyak 5 – 8 kata
dalam bahasa Inggris;
antar kata/frasa kunci
dipisahkan dengan
tanda semikolon (;).

Magnetic Resonance Imaging (MRI) is the most flexible and powerful non-invasive imaging modality for clinical use in recent times. To improve the quality of the images produced in MRI, chemical compounds called contrast agents have been used. Gd-DOTA-Folate with ethylenediamine linker is one of the targeted contrast agents currently being developed. The synthesis of Gd-DOTA-Folate was carried out through three main reaction stages, namely 1). The formation reaction of EDA-Folate (ethylenediamine-folate), 2). The formation reaction of DOTA-Folate, and 3). The formation reaction of Gd-DOTA-Folate. The purpose of this study was to synthesize the precursor of DOTA-Folate as one of the precursors in the synthesis of the contrast compound Gd-DOTA Folate, through two reaction stages, namely 1). Activation of DOTA using DCC and NHS produces DOTA-NHS-Ester, 2). Conjugation of DOTA-NHS-Ester with EDA-Folate precursor produces DOTA-Folate. The resulting DOTA-Folate complex compound was purified and characterized using ultraviolet (UV) spectrophotometry, *Fourier Transform Infrared Spectroscopy (FTIR)*, and mass spectrometry (MS) methods. The DOTA-Folate precursor has been successfully synthesized through two reaction stages with UV spectrophotometry characteristics producing two peaks at a wavelength of 280 nm and 362 nm, thought to originate from the π to π^* electron transition. FTIR interpretation data shows that there are several typical groups, wave number 3444.33 cm^{-1} is a typical group for O-H stretching, wave number 2915.04 cm^{-1} is a typical group for C-H sp^3 stretching, wave number

1436.01 cm^{-1} is a typical group N-H, and for wave number 722.85 cm^{-1} is a typical group for C-H benzene at the para position. The characterization results using mass spectrometry obtained an m/z value of 870.7224, DOTA-Folate with the addition of a proton $[M-H]^+$ (DOTA-Folate theoretically has an m/z of 869.8810).

PENDAHULUAN

Magnetic Resonance Imaging (MRI) merupakan modalitas pencitraan non-ivasi yang paling fleksibel dan kuat untuk penggunaan klinis dalam beberapa waktu terakhir. Dalam metode MRI, senyawa pengontras berfungsi untuk meningkatkan perbedaan antara gambaran jaringan tubuh yang sakit dan sehat dalam tubuh manusia [1]. Saat ini senyawa pengontras terarah (*targeted contrast agent*) untuk deteksi, diagnosis dan terapi kanker menggunakan system pencitraan non-invasif telah berkembang pesat. Penambahan biomarker yang spesifik diekspresikan berlebihan oleh sel tumor dapat digunakan untuk meningkatkan deteksi, memberikan diagnosis yang akurat, mengevaluasi stadium kanker, agresivitas dan resistensi terhadap kemoterapi menjadikan bantuan saat perancangan senyawa pengontras [2].

[Gadolinium-(Asam 1,4,7,10-Tetraazasiklododekana 1,4,7,10-Tetraasetat)-Folat] (Gd-DOTA-Folat) merupakan salah satu senyawa pengontras terarah dengan asam folat sebagai biomarker yang digunakan untuk deteksi berbagai jenis kanker [3]. Reseptor folat dapat digunakan sebagai penanda kanker karena diekspresikan berlebih pada sel kanker dibandingkan dengan sel normal khususnya pada sel karsinoma epitel ovarium dan uterus [4].

Senyawa pengontras terarah Gd-DOTA-Folat telah berhasil disintesis melalui tujuh tahap reaksi dengan pendekatan sistesis dilakukan pada fase padat [2], sedangkan pengembangan sintesis Gd-DOTA-Folat melalui tiga tahap reaksi dengan etilendiamina (EDA) digunakan sebagai *linker* untuk mengkonjugasikan asam folat dengan Gd-DOTA, yaitu serta pendekatan sintesisnya, dilakukan dalam fase larutan Penelitian lainnya mengenai sintesis dan karakterisasi senyawa pengontras terarah, yaitu Gd-DTPA-Folat, akan tetapi kekurangan dari senyawa ini adalah ligan yang digunakan yaitu DTPA bentuk strukturnya linier [5]. *European Medicine Agency* (EMA)

telah merekomendasikan pembatasan senyawa pengontras berbasis pengkhelat linier untuk mencegah bahaya pelepasan ion gadolinium (Gd^{3+}). Oleh karena itu, ada tuntutan pengkhelat untuk senyawa pengontras harus pengkhelat makrosiklik yang stabil dan aman [6].

DOTA atau Asam 1,4,7,10-Tetraazasiklododekana 1,4,7,10-Tetraasetat merupakan *Bifunctional Chelating Agent* (BFCA) yaitu senyawa yang memiliki dua gugus aktif dimana gugus pertama berfungsi untuk mengkompleks ion logam dengan stabil sedangkan gugus kedua membentuk ikatan dengan biomolekul seperti peptida, antibodi, dan biomolekul lainnya. DOTA memiliki ion ligan pengkhelat yang secara kuat dapat membentuk delapan ikatan koordinasi dengan gadolinium [7].

Proses Sintesis Gd-DOTA-Folat melalui tiga tahap reaksi utama, yaitu 1). Reaksi pembentukan EDA-Folat (etilendiamina-folat), 2). Reaksi pembentukan DOTA-Folat, dan 3). Reaksi pembentukan Gd-DOTA-Folat. Reaksi pembentukan prekursor EDA-Folat telah berhasil disintesis dengan metode langsung melalui tahap awal pembentukan prekursor EDA-Folat, dengan terlebih dahulu mengaktivasi asam folat menggunakan disikloheksilkarbodiimida (DCC) dan *N*-hidroksisuksinimida (NHS) menghasilkan NHS-Folat lalu dikonjugasikan dengan EDA sehingga diperoleh prekursor EDA-Folat [4].

Pada penelitian ini akan dilakukan sintesis prekursor DOTA-Folat, reaksi pembentukan prekursor DOTA-Folat diawali dengan aktivasi senyawa DOTA menggunakan DCC dan NHS. Senyawa DOTA mempunyai empat gugus aktif yang dapat bereaksi dengan senyawa lainnya. Oleh karena itu salah satu gugus karboksilat pada senyawa DOTA perlu diaktivasi lebih dulu menggunakan DCC dan NHS, membentuk ester aktif sehingga memudahkan dalam konjugasi dengan EDA-Folat. Produk senyawa kompleks DOTA-Folat yang dihasilkan kemudian akan dimurnikan, dan dikarakterisasi menggunakan metode spektrofotometri ultraviolet, spektrofotometri infra-merah, spektrometri massa.

EKSPERIMEN

Material

Bahan-bahan penelitian yang digunakan antara lain akuabides, DOTA (pa Merck), TFA (pa Sygma Aldrich), asetonitril (pa Sygma Aldrich), DCC (pa Merck), DCM *anhydrous* (pa Merck), DIPEA (pa Sygma Aldrich), DMSO *dry* (pa Merck), NHS (pa Merck).

Instrumentasi

Alat-alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah Spektrofotometer UV *thermoscientific GENESYS 50*, Spektrofotometer Infra-merah FTIR *Spectrum PerkinElmer*, Spektrometer Massa *Waters LC-MS ESI-TOF*, Kromatografi Cair Kinerja Tinggi *Waters*, pengaduk magnet, evaporator, desikator vakum, serta alat-alat gelas lain yang ada di laboratorium kimia analitik.

Prosedur

Aktivasi DOTA Menggunakan DCC dan NHS

DOTA (0,01 mmol) dilarutkan dalam DCM *anhydrous*, lalu ditambahkan DCC (0,024 mmol) dan NHS (0,03 mmol) kemudian diaduk selama 15 jam pada suhu ruang dengan kecepatan 300 rpm dalam suasana nitrogen. Selanjutnya larutan di uapkan pelarutnya. *Crude* DOTA-NHS kemudian dimurnikan dengan metode KCKT fasa terbalik menggunakan kolom C18 dengan eluen air (0,1% air) : asetonitril (0,1% TFA) (1:7) dengan kecepatan alir 1 mL/menit, detektor UV λ 280 nm.

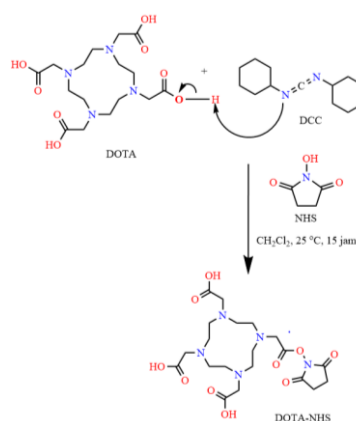
Sintesis Prekursor DOTA-Folat

Sebanyak 0,01 mmol EDA-Folat dilarutkan dalam DMSO kering, diaduk hingga larut, kemudian dipindahkan ke suspensi 0,01 mmol DOTA-NHS-Ester dalam DCM *anhydrous*, kemudian ditambahkan DIPEA dengan perbandingan (5:1 v/v), diaduk semalaman pada suhu ruang dengan kecepatan 300 rpm dalam suasana nitrogen. Selanjutnya larutan diuapkan pelarutnya. *Crude* DOTA-NHS dimurnikan dengan metode KCKT menggunakan kolom C18 dengan eluen air (0,1% air) : asetonitril (0,1% TFA) (1:7) dengan kecepatan alir 1 mL/menit, detektor UV λ 280 nm.

HASIL DAN PEMBAHASAN

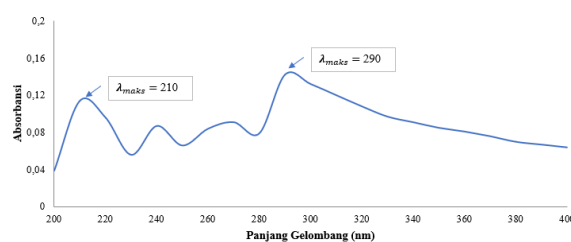
Aktivasi DOTA Menggunakan DCC dan NHS

Sintesis prekursor DOTA-Folat, diawali dengan aktivasi senyawa DOTA menggunakan DCC dan NHS menjadi DOTA-NHS-Ester. Senyawa DOTA mempunyai empat gugus aktif yang dapat bereaksi dengan senyawa lainnya. Oleh karena itu salah satu gugus karboksilat pada senyawa DOTA perlu diaktivasi lebih dulu menggunakan DCC dan NHS, membentuk ester aktif sehingga memudahkan dalam konjugasi dengan EDA-Folat, sesuai dengan reaksi pada



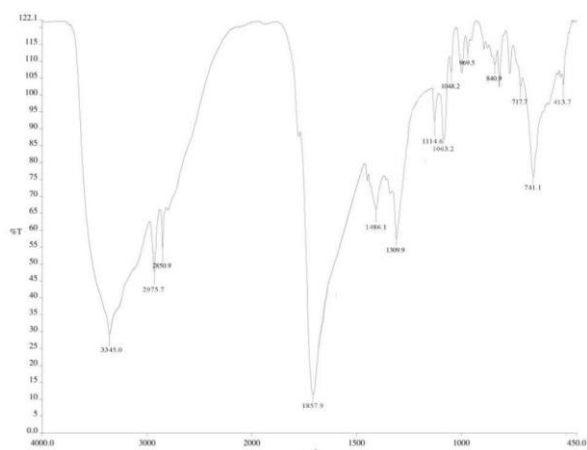
Gambar 1. Reaksi pembentukan DOTA-NHS-Ester dari prekursor DOTA yang diaktivasi menggunakan DCC dan NHS

Reaksi pembentukan DOTA-NHS-Ester dilakukan pada suhu 25°C selama 15 jam dengan penambahan pelarut DCM *anhydrous*. Hasil reaksi kemudian dievaporasi untuk menghilangkan pelarut yang tersisa, diperoleh endapan putih dengan rendemen sebesar 73%. Selanjutnya *crude* dimurnikan dengan metode KCKT fasa terbalik, fasa gerak air (0,1% TFA) : Asetonitril (0,1%) (1:7), kemudian DOTA-NHS-Ester hasil pemurnian dikarakterisasi.



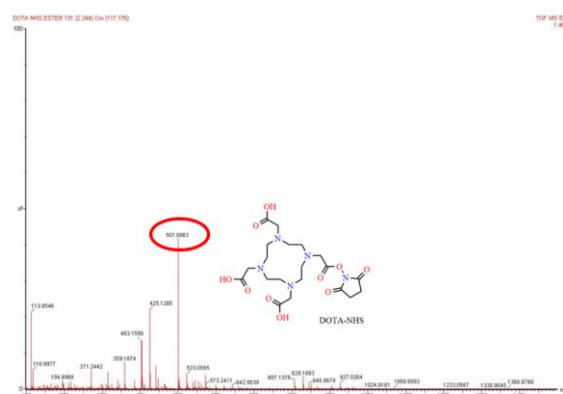
Gambar 2. Spektrum ultraviolet prekursor DOTA-NHS-Ester

Spektrum UV menunjukkan terdapat dua panjang gelombang maksimum DOTA-NHS-Ester yaitu pada panjang gelombang 210 dan 290 nm, panjang gelombang 290 nm diduga berasal dari transisi elektron dari orbital n ke π^* dengan harga absorptivitas molar (ϵ) sebesar 10 yang disebabkan oleh adanya ikatan rangkap pada C=O karboksilat.



Gambar 3. Spektrum Infra-merah prekursor DOTA-NHS-Ester

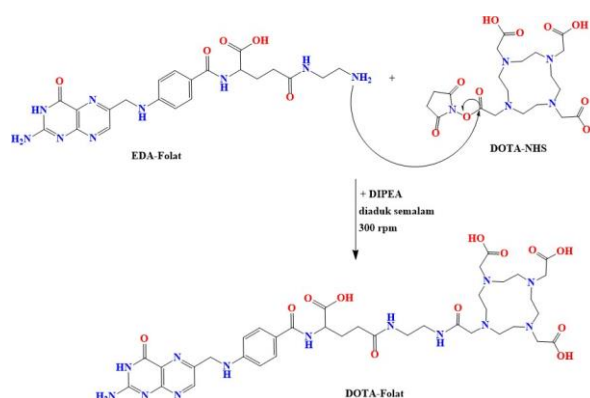
Spektrum infra-merah prekursor DOTA-NHS-Ester, adanya beberapa gugus khas, yaitu pada bilangan gelombang $3345,0 \text{ cm}^{-1}$ merupakan gugus yang khas untuk regang O-H maupun N-H. Bilangan gelombang $2975,7$ dan $2850,9 \text{ cm}^{-1}$ merupakan gugus yang khas untuk regang C-H, sedangkan bilangan gelombang $1857,9$ merupakan gugus yang khas C=O untuk amida dan karboksilat. Pada $1486,1 \text{ cm}^{-1}$ merupakan gugus yang khas tekuk C-H sp^3 dan bilangan gelombang $1114,6$ dan $1063,2 \text{ cm}^{-1}$ merupakan gugus C-O dan C-N. DOTA-NHS-Ester ($C_{20}H_{31}N_5O_{10}$) secara teoritis memiliki massa molekul m/z sebesar 501,4880. Massa molekul terhitung (*calculated*) dari DOTA-NHS-Ester m/z sebesar 501,0868, sedangkan massa molekul hasil pengukuran senyawa DOTA-NHS-Ester menghasilkan spektrum HR-TOFMS ES- m/z sebesar 501,0863.



Gambar 4. Spektrum Massa prekursor DOTA-NHS-Ester

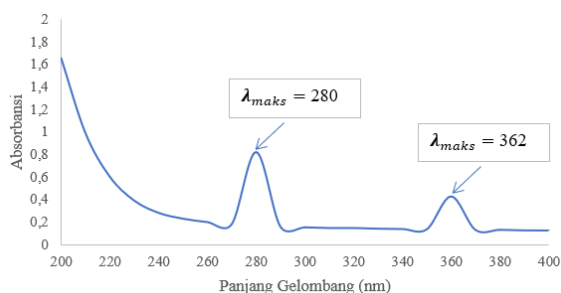
Sintesis Prekursor DOTA-Folat

Sintesis prekursor DOTA-Folat sesuai dengan reaksi pada Gambar 5., gugus amino pada EDA-Folat akan menyerang karbonil, melepas gugus NHS yang merupakan *leaving group* yang baik. Pada sintesis ini digunakan pelarut DCM serta penambahan basa DIPEA agar proses asilasi amina menjadi efisien. Hasil reaksi kemudian dievaporasi untuk menghilangkan pelarut yang tersisa, diperoleh endapan putih dengan rendemen sebesar 72%. KCKT fasa terbalik, fasa gerak air (0,1% TFA) : Asetonitril (0,1%) (1:7), kemudian DOTA-NHS-Ester hasil pemurnian dikarakterisasi.



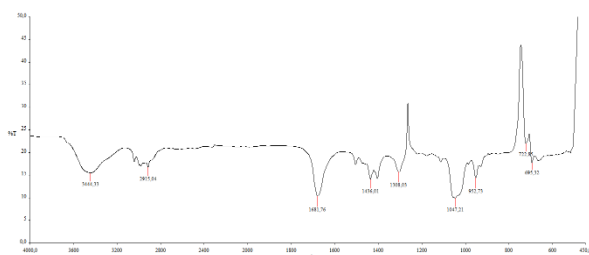
Gambar 5. Reaksi pembentukan prekursor prekursor DOTA-Folat

Spektrum ultraviolet DOTA-Folat, panjang gelombang maksimum pada 280 nm terjadi transisi π ke π^* karena adanya gugus C=C dari benzen dan panjang gelombang maksimum 362 nm terjadi transisi n ke π^* karena adanya gugus C=O terkonjugasi pada gugus karboksilat dari DOTA-Folat.



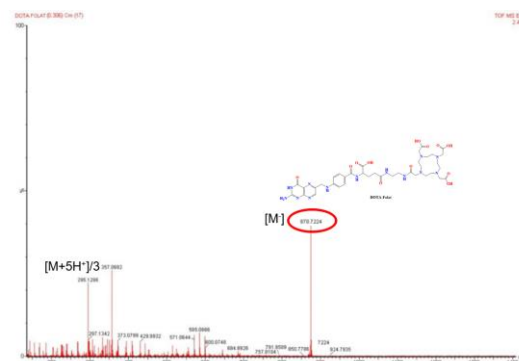
Gambar 6. Spektrum Ultraviolet prekursor DOTA-Folat

Pada spektrum infra-merah prekursor DOTA-Folat, adanya beberapa gugus khas, yaitu pada bilangan gelombang $3444,33 \text{ cm}^{-1}$ merupakan gugus yang khas untuk regang O-H maupun N-H. Bilangan gelombang $2915,04 \text{ cm}^{-1}$ merupakan gugus yang khas untuk regang C-H sp^3 , sedangkan bilangan gelombang $1681,76 \text{ cm}^{-1}$ merupakan gugus yang khas C=O untuk amida dan karboksilat. Pada $1436,01 \text{ cm}^{-1}$ merupakan gugus yang khas N-H, $1308,03 \text{ cm}^{-1}$ merupakan gugus yang khas C=C untuk benzen, $1047,21 \text{ cm}^{-1}$ merupakan gugus C-O dan untuk bilangan gelombang $722,85 \text{ cm}^{-1}$ merupakan gugus khas untuk C-H benzen pada posisi para.



Gambar 7. Spektrum Infra-merah prekursor DOTA-Folat

DOTA-Folat ($\text{C}_{37}\text{H}_{51}\text{N}_{13}\text{O}_{12}$) secara teoritis memiliki massa molekul m/z sebesar 869,8810. Massa molekul terhitung (*calculated*) dari DOTA-Folat m/z sebesar 870,7229, sedangkan massa molekul hasil pengukuran senyawa DOTA-Folat menghasilkan spektrum HR-TOFMS ES+ m/z sebesar 870,7224. Puncak 870,7224 menunjukkan bahwa DOTA-Folat mengalami penambahan sebuah proton $[\text{M}-\text{H}^+]$ dan untuk m/z 295,1296 merupakan $[\text{M}+5\text{H}^+]$ triple charged ions.



Gambar 8. Spektrum Massa prekursor DOTA-Folat

SIMPULAN

Prekursor DOTA-Folat telah berhasil disintesis melalui reaksi EDA-Folat dengan DOTA-NHS-Ester. Karakteristik spektrofotometri UV menghasilkan dua puncak pada Panjang gelombang 280 nm dan 362 nm serta dengan spektrometri massa diperoleh m/z 870,7224 untuk DOTA-Folat dengan penambahan sebuah proton $[\text{M}-\text{H}^+]$.

UCAPAN TERIMA KASIH

Penulis mengucapkan terima kasih kepada Universitas Padjadjaran yang telah memberikan dukungan dana untuk penelitian ini melalui program penelitian Academic Leadership Grant (ALG) (Nomor kontrak: 1427/UN6.3.1/LT2020).

REFERENSI

- [1] Stoja, E., Konstandin, S., Philipp, D., Wilke, R.N., Betancourt, D., Bertuch, T., Jenne, J., Umatham, R., and Gunther, M., "Improving magnetic resonance imaging with smart and thin metasurface," *Sci. Rep.*, 11, 16179, 2021.
- [2] Ferris, N & Goergen, S., "Gadolinium Contrast Medium (MRI Contrast Agents)," *Inside Radiology*. www.insideradiology.com.au, 2017.
- [3] Kalber, T.L., Kamaly, N., So, P.W., Pugh, J.A., Bunch, J., McLeod, C.W., Jorgensen, M. R., Miller, A.D., & Bell, J.D., "A Low Molecular Weight Folate Receptor Targeted Contrast Agent for Magnetic Resonance

- Tumor Imaging,” *Molecular Imaging and Biology*, 13:653Y662. DOI: 10.1007/s11307-010-0400-3, 2011.
- [4] Purnamasari, E. S., Septiana, L., Hardianto, A., Soedjanaatmadja, U. M. S., Anggraeni, A., & Bahti, H. H., “Selection of the Parameters in the Synthesis of Ethylenediamine-Folate Using the Plackett Burman Design,” *Indonesian Journal of Chemistry*, 22(3), pp. 599–608. <https://doi.org/10.22146/ijc.68313>, 2022.
- [5] Fauzia, R.P, Mutalib, A., Soedjanaatmadja, RUMS, Bahti, H.H, Anggraeni, A., Gunawan, A.H, ... Hidayati, Y, “Synthesis and Characterization of Gadolinium Diethylenetriamine Pentaacetate Folate,” *Procedia Chemistry*, 17, pp. 139–146. <https://doi.org/10.1016/j.proche.2015.12.128>, 2015.
- [6] Jeong, Y., & Na, K., “Synthesis of a gadolinium-based-macrocyclic MRI contrast agent for effective cancer diagnosis,” *Biomaterials Research*, 22(1), pp. 150–157. <https://doi.org/10.1186/s40824-018-0127-9>, 2018.
- [7] Miyake, Y., Kimura, Y., Ishikawa, S., Tsujita, H., Miura, H., & Narazaki, M., “Synthesis and functional evaluation of chiral dendrimer–triamine-coordinated Gd complexes as compassionate MRI contrast agents,” *Tetrahedron Letters*, 53(34), pp. 4580–4583, 2012.