

ผลิตภัณฑ์จากการสลายตัว
ของยาต้านมาลาเรีย-ไดไฮโดรอาร์ติมิซินิน



นางสาว ทับทิม งอกวงษ์

ศูนย์วิทยทรัพยากร

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ

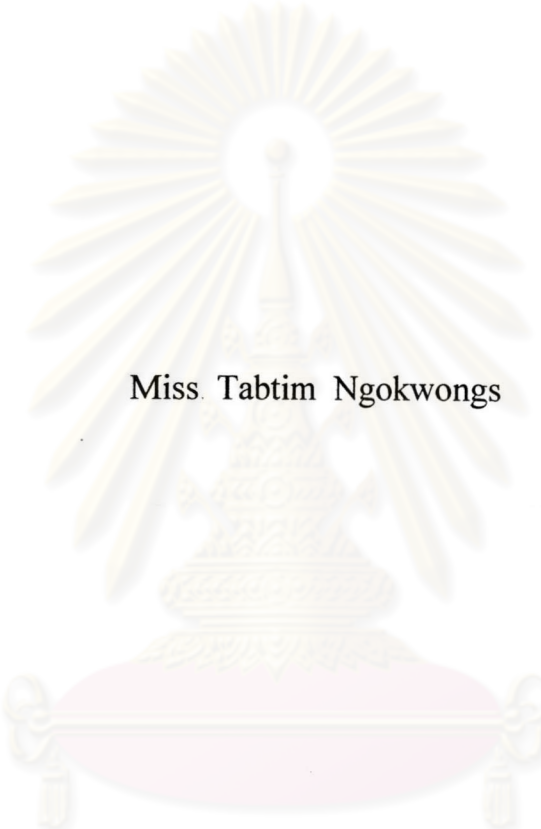
คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ปีการศึกษา 2546

ISBN 974-17-4550-8

ลิขสิทธิ์ของ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

**DEGRADATION PRODUCTS OF ANTIMALARIAL DRUG-
DIHYDROARTEMISININ**



Miss. Tabtim Ngokwongs

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements
for the Degree of Master of Science in Biotechnology
Faculty of Science

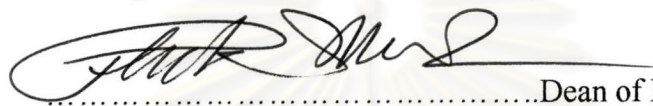
Chulalongkorn University

Academic Year 2003

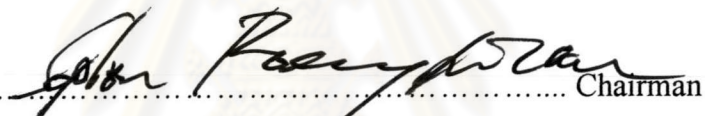
ISBN 974-17-4550-8

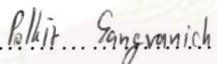
Thesis Title DEGRADATION PRODUCTS OF
 ANTIMALARIAL DRUG -DIHYDROARTEMISININ
By Miss. Tabtim Ngokwongs
Field of study Biotechnology
Thesis Advisor Assistant Professor Polkit Sangvanich, Ph.D.
Thesis Co-advisor Associate Professor Supornchai Kongpatanakul, Ph.D.

Accepted by the Faculty of Science, Chulalongkorn University in Partial
Fulfillment of the Requirements for the Master's Degree


.....Dean of Faculty of Science
(Professor Piamsak Menasveta, Ph.D.)

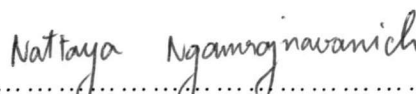
Thesis Committee


..... Chairman
(Professor Sophon Roengsumran, Ph.D.)


..... Thesis Advisor
(Assistant Professor Polkit Sangvanich, Ph.D.)


..... Thesis Co-Advisor
(Associate Professor Supornchai Kongpatanakul, Ph.D.)


..... Member
(Associate Professor Amorn Petsom, Ph.D.)


..... Member
(Assistant Professor Nattaya Ngamrojnavanich, Ph.D.)

ทับทิม วงพงษ์ : ผลิตภัณฑ์จากการสลายตัวของยาต้านมาลาเรีย-ไดไฮโดรอาร์ติมิซินิน
(DEGRADATION PRODUCTS OF ANTIMALARIAL DRUG-DIHYDROARTEMISININ)
อาจารย์ที่ปรึกษา : ผศ. ดร. พลกฤษณ์ แสงวณิช, อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม : รศ. นพ. สุพรชัย
กองพัฒนานักศ ; 86 หน้า. ISBN 947-17-4550-8

ไดไฮโดรอาร์ติมิซินินเป็นสารออกฤทธิ์ที่เกิดจากเมตาบอไลต์ของอนุพันธ์อาร์ติมิซินิน และมีประสิทธิภาพในการฆ่าเชื้อมาลาเรียสูงกว่ายาต้านมาลาเรียอื่นในกลุ่มเดียวกัน มีรายงานว่า ในสภาวะเครียด เช่น เก็บไว้เป็นเวลานานหรือที่อุณหภูมิสูงนั้น ไดไฮโดรอาร์ติมิซินินจะสลายตัวเกิดเป็นผลิตภัณฑ์ใหม่ ในงานวิจัยนี้ได้ศึกษาเกี่ยวกับผลิตภัณฑ์จากการสลายตัวของไดไฮโดรอาร์ติมิซินิน โดยศึกษาสูตรโครงสร้างทางเคมีและทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพ วิเคราะห์สูตรโครงสร้างทางเคมีโดยเทคนิคสเปกโตรสโคปี พบว่าไดไฮโดรอาร์ติมิซินินสลายตัวให้สารหลัก 2 ชนิด ได้แก่ สาร 1 คือ (2R, 3R, 6S)-2-(3-oxobutyl)-3-methyl-6-[(R)-2-propanol]-cyclohexane หรือ (2S, 3R, 6R)-2-(3-oxobutyl)-3-methyl-6-[(R)-2-propanol]-cyclohexane และสาร 2 คือ (2S, 3R, 6S)-2-(3-oxobutyl)-3-methyl-6-[(R)-2-propanol]-cyclohexane ผลการทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพของผลิตภัณฑ์จากการสลายตัวของไดไฮโดรอาร์ติมิซินิน ต่อเซลล์สายพันธุ์ 8 ชนิดซึ่งได้แก่ 3T3, IEC-6, Vero, L929, BHK21, HepG2, Caco2 และ MCF7 โดยวิธี MTT พบว่าผลิตภัณฑ์จากการสลายตัวเหล่านี้ไม่มีพิษกับทุกเซลล์สายพันธุ์ ขณะที่พบไดไฮโดรอาร์ติมิซินินเป็นพิษต่อกลุ่มเซลล์สายพันธุ์ IEC-6 และ Vero นอกจากนี้ยังได้ทดสอบความเป็นพิษแบบเฉียบพลันในหนู mice สายพันธุ์ ICR ด้วย พบว่าผลิตภัณฑ์จากการสลายตัวนี้มีความเป็นพิษต่ำกว่าสารตั้งต้นสำหรับการทดสอบฤทธิ์ต่อการยับยั้งเชื้อมาลาเรีย พบว่าผลิตภัณฑ์จากการสลายตัวเหล่านี้มีฤทธิ์ฆ่าเชื้อมาลาเรียต่ำกว่าไดไฮโดรอาร์ติมิซินิน

ศูนย์วิทยาศาสตร์สุขภาพ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาค.....ลายมือชื่อนิสิต.....ทับทิม วงพงษ์
สาขาวิชา.....เทคโนโลยีชีวภาพ.....ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา.....Ways In
ปีการศึกษา.....2546.....ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม.....x

4572308823: MAJOR BIOTECHNOLOGY

KEYWORD: DEGRADATION PRODUCTS OF DIHYDROARTEMISININ /
DIHYDROARTEMISININ / ANTIMALARIAL DRUGS / MALARIA

TABTIM NGOKWONGS: DEGRADATION PRODUCTS OF
ANTIMALARIAL DRUG- DIHYDROARTEMISININ. THESIS ADVISOR:
ASSIST. PROF. POLKIT SANGVANICH, Ph.D., THESIS CO-ADVISOR:
SUPORNCHAI KONGPATANAKUL, Ph.D., 86 pp. ISBN 974-17-4550-8

Dihydroartemisinin (DHA), the biologically active metabolite of artemisinin derivative, is more effectively than other antimalarial drugs in its group. Recent report showed that in stress condition such as long time storage or high temperature, DHA could generate degradation products. In this study, chemical structures and biological activity of DHA degradation products were investigated. Chemical structures were analyzed by spectroscopy techniques. DHA has produced two main degradation products, which are 1, (2R, 3R, 6S)-2-(3-oxobutyl)-3-methyl-6-[(R)-2-propanol]-cyclohexane or (2S, 3R, 6R)-2-(3-oxobutyl)-3-methyl-6-[(R)-2-propanol]-cyclohexane and 2, (2S, 3R, 6S)-2-(3-oxobutyl)-3-methyl-6-[(R)-2-propanol]-cyclohexane. From cytotoxicity testing, these degradation products and DHA were test against 8 cell lines; 3T3, IEC-6, Vero, L929, BHK, HepG2, Caco2 and MCF7, using the MTT assay. The degradation products show no toxicity to all cell lines, whereas DHA is toxic to IEC-6 and Vero. Additionally, animal studies with Mice ICR strain given oral administration have shown that degradation products are less toxic than DHA itself. For antimalarial activity testing, degradation products showed no strong inhibition compare to DHA.

Department.....-.....Student's signature.....*Tabtim Ngokwongs*.....
Field of study..... Biotechnology.....Advisor's signature.....*Polkit Sangvanich*.....
Academic Year.....2003.....Co-advisor's signature.....*x J*.....

ACKNOWLEDGEMENT

The success of this thesis can be attributed to the extensive support and assistance from my advisor, Assistance Professor Polkit Sangvanich and co-advisor, Associate Professor Suporchai Kongpatanakul. I deeply thank them for their valuable advice and guidance in this research.

My gratitude is also extended to Professor Sophon Rengsumran, Associate Professor Amorn Petsom and Assistant Professor Nattaya Ngamrojnavanich for serving as dissertation committee, for their valuable comments and also for useful suggestions. Moreover, I would like to thank Assistant Professor Tirayut Vilaivan (Department of Chemistry, Faculty of Science, Chulalongkorn University) for helping the analysis and determined by NMR analysis.

Thank The Animal Cell Biotechnology Laboratory, BIOTEC Central Research Unit, Nation Science and Technology Development Agency for cytotoxicity activity testing, The Medicinal Plant Research Institute Department of Medical Science for acute toxicity testing, The Armed Forces Research Institute of Medical Science (AFRIM) for antimalarial activity testing and The Government Pharmaceutical Organization (GPO) for stability study of DHA.

I also would like to extend my profound thanks the Thailand-Tropical Diseases Research Programme (T-2) for financial support.

Thank Department of Pharmacology, Faculty of Medicine, Mahidol University and Department of Chemistry, Faculty of Science, Chulalongkorn University for research facilities. Sincere thanks extended to all staff members and friends of the Pharmacology Department, Faculty of Medicine, Mahidol University and Chemistry Department, Faculty of Science, Chulalongkorn University for their assistance and friendship.

Finally, I would like to thank my parents and sister for their love and support throughout my study. Without their constant encouragement, I would never have had so many good opportunities in my life.

CONTENTS

	Page
ABSTRACT IN THAI.....	iv
ABSTRACT IN ENGLISH.....	v
ACKNOWLEDGEMENT.....	vi
CONTENTS.....	vii
LIST OF TABLES.....	ix
LIST OF FIGURES.....	x
LIST OF SCHEMES.....	xii
LIST OF ABBREVIATIONS.....	xiii
CHAPTER I INTRODUCTION.....	1
1.1 The objectives of this research	2
CHAPTER II LITERATURE REVIEW.....	3
2.1 Malaria.....	3
2.2 Artemisinin and its derivatives.....	5
2.3 Dihydroartemisinin	14
CHAPTER III MATERIALS AND METHODS.....	21
3.1 Instruments and equipments	21
3.2 Reagents and chemicals.....	22
3.3 DHA material.....	22
3.4 Thermal decomposition of DHA.....	22

CONTENTS (continued)

	Page
3.5 Separation.....	23
3.5.1 Isolation of degradation products by HPLC.....	23
3.5.2 Isolation of degradation products by silica gel chromatography	24
3.6 Toxicity test.....	24
3.6.1 Cytotoxicity test.....	24
3.6.2 Acute toxicity test.....	26
3.7 Antimalarial activity test.....	26
 CHAPTER IV RESULTS AND DISCUSSIONS.....	 28
4.1 Analysis of degradation products of DHA	28
4.2 Structure elucidation of isolated compounds from degradation products of DHA	30
4.2.1 Structure elucidation of compound 1.....	30
4.2.2 Structure elucidation of compound 2.....	34
4.3 Toxicity test.....	39
4.3.1 Cytotoxicity test.....	39
4.3.2 Acute toxicity test.....	40
4.4 Antimalarial activity test.....	41
 CHAPTER V CONCLUSION.....	 42
REFERENCES.....	44
APPENDIX A.....	50
APPENDIX B.....	78
VITA.....	86

LIST OF TABLES

	Page
Table 1 The isolated compounds from crude DHA	28
Table 2 The IR absorption band assignment of compound 1.....	30
Table 3 The ^1H , ^{13}C -NMR and 2D long rang ^1H - ^{13}C -correlation.....	31
in the HMBC spectrum data of compound 1	
Table 4 The IR absorption band assignment of compound 1.....	34
Table 5 The ^1H , ^{13}C -NMR and 2D long rang ^1H - ^{13}C -correlation.....	35
in the HMBC spectrum data of compound 1	
Table 6 ^{13}C -NMR spectra of compound 2 and	36
(2S, 3R, 6S)-2-(3-oxobutyl)-3- methyl-6-[(R)-2-propanol]-cyclohexane	
Table 7 Cytotoxic activity against 8 cell lines of.....	39
degradation products of DHA	
Table 8 LD ₅₀ of degradation products of DHA.....	40
Table 9 <i>In vitro</i> response of drugs against <i>P. falciparum</i>	41
Table 10 IC ₅₀ 's of DHA and impurities with 8 cell lines.....	79
Table 11 IC ₅₀ 's of DHA; fresh drug (300403) with 8 cell lines.....	80
Table 12 IC ₅₀ 's of DHA; stored drug (121101) with 8 cell lines.....	81
Table 13 IC ₅₀ 's of impurities (130603) with 8 cell lines.....	82
Table 14 Acute toxicity test of impurities of DHA in mice.....	83
Table 15 <i>In vitro</i> activity of antimalarial drug against W2.....	84
Table 16 <i>In vitro</i> activity of antimalarial drug against D6.....	85

LIST OF FIGURES

		Page
Figure 1	The malaria parasite life cycle.....	4
Figure 2	The chemical structure of artemisinin and its semi-synthetic Derivatives with antimalarial activity.....	6
Figure 3	Conversion of artemisinin (I) to DHA(II, III).....	8
Figure 4	Mode of action of artemisinin derivatives.....	10
Figure 5	Metabolites from artemisinin, isolated from human urine.....	12
Figure 6	The chemical structure of DHA.....	15
Figure 7	Percent remaining of DHA in Suppocire AP..... Suppository after storage at 30 °C and 45 °C for 90 days	17
Figure 8	Stability of DHA powder conducted under..... 45 °C and 75% RH	17
Figure 9	Effect of stored temperature on the content of DHA..... in glass container	18
Figure 10	The structure of compound 1.....	32
Figure 11	The HMBC correlation of compound 1.....	32
Figure 12	The COSY correlation of compound 1.....	33
Figure 13	The NOESY correlation of compound 1.....	33
Figure 14	The structure of compound 2.....	37
Figure 15	The HMBC correlation of compound 2.....	37
Figure 16	The COSY correlation of compound 2.....	38
Figure 17	Major compounds of degradation products of DHA.....	43
Figure 18	The HPLC chromatogram of crude DHA	51
Figure 19...	The HPLC chromatogram of sample for toxicity testing.....	52
Figure 20	The UV absorption of compound 1.....	53

LIST OF FIGURES (continued)

	Page
Figure 21	The IR spectrum of compound 1.....54
Figure 22	The ¹ H-NMR spectrum of compound 1.....55
Figure 23	The ¹³ C-NMR spectrum of compound 1.....56
Figure 23	The HMBC-NMR spectrum of compound 1.....57
Figure 24	The HSQC-NMR spectrum of compound 1.....58
Figure 25	The HSQC-NMR spectrum of compound 1.....59
Figure 26	The HMBC-NMR spectrum of compound 1.....60
Figure 27	The HMBC-NMR spectrum of compound 1.....61
Figure 28	The HMBC-NMR spectrum of compound 1.....62
Figure 29	The HMBC-NMR spectrum of compound63
Figure 30	The COSY-NMR spectrum of compound 1.....64
Figure 31	The NOESY-NMR spectrum of compound 1.....65
Figure 32	The NOESY-NMR spectrum of compound 1.....66
Figure 33	The ESI MS spectrum o compound 1.....67
Figure 34	The UV absorption of compound 2.....68
Figure 35	The IR spectrum of compound 2.....69
Figure 36	The ¹ H-NMR spectrum of compound 2.....70
Figure 37	The ¹³ C-NMR spectrum of compound 2.....71
Figure 38	The HSQC-NMR spectrum of compound 2.....72
Figure 39	The HMBC-NMR spectrum of compound 2.....73
Figure 40	The HMBC-NMR spectrum of compound 2.....74
Figure 41	The HMBC-NMR spectrum of compound 2.....75
Figure 42	The HMBC-NMR spectrum of compound 2.....76
Figure 43	The COSY-NMR spectrum of compound 2.....77

LIST OF SCHEMES

	Page
Scheme 1 The procedure of degradation products study.....	22



ศูนย์วิจัยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

LIST OF ABBREVIATIONS

α	alpha
β	beta
C	carbon atom
Ci	curies
δ	chemical shift
$^{13}\text{C-NMR}$	Carbon-13 Nuclear Magnetic Resonance
CH_3OH	methanol
CNS	central nervous system
COSY	Correlated Spectroscopy
CO_2	carbondioxide
J	coupling constant
d	doublet (for NMR spectrum)
$^\circ\text{C}$	degree celsius
CDCl_3	duterated chloroform
EtOAc	ethyl acetate
ESI-MS	Electrospray Ionization Mass Spectrum
g	gram
GC	gas chromatography
HSQC	Hetero Multiple Quantum Correlation
HMBC	Heteromolecular Multiple Bond Correlation
Hz	Hertz
IC_{50}	median inhibit concentration
IR	Infrared spectrum
L	liter
LD_{50}	median lethal does
m	multiplet (for NMR spectrum)
mg	milligram
ml	milliliter
min	minute
m/z	mass to charge ratio

LIST OF ABBREVIATIONS (continued)

M	molar
M ⁺	molecular ion
MS	mass spectrometry
M.W.	molecular weight
μ	micro
NaBH ₄	sodium borohydride
NaCl	sodium chloride
NMR	Nuclear Magnetic Resonance
NOESY	Nuclear Overhauser Enhancement Spectroscopy
O ₂	oxygen
ppm	part per million
PBS	phosphate buffer in saline
¹ H-NMR	Proton Nuclear Magnetic Resonance
q	quartet (for NMR spectrum)
RH	relative humidity
RT	room temperature
RIA	radioimmuno assay
s	singlet (for NMR spectrum)
SD	standard deviation
t	triplet (for NMR spectrum)
UV	ultra violet
v _{max}	the reciprocating wavelength (IR spectrum)
v/v	volume by volume