DETERMINATION OF DIHYDROARTEMISININ BY HIGH PERFORMANCE LIQUID CHROMATOGRAPHY

PATCHARIN CHAISUWAN

**A THESIS SUBMITTED IN PARTIAL FULFILLMENT
OF THE REQUIREMENTS FOR
THE DEGREE OF MASTER OF SCIENCE
(APPLIED ANALYTICAL AND INORGANIC CHEMISTRY)
FACULTY OF GRADUATE STUDIES
MAHIDOL UNIVERSITY
2003**

ISBN 974-04-3417-7
COPYRIGHT OF MAHIDOL UNIVERSITY

การวิเคราะห์เชิงปริมาณของไดไฮโดรอาร์ติมิซินินด้วยเทคนิคไฮเปอร์ฟอร์มานลิควิดโครมาโตกราฟี
(DETERMINATION OF DIHYDROARTEMISININ BY HIGH PERFORMANCE LIQUID CHROMATOGRAPHY)

พัชรินทร์ ชัยสุวรรณ 4336617 SCAI/M

วท.ม. (เคมีวิเคราะห์และเคมีอินทรีย์ประยุกต์)

คณะกรรมการควบคุมวิทยานิพนธ์ : ประพิณ วิไลรัตน์, Ph.D. (Physical Chemistry) , ยุวดี เชี่ยววัฒนา, Ph.D. (Analytical Chemistry) , ดวงใจ นาคะปรีชา, Ph.D. (Analytical Chemistry)

บทคัดย่อ

ได้ทำการพัฒนาเทคนิคไฮเปอร์ฟอร์มานลิควิดโครมาโทกราฟฟี ที่ตรวจวัดด้วยเครื่องตรวจวัดอุลตร้าไวโอเลตและเครื่องตรวจวัดไฟฟ้าเคมีเพื่อวิเคราะห์ปริมาณของไดไฮโดรอาร์ติมิซินิน (DHA) ในตัวอย่างยา พบว่าสามารถแยกอิพิเมอร์ชนิด α และ β ได้บนคอลัมน์ Waters C8 โดยมีอะซีโทรไนไตรล์และน้ำในอัตราส่วน 50:50 เป็นวัฏภาคเคลื่อนที่แล้วติดตามโดยวัดการดูดกลืนแสงของ DHA ที่ความยาวคลื่น 200 นาโนเมตร สำหรับการตรวจวัดด้วยเครื่องตรวจวัดไฟฟ้าเคมี สามารถตรวจวัดได้ใน reductive mode โดยมี glassy carbon เป็นขั้วทำงานและ Ag/AgCl เป็นขั้วอ้างอิงภายใต้กาซอาร์กอน

ในการศึกษาปฏิกิริยาอิพิเมอร์ไรเซชันระหว่างอิพิเมอร์ชนิด α และ β ในตัวทำละลายต่างๆที่อุณหภูมิห้องพบว่าอัตราการเข้าสู่สมดุลและอัตราส่วนของ $\alpha\beta$ อิพิเมอร์ที่สมดุลขึ้นกับชนิดของตัวทำละลาย และพบว่ามีอัตราการเกิดปฏิกิริยาอิพิเมอร์ไรเซชันเร็วที่สุดโดยเปลี่ยนจาก β-อิพิเมอร์ (รูปของแข็งบริสุทธิ์) เป็น α-อิพิเมอร์เมื่อใช้ตัวทำละลายเป็นสารละลายฟอสเฟต บัฟเฟอร์ ซาลีน พีเอช 7.3 ซึ่งในสภาวะนี้มีการเปลี่ยนเป็น α-อิพิเมอร์ร้อยละ 100% ซึ่งน่าจะเป็นหลักฐานว่า เมื่อ DHA อยู่ในซีรัมนั้นควรจะอยู่ในรูปของ α-อิพิเมอร์ด้วย อย่างไรก็ดีในสารละลายผสมระหว่าง เมทานอลหรืออะซิโทรไนไตรล์กับน้ำหรืออะซิเตรตบัฟเฟอร์ pH 5.0 พบว่าอัตราส่วนของ $\alpha\beta$ จะเพิ่มขึ้นตามเวลาและเข้าสู่สมดุลภายในเวลา 2 ชั่วโมง โดยอัตราส่วนของ $\alpha\beta$ ในเมทานอลเท่ากับ 2.55 ± 0.01 ซึ่งสูงกว่าในอะซิโทรไนไตรล์ (0.06 ± 0.02) เนื่องจาก เมทานอลมีขั้วมากกว่าอะซิโทรไนไตรล์ ผลการทดลองศึกษาอิพิเมอร์ไรเซชันนี้บ่งชี้ให้เห็นว่า DHA จะอยู่ในรูปอิพิเมอร์ใดขึ้นกับชนิดของตัวทำละลายจึงควรให้ควรสำคัญเมื่อจะนำระบบการแยกนั้นๆไปแปรผลเพื่อศึกษาอิพิเมอร์ในเชิงของจลนศาสตร์ของยา

การวิเคราะห์ปริมาณ DHA ในตัวอย่างยาใช้ พื้นที่ใต้พีคของสัญญาณทั้งสองอิพิเมอร์รวมกัน พบว่ากราฟมาตรฐานเป็นเส้นตรงในช่วงความเข้มข้น 20 ถึง 400 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ($r^2=1$) ระดับความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถตรวจวัดได้มีค่าเท่ากับ 0.9 ± 0.1 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และมีร้อยละของการคืนกลับมีค่าอยู่ในช่วงร้อยละ 97.0 ถึง 103.5

ผลการวิเคราะห์เมื่อใช้เครื่องตรวจวัดไฟฟ้าเคมีพบว่าการตอบสนองของขั้วทำงานชนิด glassy carbon เมื่อทำ amperometric mode จะค่อยๆลดลงเมื่อใช้วิเคราะห์ไประยะหนึ่ง เนื่องจากความสกปรกบนผิวของขั้วทำงาน จึงได้ทำการศึกษา pulse mode แต่อย่างไรก็ตามพบว่าไม่สามารถปรับปรุงความไวของการตรวจวัดได้ ดังนั้นการติดตามปริมาณ DHA ด้วยเครื่องตรวจวัดไฟฟ้าเคมีนี้จึงไม่เหมาะสมต่อการวิเคราะห์ปริมาณ DHA ในตัวอย่างยา

71 หน้า . ISBN 974-04-3417-7

DETERMINATION OF DIHYDROARTEMISININ BY HIGH PERFORMANCE LIQUID CHROMATOGRAPHY.

PATCHARIN CHAISUWAN 4336617 SCAI/M

M.Sc.(APPLIED ANALYTICAL AND INORGANIC CHEMISTRY)

THESIS ADVISOR : PRAPIN WILAIRAT, Ph.D.(PHYSICAL CHEMISTRY), JUWADEE SHIOWATANA, Ph.D.(ANALYTICAL CHEMISTRY), DUANGJAI NACAPRICHA, Ph.D.(ANALYTICAL CHEMISTRY)

ABSTRACT

Two high-performance liquid chromatography (HPLC) methods using either absorbance (UV) or electrochemical detection (ECD) were developed for the determination of dihydroartemisinin (DHA) in drug samples. Two isomers of DHA, the C10-OH α- and β- epimers were separated on a Waters C8 column using a mobile phase of acetonitrile-water (50:50,v/v), with ultraviolet detection (UV) at 200 nm. For ECD, the detector was operated in the reductive mode using a glassy carbon electrode and a Ag/AgCl reference electrode under argon gas to exclude oxygen. This detection system also required manual and electropolishing to activate the glassy carbon electrode.

An investigation of DHA epimerization in various solvents at room temperature was also studied using UV detection. The rate of epimerization and ratio of α/β isomers are dependent on the polarity of the solvent. The very fast epimerization of β-DHA (the epimer form in solid state) to α-DHA and the predominance of α-DHA in phosphate buffered saline, pH 7.3 (existing as 100%α-DHA) were observed, this indicated that the α-DHA should be the major form of DHA in human plasma. In mixed solvents of methanol or acetonitrile with water or acetate buffer, pH 5.0, the α/β ratios increased with time reaching an equilibrium within 2 hr. The α/β ratio in methanol is 2.55±0.10 which is larger than in acetonitrile (α/β ratio = 0.06 ±0.02) because the higher polarity of methanol. The sum of the α- and β-epimer peak areas was used for quantitative analysis of DHA in drug samples. This method gave a linear calibration curve of standard DHA concentration between 20-400 ppm (r^2 = 1) with a detection limit of 0.9 ± 0.1 ppm. The percent recovery of spiked standard DHA to the sample was in the range 97.0-103.5%.

The results of the HPLC analysis with ECD showed that the stability and activity of the glassy carbon electrode in amperometric mode was reduced during analysis. Detection using the pulse mode was attempted in order to overcome this problem. However, optimization of this detection did not increase the sensitivity of the method. Thus electrochemical detection was found to be unsuitable for analysis of DHA in drug samples.

KEY WORDS : DIHYDROARTEMISININ/ EPIMERIZATION STUDY/ ANTIMALARIAL/ELECTROCHEMICAL DETECTION/HPLC

71 P. ISBN 974-04-3417-7