การทำปฏิกิริยาอนุพันธ์เพื่อการวิเคราะห์ด้วยพาราเซตามอล ด้วยเครื่องแกส-ลิควิดโครมาโตกราฟี

นางสาวศิริวิภา อมาตยกุล

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาเภสัชศาสตรมหาบัณฑิต
ภาควิชาเภสัชเคมี
บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
พ.ศ. 2533

ISBN-974-577-807-9

ลิขสิทธิ์ของบัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

016413
1030530

DERIVATIZATION REACTION IN THE GAS-LIQUID CHROMATOGRAPHIC ANALYSIS OF PARACETAMOL

Miss Sirivipa Amatayakul

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements
for the Degree of Master of Science in Pharmacy
Department of Pharmaceutical Chemistry
Graduate School
Chulalongkorn University
1990

ISBN 974-577-807-9

Thesis title	Derivatization Reaction in the Gas-Liquid Chromatographic Analysis of Paracetamol
By	Miss Sirivipa Amatayakul
Department	Pharmaceutical Chemistry
Thesis Adviser	Associate Professor Sunibhond Pummangura, Ph.D.
	Assistant Professor Chamnan Patarapanich, Ph.D.
Academic Year	1989

Accepted by the Graduate School, Chulalongkorn University in Partial Fulfillment of the Master's Degree.

Thavorn Vajarabhaya ..... Dean of Graduate School

(Professor Thavorn Vajarabhaya, Ph.D.)

Thesis Committee:

Suttatip Chantaraskul. ..... Chairman

(Associate Professor Suttatip Chantaraskul, M. Sc. in Pharm.)

Opa Vajragupta ..... Member

(Assistant Professor Opa Vajragupta, Ph.D.)

Yaowapa Wairaksat ..... Member

(Associate Professor Yaowapa Wairaksat, Ph.D.)

Chamnan Patarapanich ..... Member

(Assistant Professor Chamnan Patarapanich, Ph.D.)

Sunibhond Pummangura ..... Member

(Associate Professor Sunibhond Pummangura, Ph.D.)

Copyright of the Graduate School, Chulalongkorn University

พิมพ์ต้นฉบับบทคัดย่อวิทยานิพนธ์ภายในกรอบสีเขียวนี้เพียงแผ่นเดียว

หอสมุดกลาง สถาบันวิทยบริการ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ศิริวิภา อมาตยกุล : การทำปฏิกิริยาอนุพันธ์เพื่อการวิเคราะห์ตัวยาพาราเซตามอลด้วยเครื่องแกส-ลิควิดโครมาโตกราฟี (DERIVATIZATION REACTION IN THE GAS-LIQUID CHROMATOGRAPHIC ANALYSIS OF PARACETAMOL) อ.ที่ปรึกษา : รศ.ดร. สุนิพนธ์ ภูมมางกูร, อ.ที่ปรึกษาร่วม : ผศ.ดร. ชำนาญ ภัตรพานิช, 140 หน้า, ISBN 974-577-807-9

โมเลกุลของพาราเซตามอลประกอบด้วยหมู่ของไฮดรอกซิล (hydroxyl) และหมู่เอมีน (amine) จึงสามารถที่จะเกิดปฏิกิริยาอนุพันธ์ได้ ซึ่งในการวิจัยนี้ได้ทำปฏิกิริยาอนุพันธ์ชนิดอะเซติลเลชัน (acetylation) เกิดเป็นสารอนุพันธ์โมโนอะเซติล (monoacetyl derivative, MAAP) และสารอนุพันธ์ไดอะเซติล (diacetyl derivative, DAAP) โดยเมื่อทำปฏิกิริยานี้ในอ่างน้ำมันที่อุณหภูมิ 220°ซ. เป็นเวลา 3 ชั่วโมง จะเกิดอนุพันธ์ไดอะเซติลมากกว่าโมโนอะเซติล

อนุพันธ์ทั้งสองนี้สามารถนำมาวิเคราะห์โดยการฉีดเข้าเครื่องแกส-ลิควิดโครมาโตกราฟีซึ่งมี Carbowax 20M ทำหน้าที่เป็นวัฏภาคคงที่ (stationary phase) ในการวิจัยครั้งนี้โดยส่วนใหญ่จะมุ่งสนใจแต่อนุพันธ์ไดอะเซติล

ค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ระหว่างอัตราส่วนของพื้นที่ใต้เส้นโค้งของอนุพันธ์ไดอะเซติลต่อเบนโซฟีโนนซึ่งในที่นี้ใช้เป็นสารมาตรฐานเปรียบเทียบ (internal standard) กับปริมาณพาราเซตามอลในช่วง 20-1000 มก. จะเป็น 0.9954

นอกจากนี้ในการวิจัยได้หาค่าเปอร์เซนต์การได้กลับคืนของสาร (% recovery) ทั้งในยาเม็ด ยาน้ำและยาฉีดซึ่งให้ค่าที่ดีมากน่าจะเป็นสิ่งซึ่งแสดงให้เห็นว่าวิธีการนี้เป็นวิธีวิเคราะห์ที่มีความไว ให้ค่าที่ถูกต้องและแม่นยำเทียบเท่ากับวิธีมาตรฐานของ USP XXII

ภาควิชา เภสัชเคมี ลายมือชื่อนิสิต ศิริวิภา อมาตยกุล

สาขาวิชา เภสัชเคมี ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา

ปีการศึกษา 2532 ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม

พิมพ์ต้นฉบับบทคัดย่อวิทยานิพนธ์ภายในกรอบสีเขียวนี้เพียงแผ่นเดียว

SIRIVIPA AMATAYAKUL : DERIVATIZATION REACTION IN THE GAS-LIQUID CHROMATOGRAPHIC ANALYSIS OF PARACETAMOL. THESIS ADVISOR : ASSO. PROF. SUNIBHOND PUMMANGURA, Ph.D., CO-ADVISOR : ASSIS PROF. CHAMNAN PATARAPANICH, Ph.D. 140 PP. ISBN 974-577-807-9.

Paracetamol molecule contains two functional groups, -OH and -NH, and is therefore able to participate in at least one type of derivatization reaction called acetylation. Derivatization products consist of mixture of monoacetyl (MAAP) and diacetyl (DAAP)-derivatives. With three-hours incubation at 220°C, there were more DAAP formed than MAAP.

Although both derivatives could be detected in a gas-liquid chromatographic (GLC) system employing a Carbowax 20M column, only DAAP was determined in this study.

The peak area ratio of DAAP/benzophenone (which was used as internal standard) related directly to the amount of paracetamol used for acetylation, and a correlation coefficient (r = 0.9954) was obtained over a wide range (20-1000 mg) of paracetamol assayed.

Further experiments indicate a good percent recovery with this system whether paracetamol was in tablet, syrup or injectable formulations suggesting therefore that this GLC system can be used as a good sensitive, accurate reproducible method as that recommended in USP XXII for the measurement of this important compound.

ภาควิชา เภสัชเคมี
สาขาวิชา เภสัชเคมี
ปีการศึกษา 2532

ลายมือชื่อนิสิต ศิริวิภา อมาตยกุล
ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา
ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ACKNOWLEDGEMENT

First, I wish to express my gratitude to Associate Professor Dr. Sunibhond Pummangura and Assistant Professor Dr. Chamnan Patarapanich for their guidance, patience and understanding throughout this research. I would then like to thank the staff of the Pharmaceutical Chemistry Department for their advice and helpful.

I also wish to thank the staff of the Scientific and Technological Reseach Equipment Center for their cooperate in analyzing pure compounds and to the Graduate School of Chulalongkorn University for the provision of partial financial support.

My deepest gratitude goes to my parents, Professor Dr. Kosin and Mrs. Valai Amatayakul, for their encouragement, cheerfulness and helpful during my studies at Chulalongkorn University.

I wish to express my thank to my fiance, Dr. Wirawit Piyamongkol, for giving his time, kindness and help in typing some part of the thesis.

Finally, I would like to thank all my friends in the labolatory for their help, advice and for their friendship I shall never forget.

CONTENTS

Page

ABSTRACT (THAI) iv

ABSTRACT (ENGLISH) v

ACKNOWLEDGEMENTS vi

LIST OF TABLES xi

LIST OF FIGURES xiii

CHAPTER

I. INTRODUCTION 1

1. MEASUREMENT OF PARACETAMOL 2

1.1 Ultraviolet Spectrophotometry 2

1.2 Colorimetry 5

1.2.1 Conversion to P-Aminophenol 6

1.2.2 Dye Reaction 7

1.2.3 Nitration 8

1.3 Gas-Liquid Chromatography 12

1.4 High-Performance Liquid Chromatography 15

2. STATEMENTS OF PROBLEM 17

3. THE OUTLINE OF THIS THESIS 20

II. EXPERIMENTATION 21

1. INSTRUMENTS AND MATERIAL 21

1.1 Instruments 21

1.2 Materials 21

Page

2. PREPARATION OF BENZOPHENONE SOLUTIONS AS THE INTERNAL STANDARD 25
2.1 Benzophenone Solution-1 as the Internal Standard for Tablets, Syrups and Injections 25
2.2 Benzophenone Solution-2 as the Internal Standard for Human Serum 25
3. DERIVATIZATION REACTION OF PARACETAMOL 25
3.1 Preparation of Paracetamol Derivatives 25
3.1.1 O-Monoacetyl-p-acetaminophenol 25
3.1.2 N,O-Diacetyl-p-acetaminophenol 26
3.2 Identification of Paracetamol Derivatives 27
3.2.1 Measurement of melting point 27
3.2.2 Thin Layer Chromatography 27
3.2.3 Ultraviolet Spectrophotometry 27
3.2.4 Infrared Spectrophotometry 28
3.2.5 Proton Nuclear Magnetic Resonance Spectrometry 28
3.2.6 Gas-Liquid Chromatography 28
4. STUDIES OF FACTORS AFFECTING DERIVATIZATION REACTION 29
4.1 Effect of Temperature 29
4.2 Effect of Incubation Time 29
4.3 Effect of Amount and Composition of Acetylating Reagents 30
4.4 Effect of Varying Concentrations of Paracetamol 30

Page

5. QUANTITATIVE DETERMINATION OF PARACETAMOL IN SYRUP PREPARATIONS 31
5.1 Acetylation-GLC Method 31
5.1.1 Preparation of Standard Solution 31
5.1.2 Preparation of Chromatographic Column 32
5.1.3 Preparation of Sample 32
5.1.4 Procedure 33
5.1.5 Percent Recovery 34
5.2 USP XXII Method 34
5.2.1 Preparation of Standard Solution 34
5.2.2 Preparation of Chromatographic Column 35
5.2.3 Preparation of Sample 35
5.2.4 Procedure 36
5.2.5 Percent Recovery 36
6. QUANTITATIVE DETERMINATION OF PARACETAMOL IN TABLET PREPARATIONS 37
6.1 Acetylation-GLC Method 37
6.1.1 Preparation of Standard Solution 38
6.1.2 Preparation of Sample 38
6.1.3 Procedure 38
6.1.4 Percent Recovery 39
6.2 USP XXII Method 39
6.2.1 Preparation of Standard Solution 39
6.2.2 Preparation of Chromatographic Column 39
6.2.3 Preparation of Sample 40
6.2.4 Procedure 40

Page

6.2.5 Percent Recovery 41

7. QUANTITATIVE DETERMINATION OF PARACETAMOL IN INJECTION PREPARATIONS USING ACETYLATION-GLC METHOD 41

7.1 Preparation of Standard Solution 42

7.2 Preparation of Sample 42

7.3 Procedure 42

7.4 Percent Recovery 43

8. QUANTITATIVE DETERMINATION OF PARACETAMOL IN HUMAN SERUM USING ACETYLATION-GLC METHOD 43

8.1 Stock Solution of Paracetamol for the Preparation of Standard Solution 43

8.2 Preparation of Standard Solution 44

8.3 Preparation of Chromatographic Column 44

8.4 Stock Solution of Paracetamol for the Preparation of Sample 44

8.5 Preparation of Sample 44

8.6 Procedure 45

III. RESULTS AND DISCUSSION 46

IV. SUMMARY AND CONCLUSION 72

REFERENCES 75

APPENDIX 82

VITA 120

LIST OF TABLES

Table No.		Page
1.	Physical Characteristic (melting points)	83
2.	R_f Values of Paracetamol and its Derivatives	84
3.	Effect of Temperature on Acetylation	85
4.	Effect of Incubation Time on Acetylation at 220°c	86
5.	Effect of Amount and Composition of Acetylating Reagents (pyridine and acetic anhydride)	87
6.	Effect of Concentrations of Paracetamol	88
7.	Standard Curve of Paracetamol for Determination of Paracetamol in Syrup Preparations	89
8.	Quantitative Determination of Paracetamol in Syrup Preparations Using Acetylation-GLC Method	90
9.	Percent Recovery of Paracetamol in Syrup Preparation No.2 Using Acetylation-GLC Method	92
10.	Quantitative Determination of Paracetamol in Syrup Preparations Using USP XXII Method	93
11.	Percent Recovery of Paracetamol in Syrup Preparation No.2 Using USP XXII Method	94
12.	Standard Curve of Paracetamol for Determination of Paracetamol in Tablet and Injection Preparations	95
13.	Quantitative Determination of Paracetamol in Tablet Preparations Using Acetylation-GLC Method	96

Page

14. Percent Recovery of Paracetamol in Tablet Preparation No.1 Using Acetylation-GLC Method 98
15. Quantitative Determination of Paracetamol in Tablet Preparations Using USP XXII Method 99
16. Percent Recovery of Paracetamol in Tablet Preparation No.1 Using USP XXII Method 100
17. Quantitative Determination of Paracetamol in Injection Preparations Using Acetylation-GLC Method 101
18. Percent Recovery of Paracetamol in Injection Preparation No.1 Using Acetylation-GLC Method 102
19. Standard Curve of Paracetamol in Human Serum 103
20. Quantitative Determination of Paracetamol in Human Serum Using Acetylation-GLC Method 104

LIST OF FIGURES

Figure No.		Page
1.	Thin Layer Chromatogram of Paracetamol and its Derivatives	105
2.	Ultraviolet Spectrum of Paracetamol and its Derivatives	106
3.	Infrared Spectrum of Paracetamol in KBr Disc	107
4.	Infrared Spectraumof MAAP in KBr Disc	108
5.	Infrared Spectraumof DAAP in KBr Disc	109
6.	Proton Nuclear Magnetic Resonance Spectrum of Paracetamol in DMSO-d_6	110
7.	Proton Nuclear Magnetic Resonance Spectrum of MAAP in $CHCl_3$-d	111
8.	Proton Nuclear Magnetic Resonance Spectrum of DAAP in $CHCl_3$-d	112
9.	Gas-Liquid Chromatogram of Paracetamol Derivatives.from Sample and Standards	113
10.	Effect of Temperature on Acetylation	114
11.	Effect of Incubation Time on Acetylation at 220°c	115
12.	Effect of Amount and Composition of Acetylation Reagents (pyridine and acetic anhydride)	116
13.	Effect of Varying Concentrations of Paracetamol	117
14.	Standard Curve of Paracetamol for Determination of Paracetamol in Syrup Preparations	118
15.	Chromatogram of Paracetamol in Syrup Preparations	119

Page

16. Standard Curve of Paracetamol for Determination of Paracetamol in Tablet and Injection Preparations 120
17. Chromatogram of Paracetamol in Tablet Preparations 121
18. Chromatogram of Paracetamol in Injection Preparations .. 122
19. Standard Curve of Paracetamol in Human Serum 123
20. Chromatogram of Paracetamol in Human Serum 124