

การประเมินความจำเพาะของวิธีวิเคราะห์ตามเภสัชตำรับของ

ยา Dihydroartemisinin

นางสาว รัชญา แพร้วพิพัฒน์ 5136647633

นางสาว รัชญา หวังภัทรวานิช 5136571533

โครงการปริญญานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร

เภสัชศาสตรบัณฑิต

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ปีการศึกษา 2555

EVALUATION OF SPECIFICITY OF COMPENDIAL ANALYTICAL
METHODS OF DIHYDROARTEMISININ

Miss Runya Phraewphiphat 5136647633

Miss Tanya Wangpataravanich 5136571533

A Senior Project Submitted in Partial Fulfillment of the Requirement

for the Bachelor of Science Program in Pharmacy

Chulalongkorn University

2012

หัวข้อ โครงการปริญญาโท	การประเมินความจำเพาะของวิธีวิเคราะห์ตามเกสซ์คาร์บของยา Dihydroartemisinin
นักศึกษาดำเนินโครงการ	นางสาว รัชญา แพร้วพิพัฒน์ 5136647633 นางสาว รัชญา หวังภัทรวานิช 5136571533
สาขาวิชา	เภสัชกรรมผลิตภัณฑ์ เชนงเทคโนโลยีเภสัชกรรม
อาจารย์ที่ปรึกษาปริญญาโท	อ.ภก.ดร.วรสิทธิ์ วงศ์สุทธิเลิศ
อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม	อ.ภก.ดร.บดินทร์ ติวสุวรรณ

คณะเภสัชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้โครงการปริญญาโทฉบับนี้เป็น
ส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาเภสัชศาสตรบัณฑิต

..... คณบดี

(รองศาสตราจารย์ เกสซ์กรหญิง ดร. พิณทิพย์ พงษ์เพชร)

..... ประธานแขนงเทคโนโลยีเภสัชกรรม

(รองศาสตราจารย์ เกสซ์กร ดร. ภาคภูมิ เต็งอำนาจ)

.....อาจารย์ที่ปรึกษาปริญญาโท

(อาจารย์ เกสซ์กร ดร. วรสิทธิ์ วงศ์สุทธิเลิศ)

.....อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม

(อาจารย์ เกสซ์กร ดร. บดินทร์ ติวสุวรรณ)

บทคัดย่อปริยฐานิพนธ์

- ชื่อโครงการ (ภาษาไทย)** : การประเมินความจำเพาะของวิธีวิเคราะห์ตามเภสัชตำรับของยา Dihydroartemisinin
- ชื่อโครงการ (ภาษาอังกฤษ)** : Evaluation of Specificity of Compendial Analytical Methods of Dihydroartemisinin
- หัวหน้าโครงการ** : นางสาว รัชญา แพร้วพิพัฒน์ 5136647633
- ผู้ร่วมโครงการ** : นางสาว รัชญา หวังภัทรวานิช 5136571533
- อาจารย์ที่ปรึกษาโครงการ** : อ.ภก.ดร.วรสิทธิ์ วงศ์สุทธิเลิศ, อ.ภก.ดร.ปดิษฐ์ ติวสุวรรณ
- ภาควิชา** : อาหารและเภสัชเคมี

Dihydroartemisinin (DHA) is an Artemisinin derivative used in combination with Piperaquine as antimalarial regimen which is actively used in Eastern Thailand, Cambodia, and Vietnam. Based on several labile functional groups on DHA structure, such as peroxide and hemiacetal, the drug has been reported to have stability problem and can be degraded via many pathways. A suitable stability indicating analytical method is essential to control the drug quality and it is one of the key for substandard and counterfeit drugs prevention. The DHA monograph in International Pharmacopoeia 2011 has been used primarily to assess the content and purity of DHA through simple isocratic RP-HPLC analysis. However, the specificity of the official method may not be sufficient considering that DHA is highly unstable. In this study, the specificity of method has been verified through series of stress test study. Stress conditions have been used to force the degradation of DHA in order to determine the capability of the method to separate active drug and its related compounds. The results from stress testing in acid and base indicate that the drug monograph issued in International Pharmacopoeia do not have sufficient specificity and require further development.

ฝ่ายวิชาการ คณะเภสัชศาสตร์

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

.....

อาจารย์ที่ปรึกษา

คำนำ

รายงานนี้ได้จัดทำขึ้นเพื่อเป็นส่วนหนึ่งในโครงการปริญญาโทของนิสิตชั้นปีที่ ๕ คณะเภสัชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย โดยได้นำเสนอการประเมินความจำเพาะของวิธีวิเคราะห์ตามเกณฑ์ตามเภสัชตำรับของยา Dihydroartemisinin ด้วย High-Performance Liquid Chromatography (HPLC)

ในปัจจุบันวิธีวิเคราะห์ยา Dihydroartemisinin มีการกำหนดไว้โดย The International Pharmacopoeia Monograph 2011 ซึ่งวิธีดังกล่าวมีข้อบกพร่องบางประการในด้านความจำเพาะของวิธีวิเคราะห์หาปริมาณตัวยาสำคัญ จึงได้มีการประเมินความจำเพาะของวิธีวิเคราะห์ดังกล่าวโดยศึกษาจากตัวยาในสถานะต่างๆ เพื่อเป็นการยืนยันถึงความจำเพาะและความเหมาะสมของวิธีวิเคราะห์ตามเภสัชตำรับดังกล่าวในการนำมาใช้วิเคราะห์หาปริมาณตัวยา Dihydroartemisinin ในระดับสากลต่อไป

ผู้จัดทำโครงการหวังว่าโครงการนี้จะประโยชน์สำหรับผู้สนใจศึกษาและประชาชนทั่วไป หากในรายงานนี้มีข้อบกพร่องประการใด ทางผู้จัดทำโครงการขออภัยมา ณ ที่นี้ด้วย

คณะผู้จัดทำ

กิตติกรรมประกาศ

ในการศึกษาโครงการปริญญาโทนี้ ผู้ศึกษาขอกราบขอบพระคุณอาจารย์ เกษักร ดร.วรสิทธิ์ วงศ์สุทธิเลิศ อาจารย์ที่ปรึกษา และอาจารย์ เกษักร ดร.บดินทร์ ติวสุวรรณ อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม ที่กรุณาให้คำปรึกษาแนะนำและช่วยตรวจสอบแก้ไขข้อบกพร่องของโครงการนี้ ตลอดจนให้ความรู้และข้อคิดเห็นที่เป็นประโยชน์อย่างยิ่งต่อโครงการนี้

ขอขอบพระคุณภาควิชาอาหารและเภสัชเคมี และศูนย์นวัตกรรมทางยาและผลิตภัณฑ์สุขภาพแห่งจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย (CU.D.HIP) ที่กรุณาให้การสนับสนุนในการดำเนินการทำโครงการนี้

สารบัญ

บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.....	ก
คำนำ.....	ข
กิตติกรรมประกาศ.....	ค
สารบัญ.....	ง
สารบัญตาราง.....	ฉ
สารบัญรูปภาพ.....	ช
บทที่	
1 บทนำ.....	1
1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา.....	1
1.2 คุณสมบัติทางเคมีและฟิสิกส์ของตัวยา.....	2
1.3 สภาวะและปฏิกิริยาการเสื่อมสลายของตัวยา.....	3
1.4 หลักการของ High Performance Liquid Chromatography (HPLC).....	5
1.5 วัตถุประสงค์ของการวิจัย.....	9
1.6 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ.....	9
2 ปรีทัศน์วรรณกรรม.....	10
2.1 วิธีวิเคราะห์ที่เป็นทางการของยา Dihydroartemisinin ตามเกณฑ์สำหรับ The International Pharmacopoeia Monograph 2011.....	10
2.2 วิธีวิเคราะห์จากบทความชื่อ On-column Epimerization of Dihydroartemisinin: An Effective Analytical Approach to Overcome the Shortcomings of The International Pharmacopoeia monograph.....	11
3 วิธีดำเนินการวิจัย.....	15
3.1 เครื่องมือและอุปกรณ์.....	15
3.2 สารเคมีและรีเอเจนต์.....	16
3.3 การศึกษา Stereodynamic ของยา Dihydroartemisinin.....	16
3.4 การศึกษาวิธีวิเคราะห์ Dihydroartemisinin และสารสลาย (Degraded product)	17

สารบัญ (ต่อ)

3.5	การทดสอบความคงตัวของยา Dihydroartemisinin ในสารละลายที่เป็น Acetonitrile : Water (60 : 40).....	23
3.6	การวิเคราะห์โดยใช้ UV-Visible Spectrophotometer ตาม The International Pharmacopoeia Monograph 2011 Method B.....	24
4	ผลการวิจัยและอภิปรายผล.....	26
4.1	การศึกษา two-principle peak โดยใช้ Mass spectrometer.....	26
4.2	การศึกษา Stereodynamic ของยา Dihydroartemisinin	28
4.3	การศึกษาระบบบัฟเฟอร์และ pH ที่เหมาะสมของสารละลาย.....	31
4.4	การศึกษาสภาวะที่ทำให้เกิดสารสลายของยา Dihydroartemisinin เพื่อศึกษาความจำเพาะของวิธีวิเคราะห์.....	37
4.5	การทดสอบความคงตัวของยา Dihydroartemisinin ในสารละลายที่เป็น Acetonitrile : Water (60 : 40)	40
4.6	การวิเคราะห์โดยใช้ UV-Visible Spectrophotometer ตาม The International Pharmacopoeia Monograph 2011 Method B.....	43
5	สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ.....	49
5.1	สรุปผลการวิจัย.....	49
5.2	ข้อเสนอแนะ.....	49
	เอกสารอ้างอิง.....	51
	ภาคผนวก.....	52

สารบัญตาราง

ตารางที่ 1	พารามิเตอร์ต่างๆ ที่เกี่ยวกับประสิทธิภาพคอลัมน์.....	8
ตารางที่ 2	แสดงประสิทธิภาพของ Ammonium acetate-acetic acid Buffer (pH = 4.80) ในความเข้มข้น 10, 20, 40 mM.....	32
ตารางที่ 3	แสดงประสิทธิภาพของ Sodium dihydrogen phosphate-phosphoric acid Buffer (pH = 5.10) ในความเข้มข้น 5, 10, 20 mM.....	33
ตารางที่ 4	แสดงค่า UV cutoff ของ Mobile phase.....	34
ตารางที่ 5	แสดงค่าเฉลี่ยของพื้นที่ใต้กราฟ ค่า SD และ %RSD ของทั้ง alpha และ beta-DHA Peak ของสารละลาย Freshly Prepared และเมื่อเวลาผ่านไป 3 และ 6 ชั่วโมงตามลำดับ.....	40
ตารางที่ 6	แสดงค่าเฉลี่ยของพื้นที่ใต้กราฟ ค่า SD และ %RSD ของทั้ง alpha และ beta-DHA Peak ของสารละลาย เมื่อเวลาผ่านไป 9, 12 และ 15 ชั่วโมงตามลำดับ.....	40
ตารางที่ 7	แสดงค่า %RSD ของการทำ Standard Curve ในช่วงความเข้มข้นในช่วงต่างๆ.....	48

สารบัญรูปรภาพ

รูปที่ 1	โครงสร้างของ Dihydroartemisinin.....	1
รูปที่ 2	การเสื่อมสลายของ Dihydroartemisinin ที่อุณหภูมิ 100°C (N ₂)	3
รูปที่ 3	การเสื่อมสลายของ Dihydroartemisinin ในสารละลาย 5 M HCl ในน้ำ : THF (1:1).....	4
รูปที่ 4	การเสื่อมสลายของ Dihydroartemisinin ในสารละลาย 5 M HCl ในน้ำ : Ethanol (1:1)	4
รูปที่ 5	การเสื่อมสลายของ Dihydroartemisinin ในสารละลาย 1 M KOH ในน้ำ.....	5
รูปที่ 6	การทำงานของเครื่อง HPLC.....	5
รูปที่ 7	โครมาโทแกรมของ (1)Diketoaldehyde (2)2 α -dihydroartemisinin (3)2 β -dihydroartemisinin (4)Artemisinin เมื่อใช้ symmetry C18 column (4.6 \times 150 mm)	12
รูปที่ 8	การวิเคราะห์ยา Dihydroartemisinin ด้วย symmetry C18 column (4.6 \times 150 mm, 3 μ m) ที่อุณหภูมิต่างๆ (A)T=0°C (B) T=5 °C (C) T=10 °C และ (D) T=25 °C.....	13
รูปที่ 9	แสดงขั้นตอนการเตรียมสารละลายเพื่อทำการวิเคราะห์หาปริมาณของ Dihydroartemisinin ตาม The International Pharmacopoeia Monograph 2011 Method B.....	24
รูปที่ 10	แสดง chromatogram ของ Dihydroartemisinin.....	26
รูปที่ 11	แสดง mass spectrum ของ peak หลัก peak แรกของ chromatogram รูปที่ 10.....	26
รูปที่ 12	แสดง mass spectrum ของ peak หลัก peak ที่สองของ chromatogram รูปที่ 10.....	27
รูปที่ 13	แสดงโครงสร้างของ[DHA-17] ⁺	27
รูปที่ 14	แสดงพื้นที่ใต้พีคที่มีลักษณะของพีคเป็น two-principle peak ของ DHA.....	28
รูปที่ 15	แสดงโครมาโทแกรมของสารละลายยา Dihydroartemisinin ความเข้มข้น 3 mg/ml.....	29
รูปที่ 16	แสดงโครมาโทแกรมของ fraction ที่เก็บได้จากสารละลายยา Dihydroartemisinin ความเข้มข้น 3 mg/ml บริเวณ Alpha form.....	29
รูปที่ 17	แสดงโครมาโทแกรมของ fraction ที่เก็บได้จากสารละลายยา Dihydroartemisinin ความเข้มข้น 3 mg/ml บริเวณระหว่าง Alpha และ Beta form.....	30
รูปที่ 18	แสดงโครมาโทแกรมของ fraction ที่เก็บได้จากสารละลายยา Dihydroartemisinin ความเข้มข้น 3 mg/ml บริเวณ Beta form.....	30
รูปที่ 19	แสดงโครมาโทแกรมของ fraction ที่เก็บได้จากสารละลายยา Dihydroartemisinin ความเข้มข้น 3 mg/ml บริเวณหลังจาก Alpha และ Beta form.....	31

สารบัญรูปร่างภาพ (ต่อ)

รูปที่ 20	แสดงโครมาโทแกรมของสารละลาย Dihydroartemisinin 1 mg/ml ใน diluents ที่เป็น Acetonitrile : Buffer อัตราส่วน 60 : 40.....	35
รูปที่ 21	แสดงโครมาโทแกรมของ Acetonitrile : Ammonium Acetate-Acetic acid Buffer อัตราส่วน 60 : 40.....	35
รูปที่ 22	แสดงโครมาโทแกรมของสารละลาย Dihydroartemisinin 1 mg/ml ใน diluents ที่เป็น Acetonitrile : น้ำ อัตราส่วน 60 : 40.....	36
รูปที่ 23	แสดงโครมาโทแกรมของสารละลาย Acetonitrile : Soium dihydrogen Phosphate-Phosphoric acid Buffer อัตราส่วน 60 : 40.....	36
รูปที่ 24	แสดงโครมาโทแกรมของสารละลาย Dihydroartemisinin 1 mg/ml ใน diluents ที่เป็น Acetonitrile : Soium dihydrogen Phosphate-Phosphoric acid Buffer อัตราส่วน 60 : 40.....	37
รูปที่ 25	แสดงโครมาโทแกรมของสารละลาย Dihydroartemisinin 1 mg/ml ที่ผ่านการ stress ในสภาวะกรด (0.2 N HCl) เป็นเวลา 14 ชั่วโมง.....	38
รูปที่ 26	แสดงโครมาโทแกรมของสารละลาย Dihydroartemisinin 1 mg/ml ที่ผ่านการ Stress ในสภาวะด่าง (0.2 N NaOH) เป็นเวลา 1 ชั่วโมง.....	39
รูปที่ 27	กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างพื้นที่ใต้กราฟและเวลาที่ผ่านไป ของ Alpha-DHA Peak.....	41
รูปที่ 28	กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างพื้นที่ใต้กราฟและเวลาที่ผ่านไป ของ Beta-DHA Peak.....	41
รูปที่ 29	กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างพื้นที่ใต้กราฟและเวลาที่ผ่านไปของ Degraded DHA Peak.....	42
รูปที่ 30	แสดง UV Spectrum ของการวิเคราะห์หาปริมาณ Dihydroartemisinin ตามวิธีวิเคราะห์ของ The International Pharmacopoeia Monograph 2011 Method B.....	43
รูปที่ 31	กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างการดูดกลืนแสง (Absorbance) และความเข้มข้นของยาที่ใช้ในการวิเคราะห์ตาม The International Pharmacopoeia Monograph 2011 Method B.....	47

บทที่ 1

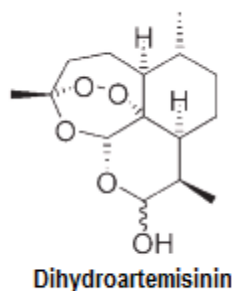
บทนำ

1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา

ยาสูตรผสมระหว่าง Dihydroartemisinin และ Piperaquine เป็นทางเลือกหนึ่งในการรักษาผู้ป่วยมาลาเรีย โดยเฉพาะอย่างยิ่งผู้ป่วยแถบชายแดนทางภาคตะวันออกของไทย กัมพูชา และเวียดนาม^[1] ซึ่งประสบปัญหาจากการแพร่กระจายของยาคื้อยคุณภาพและยาปลอม จากการศึกษาความคงตัวของยา Dihydroartemisinin พบว่าตัวยาสามารถเสื่อมสลายได้ง่ายในสถานะต่างๆ^{[2],[3]} เช่น สถานะที่มีความร้อนสูง, ความชื้นและในสารละลายที่มีน้ำ, สถานะความเป็นกรด-ด่าง รวมถึงโลหะบางชนิดที่สามารถเกิดปฏิกิริยา Oxidation ได้ เช่น Fe^{2+} , Mn^{2+} และ nucleophile จึงทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างและคุณสมบัติของยา ซึ่งส่งผลกระทบต่อฤทธิ์ทางการรักษาที่เปลี่ยนแปลงและอาจเกิดความเป็นพิษขึ้น ซึ่งปัญหาดังกล่าวนี้มีผลต่อประสิทธิภาพในการรักษาของยา จากวิธีวิเคราะห์ยา Dihydroartemisinin ที่มีในเภสัชตำรับในปัจจุบัน เช่น International Pharmacopoeia 2011^[4] และ Chinese Pharmacopoeia 2005^[5] ไม่ได้มีการคำนึงถึงความคงตัวของ Dihydroartemisinin เท่าที่ควร และอาจไม่สามารถนำมาใช้วิเคราะห์แยกตัวยาและสารปนเปื้อนที่เกิดจากการเสื่อมสลายของตัวยาได้อย่างมีประสิทธิภาพ จึงอาจเป็นสาเหตุสำคัญที่ทำให้ประสบปัญหา ยาปลอม และยาคื้อยคุณภาพได้

จากข้อสงสัยเกี่ยวกับประสิทธิภาพของวิธีวิเคราะห์ในเภสัชตำรับ โดยเฉพาะอย่างยิ่งในเรื่องที่เกี่ยวกับความจำเพาะ (specificity) ของวิธีการในการตรวจสอบสารสำคัญ (ตัวยา) สารเสื่อมสลาย และสารประกอบอื่นๆของยา Dihydroartemisinin ทำให้ทางผู้วิจัยมีความสนใจที่จะศึกษาและประเมินประสิทธิภาพของวิธีวิเคราะห์ยา Dihydroartemisinin ที่มีในสูตรตำรับต่างๆ เพื่อปรับปรุงวิธีวิเคราะห์ให้มีประสิทธิภาพมากขึ้น

1.2 คุณสมบัติทางเคมีและฟิสิกส์ของตัวยา



รูปที่ 1 โครงสร้างของ Dihydroartemisinin

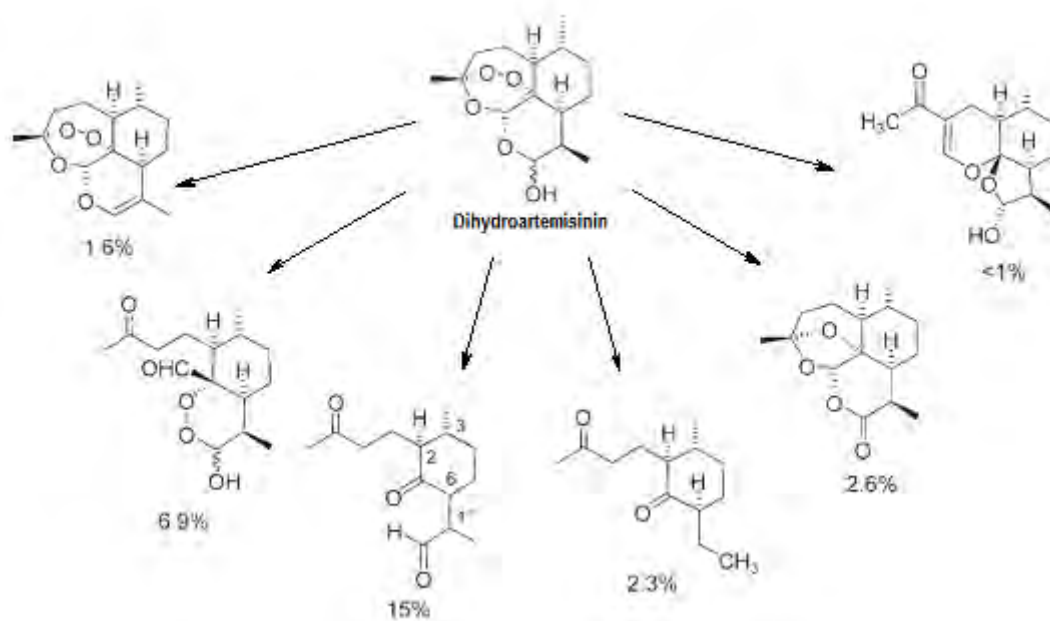
ชื่อทางเคมี	(3 <i>R</i> ,5 <i>aS</i> ,6 <i>R</i> ,8 <i>aS</i> ,9 <i>R</i> ,10 <i>S</i> ,12 <i>R</i> ,12 <i>aR</i>)-3,6,9-trimethyldecahydro-12 <i>H</i> -3,12epoxypyrano[4,3- <i>j</i>]-1,2-benzodioxepin-10-ol (3 <i>R</i> , 5 <i>aS</i> , 6 <i>R</i> , 8 <i>aS</i> , 9 <i>R</i> , 10 <i>S</i> , 12 <i>R</i> , 12 <i>aR</i>)-Decahydro3, 6, 9-trimethyl-3, 12-epoxy-12 <i>H</i> -pyrano [4, 3- <i>j</i>]-1, 2-benzodioxepin-10-ol
ชื่อพ้อง	Artemimolum, Artemimol, β-dihydroartemisinin
ลักษณะทางกายภาพ	ผงหรือผลึกสีขาว
การละลาย	ในน้ำ: Practically insoluble (130-160 µg/ml) ใน Acetonitrile: Slightly soluble (1 ส่วน ในสารละลาย 100 ถึง 1,000 ส่วน) ใน Ethanol, Methanol: ประมาณ 750 g/l ใน Dichloromethane: Soluble (1 ส่วน ในสารละลาย 10 ถึง 30 ส่วน)
pKa	12.6
logP	2.5
มวลโมเลกุล	284.4
สูตรโมเลกุล	C ₁₅ H ₂₄ O ₅
จุดหลอมเหลว	140°C
การเก็บรักษา	เก็บในภาชนะปิดสนิท และป้องกันแสง

1.3 สถานะและปฏิกิริยาการเสื่อมสลายของตัวยา^{[1], [2]}

จากการศึกษาพบว่า ตัวยา Dihydroartemisinin เป็นสารที่มีความคงตัวต่ำ เนื่องจากลักษณะของโครงสร้าง ทำให้อาจเกิดการเสื่อมสลาย (Degradation) ของตัวยาได้เป็นสารปนเปื้อน (Impurity) ได้ในสถานะต่างๆ เช่น

I. การเสื่อมสลายเนื่องจากอุณหภูมิ

- ในสถานะที่มีอุณหภูมิ 100°C ภายใต้ก๊าซไนโตรเจน (N₂) จะพบการเสื่อมสลายดังรูปที่ 2

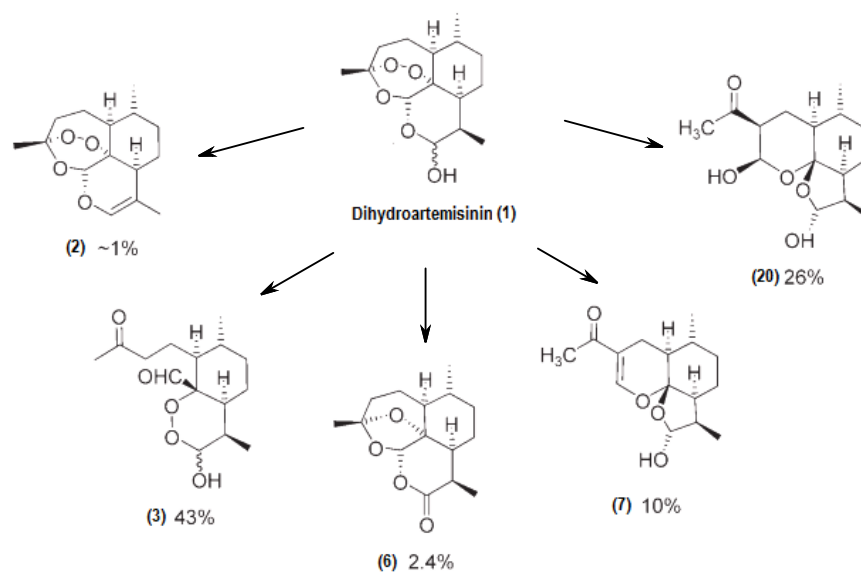


รูปที่ 2 การเสื่อมสลายของ Dihydroartemisinin ที่อุณหภูมิ 100°C (N₂)

- ในสถานะที่มีอุณหภูมิ 40°C ความชื้นสัมพัทธ์ 70%RH
 - เมื่อเวลาผ่านไป 1 เดือน พบการเสื่อมสลายของตัวยา 2.0%
 - เมื่อเวลาผ่านไป 3 เดือน พบการเสื่อมสลายของตัวยา 2.9%

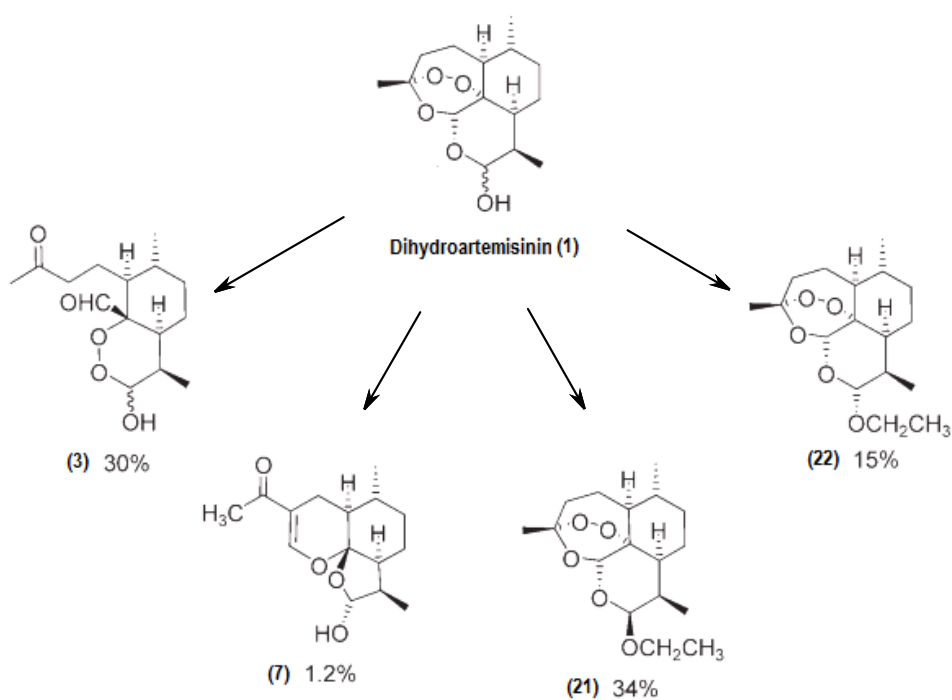
II. การเสื่อมสลายในสารละลายน้ำเนื่องจากภาวะความเป็นกรด – ด่าง

- ในสารละลาย 5 M HCl ในน้ำ : THF (1:1) จะพบการเสื่อมสลายดังรูปที่ 3



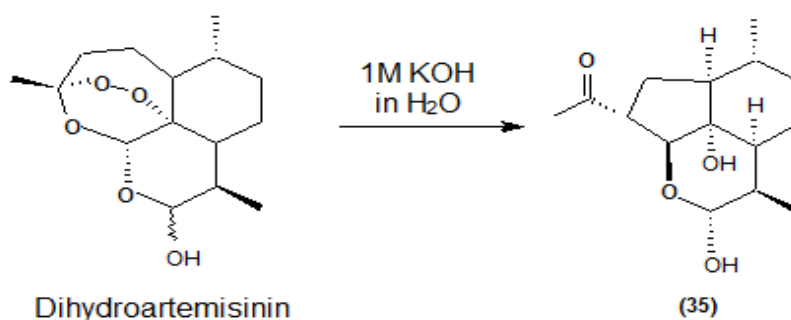
รูปที่ 3 การเสื่อมสลายของ Dihydroartemisinin ในสารละลาย 5 M HCl ในน้ำ : THF (1:1)

- ในสารละลาย 5 M HCl ในน้ำ : Ethanol (1:1) จะพบการเสื่อมสลายดังรูปที่ 4



รูปที่ 4 การเสื่อมสลายของ Dihydroartemisinin ในสารละลาย 5 M HCl ในน้ำ : Ethanol (1:1)

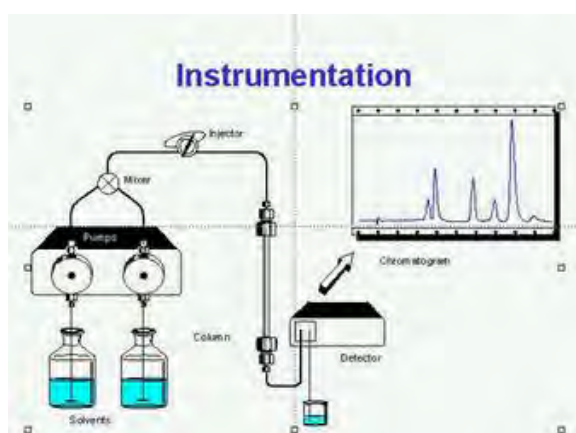
- ในสารละลาย 1M KOH ในน้ำ จะพบการเสื่อมสลายดังรูปที่ 5



รูปที่ 5 การเสื่อมสลายของ Dihydroartemisinin ในสารละลาย 1 M KOH ในน้ำ

1.4 หลักการของ High Performance Liquid Chromatography (HPLC)^[6]

High Performance Liquid Chromatography (HPLC) หรือโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง แยกสารเคมีภายใต้ความดันของเหลว สามารถใช้ในการวิเคราะห์สารเชิงคุณภาพวิเคราะห์ (Qualitative Analysis) และปริมาณวิเคราะห์ (Quantitative Analysis) เป็นเทคนิคที่ใช้สำหรับแยกสารประกอบที่ผสมอยู่ในตัวอย่าง โดยกระบวนการแยกสารละลายที่ประกอบด้วยสารมากกว่าหนึ่งอย่างระหว่างวัฏภาค 2 วัฏภาค คือ วัฏภาคคงที่ (Stationary phase) กับ วัฏภาคเคลื่อนที่ (Mobile phase) ซึ่งสารจะถูกแยกออกมาในเวลาที่แตกต่างกัน โดยการที่สารผสมในตัวอย่างจะสามารถถูกแยกออกจากกันได้นั้น ขึ้นอยู่กับความสามารถในการเข้ากันได้ดีของสารนั้นกับ mobile phase หรือ stationary phase สารประกอบตัวไหนที่สามารถเข้ากันได้ดีกับ mobile phase จะเคลื่อนที่ผ่าน column ได้เร็ว สารนั้นก็就会被แยกออกมาก่อน ส่วนสารที่เข้ากันได้ไม่ดีกับ mobile phase หรือเข้ากันได้ดีกับ stationary phase จะเคลื่อนที่ผ่าน column ได้ช้า ก็จะถูกแยกออกมาทีหลัง



รูปที่ 6 การทำงานของเครื่อง HPLC

การทำงานของเครื่อง Pump จะสูบตัวทำละลายซึ่งทำหน้าที่เป็นวัฏภาคเคลื่อนที่ (mobile phase) พาสารตัวอย่างที่ถูกฉีดเข้าทางช่องฉีดสาร (injector) ผ่านอนุภาคที่เป็นวัฏภาคคงที่ (stationary phase) ซึ่งบรรจุอยู่ในคอลัมน์ (column) สารผสมตัวอย่างจะเคลื่อนที่ผ่านคอลัมน์และถูกแยกออกมา ผ่านเข้าสู่เครื่องตรวจวัด (detector) ในเวลาที่ต่างกัน สัญญาณที่วัดได้จะอยู่ในรูปสัญญาณไฟฟ้าตามเวลาและปริมาณของสารแต่ละตัวที่ตรวจวัดได้ จากนั้นสัญญาณจะถูกส่งไปยังเครื่องบันทึกสัญญาณ เพื่อแสดงผลออกมาเป็นโครมาโทแกรม (chromatogram)

ส่วนประกอบของเครื่อง HPLC

1. **Solvent / Mobile Phase** หรือตัวทำละลายที่ใช้ในการชะหรือแยกสารตัวอย่าง เป็นวัฏภาคเคลื่อนที่ มีลักษณะเป็นของเหลว ทำหน้าที่ในการนำสารตัวอย่างและตัวทำละลายเข้าสู่ stationary phase (ในที่นี้คือ คอลัมน์) เพื่อให้เกิดกระบวนการแยกภายในคอลัมน์

คุณสมบัติที่สำคัญบางประการของ Mobile Phase ที่ใช้ใน HPLC ได้แก่

- 1). ไม่ทำปฏิกิริยากับ Column หรือ Packing Material เนื่องจากอาจทำให้คุณสมบัติในการแยกสารเปลี่ยนแปลงไป
- 2). สามารถละลายสารตัวอย่างได้
- 3). ปราศจาก Particle (ทำให้เกิดการอุดตันใน Column เป็นการเพิ่มความดันในระบบ) และ Dissolved Gas

ดังนั้น Solvent และสารละลายตัวอย่างทุกชนิดก่อนการวิเคราะห์โดยใช้ HPLC ควรกรองผ่านกระดาษกรองที่มีรูพรุนขนาด 0.45 – 0.5 ไมครอน, Centrifuge และกำจัดก๊าซซึ่งละลายอยู่ในสารละลายทั้งหมดซึ่งอาจทำได้โดยใช้ Ultrasonic Bath (Sonicator)

- 4). บริสุทธิ์ปราศจากสิ่งเจือปน ซึ่งรวมถึงพวก Preservative และ Stabilizer ต่างๆ สำหรับน้ำกลั่นจะต้องปราศจากสารอินทรีย์และแบคทีเรียต่างๆ
- 5). เหมาะสมกับชนิดของ Detector ที่ใช้

2. Degasser ทำหน้าที่กำจัดฟองอากาศที่มีอยู่ใน mobile phase เพื่อไม่ให้ฟองอากาศเข้าสู่ column และ detector แต่ทั้งนี้ ถึงแม้ว่าเครื่องจะมี Degasser อยู่แล้วก็ควรต้องผ่านการ Sonicate ก่อน เพื่อลดภาระการทำงานของ Degasser

3. Pump ทำหน้าที่ดึงตัวทำละลาย (mobile phase) เข้าสู่ระบบ HPLC เนื่องจากในการแยกสารผสมในเทคนิค HPLC จะอาศัยหลักการไหลของวัฏภาคเคลื่อนที่ผ่านวัฏภาคอยู่กับที่ ที่มีขนาดอนุภาคเล็กมาก จึงทำให้เกิดความต้านทานการไหล ระบบปั๊มจึงมีความสำคัญมากในการที่จะทำให้เกิดความดันสูงเพื่อที่จะเอาชนะแรงต้านทาน

Pump สามารถแบ่งออกได้เป็น 2 แบบ

- 1). Isocratic pump ใช้อัตราส่วนของ Mobile Phase คงที่ตลอดเวลา
- 2). Gradient Pump เป็น pump ที่สามารถควบคุมการเปลี่ยนแปลงอัตราส่วนของ Mobile Phase ได้ตามเวลาที่กำหนด

4. Injector / Autosampler ทำหน้าที่ในการฉีดสารตัวอย่างเข้าสู่ระบบ HPLC เป็นตำแหน่งที่รับสารละลายตัวอย่างที่ต้องการวิเคราะห์ และสารละลายจะเข้าสู่คอลัมน์ตามปริมาณที่กำหนด โดยอาศัยการไหลของ Mobile phase ซึ่งมี 2 แบบ ได้แก่

- Manual Injector คือการใช้เข็มฉีด ฉีดสารละลายตัวอย่างที่ต้องการทดสอบเข้าไประบบ โดยผู้ปฏิบัติงาน ซึ่งวิธีนี้จะส่งผลให้เกิดความคลาดเคลื่อนมากกว่าอีกวิธีที่จะกล่าวต่อไป
- Auto samples Injector คือ ฉีดสารละลายตัวอย่างที่ต้องการทดสอบเข้าไประบบโดยเครื่องมืออัตโนมัติ

5. Column คือส่วนที่บรรจุวัฏภาคคงที่ (Stationary Phase) ในการวิเคราะห์มักใช้หลักการ Partition ระหว่าง Mobile Phase และ Stationary Phase ทำให้เกิดกระบวนการแยกขององค์ประกอบของสารที่สนใจ

การทดสอบประสิทธิภาพคอลัมน์

โดยทั่วไปการพิจารณาประสิทธิภาพของคอลัมน์จะพิจารณาจากเกณฑ์ของค่าพารามิเตอร์ต่างๆ ดังตารางที่ 1

พารามิเตอร์	สูตรคำนวณ
Void volume	$t_0 \times F$
Capacity factor	$(t_r - t_0)/t_0$
Resolution	$(1/4)(\alpha - 1)(N)^{1/2}[k'/(1+k')]$
Tailing factor	$W_{0.05}/2F$
Theoretical plate	$16(t_r/W_b)^2$ $5.54(t_r/W_{1/2})^2$

ตารางที่ 1 พารามิเตอร์ต่างๆ ที่เกี่ยวกับประสิทธิภาพคอลัมน์

หมายเหตุ	t_0 : void time	t_r : retention time	F : flow rate
	α : separation factor	k' : capacity factor	N : column efficiency
	$W_{0.05}$: width at 5 %	W_b : width at base	$W_{1/2}$: width at half

Retention time (t_r) คือ ระยะเวลาตั้งแต่สารเข้าสู่ระบบจนถึงเวลาที่ detector รับสัญญาณได้

Void volume คือ ปริมาตรช่องว่างในคอลัมน์ หรือปริมาตรในส่วนที่คอลัมน์ไม่สามารถจับสาร (retain) ไว้ได้ สามารถหาค่าได้จากการฉีดสารที่มีโมเลกุลขนาดเล็ก ซึ่งสารนี้จะไม่ถูก retain ไว้ในคอลัมน์ และสามารถผ่านออกมาพร้อมกับ mobile phase ได้ จากนั้นนำค่า retention time (void time) ที่ได้มาคูณกับ flow rate ที่ใช้ ก็จะได้เป็นค่า void volume ซึ่งจะมีความสำคัญในการคำนวณค่าพารามิเตอร์อื่นๆ ต่อไป

Capacity factor (k') เป็นค่าที่บอกความสามารถในการ retain สารที่จะวิเคราะห์ไว้ในคอลัมน์ ซึ่งค่านี้จะต้องใช้ void time ในการคำนวณ

Resolution (R_s) เป็นค่าพารามิเตอร์ที่ใช้บอกความสามารถในการแยก peak ออกจากกัน เนื่องจากในการวิเคราะห์ปริมาณด้วย หาก peak ที่ต้องการไม่แยกออกจาก peak อื่นอย่างชัดเจน พื้นที่ของ peak ก็จะไม่ชัดเจนทำให้การคำนวณปริมาณผิดพลาดได้

Tailing factor เป็นค่าที่บอกลักษณะของ peak และจะมีค่าสูงเมื่อคอลัมน์เริ่มเสื่อมคุณภาพ

Number of theoretical plate (N) เป็นค่าที่ใช้ในการบอกประสิทธิภาพของคอลัมน์ โดยจะขึ้นอยู่กับคุณสมบัติของสารตัวอย่าง และสภาวะที่ใช้ในการวิเคราะห์ เช่น mobile phase, flow rate, อุณหภูมิ, คุณภาพ และการบรรจุของ packing material

6. Detector ตัวตรวจวัดสัญญาณ ทำหน้าที่ในการตรวจวัดสัญญาณของสารที่สนใจที่ได้จากกระบวนการแยก มีหลายชนิดที่ใช้ในปัจจุบัน การเลือกใช้ขึ้นอยู่กับตัวอย่างที่สนใจว่าสามารถตอบสนองกับ Detector ชนิดไหนได้ดี โดยชนิดที่ใช้ในการศึกษาครั้งนี้คือ “UV- Detector หรือ Photodiode array Detector” ซึ่งสารที่วิเคราะห์จะต้องสามารถดูดกลืนแสง UV ได้ เมื่อต้องการใช้ UV Detector อาจเตรียม derivative ของสารประกอบที่วิเคราะห์เพื่อให้ได้สารซึ่งดูดกลืนคลื่นแสง UV

1.5 วัตถุประสงค์ของการวิจัย

เพื่อยืนยันประสิทธิภาพของวิธีวิเคราะห์หาปริมาณและความบริสุทธิ์ของตัวยา Dihydroartemisinin ที่ใช้อยู่ในปัจจุบัน

1.6 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับจากการวิจัย

ข้อมูลที่ได้จากการทำวิจัยสามารถนำไปใช้ในการพัฒนาปรับปรุงวิธีวิเคราะห์คุณภาพและความคงตัวของยา Dihydroartemisinin ให้มีประสิทธิภาพมากขึ้น

บทที่ 2

ปรีทัศน์วรรณกรรม

2.1 วิธีวิเคราะห์ที่เป็นทางการของยา Dihydroartemisinin ตามเกณฑ์ตำรับ The International Pharmacopoeia Monograph 2011^[4]

จากการศึกษา The International Pharmacopoeia Monograph 2011 ในหัวข้อการวิเคราะห์หาปริมาณตัวยาสำคัญของยา Dihydroartemisinin พบว่ามีข้อมูลดังนี้

Method A

วิเคราะห์โดยใช้ Reverse Phase High Performance Liquid Chromatography ซึ่งมีรายละเอียดดังนี้

Stationary phase	:	C18 (4.6×100 mm), 3 μm
Mobile phase	:	Acetonitrile : Water (60 : 40)
Flow rate	:	0.6 ml/min
UV detector	:	216 nm
Injection volume	:	20 μl

การเตรียมสารละลาย

Diluent	:	Acetonitrile : Water (60 : 40)
Standard preparation	:	ละลาย Dihydroartemisinin References Standard ที่ซึ่งมาถูกต้องด้วย diluents ให้มีความเข้มข้น 1.0 mg/ml
Assay preparation	:	ละลาย Dihydroartemisinin ที่ซึ่งมาถูกต้องด้วย diluents ให้มีความเข้มข้น 1.0 mg/ml

ผลการวิเคราะห์

นำพื้นที่ใต้พีคของ Dihydroartemisinin และ 10-*epi*-dihydroartemisinin ที่ได้จากสารละลายที่ 1 และ 2 ตามลำดับ จากนั้นคำนวณเป็นเปอร์เซ็นต์ของปริมาณยา Artemisinin (C₁₅H₂₂O₅) ในรูปของ dried substance

Method B

วิเคราะห์โดยใช้ UV-Vis Spectrophotometry ที่ 292 nm โดยมีการเตรียมสารละลายดังนี้

Blank preparation	:	EtOH : 0.2 N NaOH (1 : 4)
Standard preparation	:	Dihydroartemisinin References Standard ความเข้มข้น 0.01 mg/ml ใน Ethanol : 0.05 N NaOH (1:4)
Sample preparation	:	Dihydroartemisinin References Standard ความเข้มข้น 0.01 mg/ml ใน Ethanol : 0.05 N NaOH (1:4)

ผลการวิเคราะห์

วัดค่าการดูดกลืนแสงของสารละลายที่ความยาวคลื่น 292 นาโนเมตร โดยใช้เครื่อง UV-Vis Spectrophotometer และเทียบปริมาณสารที่วิเคราะห์ได้ (Artemisinin (C₁₅H₂₂O₅)) กับสารมาตรฐาน ในรูปของ dried substance

2.2 วิธีวิเคราะห์จากบทความชื่อ **On-column Epimerization of Dihydroartemisinin: An Effective Analytical Approach to Overcome the Shortcomings of The International Pharmacopoeia Monograph**^[7]

วิเคราะห์โดยใช้ Reverse Phase High Performance Liquid Chromatography ซึ่งมีรายละเอียดดังนี้

Stationary phase	:	Symmetry C18 (4.6×150 mm), 3 μm
Mobile phase	:	Acetonitrile : Water (60 : 40)
Flow rate	:	1.0 ml/min
UV detector	:	210 nm
Injection volume	:	5 μl
Temperature	:	25°C

การเตรียมสารละลาย

Diluent	:	Acetonitrile : Water (60 : 40)
Standard preparation	:	

- ละลาย 10 mg Dihydroartemisinin References Standard ที่ชั่งมาถูกต้องด้วย diluents ใน volumetric flask ขนาด 10 ml นำไป sonicate ปรับปริมาตรด้วย diluents จนครบปริมาตร ให้มีความเข้มข้น 1.0 mg/ml

- ละลาย 10 mg Artemisinin References Standard ที่ซึ่งมาถูกต้องด้วย diluents ใน volumetric flask ขนาด 5 ml นำไป sonicate ปรับปริมาตรด้วย diluents จนครบปริมาตร ให้มีความเข้มข้น 2.0 mg/ml

- ปิเปตสารละลายทั้งสองมาสารละลายละ 200 μ l ผสมให้เข้ากัน

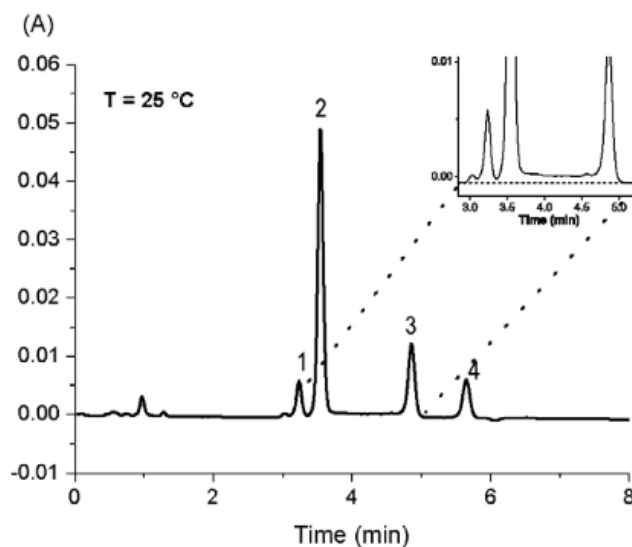
Assay preparation :

- ละลาย 10 mg Dihydroartemisinin ที่ซึ่งมาถูกต้องด้วย diluents ใน volumetric flask ขนาด 10 ml นำไป sonicate ปรับปริมาตรด้วย diluents จนครบปริมาตร ให้มีความเข้มข้น 1.0 mg/ml

- ละลาย 10 mg Artemisinin ที่ซึ่งมาถูกต้องด้วย diluents ใน volumetric flask ขนาด 5 ml นำไป sonicate ปรับปริมาตรด้วย diluents จนครบปริมาตร ให้มีความเข้มข้น 2.0 mg/ml

- ปิเปตสารละลายทั้งสองมาสารละลายละ 200 μ l ผสมให้เข้ากัน

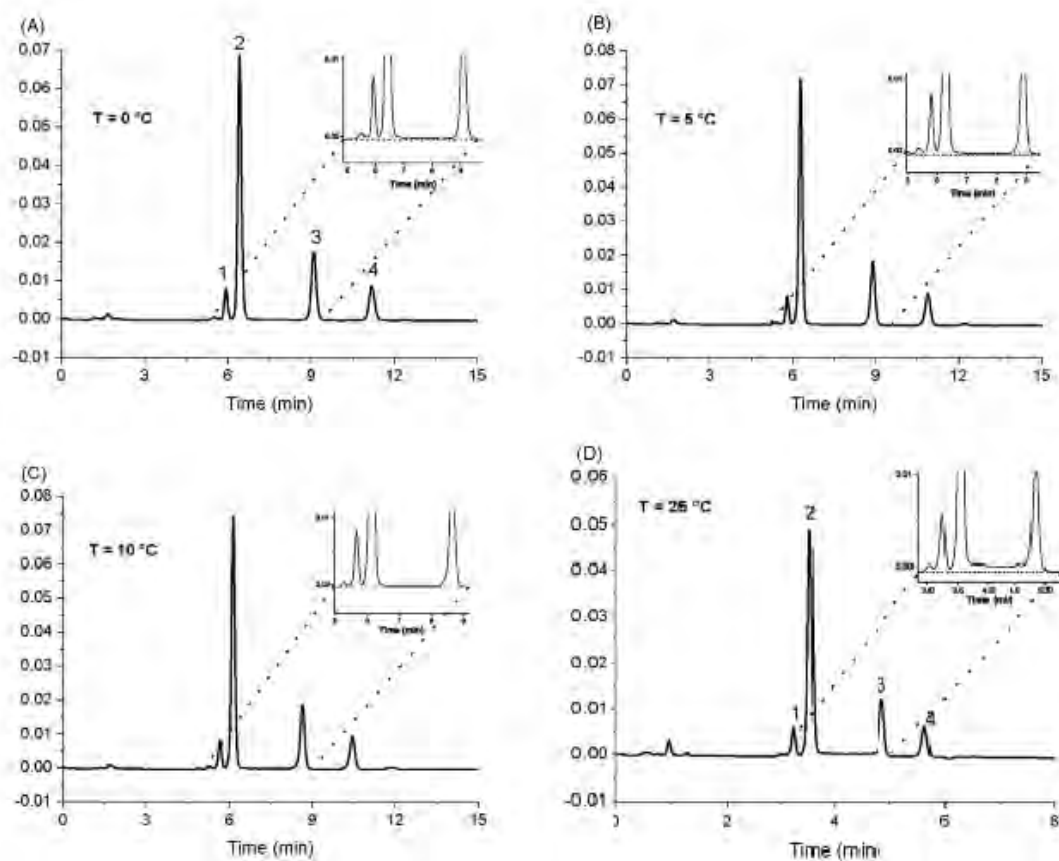
ผลการวิเคราะห์



รูปที่ 7 แสดงโครมาโทแกรมของ (1)Diketoaldehyde (2)2 α -dihydroartemisinin (3)2 β -dihydroartemisinin (4)Artemisinin เมื่อใช้ symmetry C18 column (4.6 \times 150 mm)

จากการทดลองพัฒนาวิธีวิเคราะห์ยา Dihydroartemisinin โดยการปรับเปลี่ยนชนิดของคอลัมน์และสถานะต่างๆของคอลัมน์ คือ ความยาวคอลัมน์ เส้นผ่านศูนย์กลางคอลัมน์ และขนาดอนุภาคภายในคอลัมน์ พบว่า คอลัมน์ชนิด symmetry C18 column ที่มีเส้นผ่านศูนย์กลาง 4.6 mm มีความยาว 150 mm และมีขนาดอนุภาคภายใน 3 μ m เป็นลักษณะของคอลัมน์ที่มีความเหมาะสมต่อการแยกสาร Artemisinin,

Dihydroartemisinin และ Diketoaldehyde (ซึ่งเป็นสารสลายชนิดหนึ่งของตัวยา Dihydroartemisinin) ออกจากกันได้ดี ดังรูปที่ 7 นอกจากนี้ จากการศึกษายังพบว่า อุณหภูมิคอลัมน์ขณะวิเคราะห์ก็ก็มีผลต่อการแยกของโครมาโทแกรมของสาร จึงได้มีการทดลองวิเคราะห์ยา Dihydroartemisinin ด้วยลักษณะของคอลัมน์ดังกล่าวภายใต้อุณหภูมิที่แตกต่างกัน คือ ที่ 0°C, 5 °C, 10 °C และ 25 °C ได้ผลการทดลองดังแสดงในรูปที่ 8



รูปที่ 8 แสดงการวิเคราะห์ยา Dihydroartemisinin ด้วย symmetry C18 column (4.6×150 mm, 3 μm) ที่อุณหภูมิต่างๆ (A)T=0°C (B) T=5 °C (C) T=10 °C และ (D) T=25 °C

จากการพิจารณาวิธีวิเคราะห์ตามบทความชื่อ On-column Epimerization of Dihydroartemisinin: An Effective Analytical Approach to Overcome the Shortcomings of The International Pharmacopoeia Monograph พบว่าเมื่อใช้ Chromatographic system ใกล้เคียงกับของ The International Pharmacopoeia Monograph 2011 แล้ว จะได้ลักษณะโครมาโทแกรมของยาเป็น 2 พีคหลัก (two-principle peak) ซึ่งมีส่วนที่เชื่อมต่อกัน ไม่สามารถแยกออกจากกันอย่างชัดเจน ทำให้เกิดข้อสงสัยในด้านความจำเพาะเจาะจงของวิธีวิเคราะห์ตาม The International Pharmacopoeia Monograph 2011 ว่าเป็นวิธีวิเคราะห์ที่มีความเหมาะสมและมีความจำเพาะเพียงพอต่อการวิเคราะห์หาปริมาณตัวยา Dihydroartemisinin หรือไม่เนื่องจากหากวิธี

วิเคราะห์มีความจำเพาะไม่เพียงพอ อาจทำให้การวิเคราะห์หาปริมาณด้วยยาสำคัญมีข้อผิดพลาดเกิดขึ้นได้
ดังนั้นจึงได้มีการศึกษาและประเมินถึงความจำเพาะของวิธีวิเคราะห์ด้วยยา Dihydroartemisinin ตาม The
International Pharmacopoeia Monograph 2011

บทที่ 3

วิธีดำเนินการวิจัย

3.1 เครื่องมือและอุปกรณ์

- High Performance Liquid Chromatography (HPLC) Shimadzu[®] รุ่น Nexera ซึ่งประกอบด้วย
 - Pump A: LC-30AD S/N L20554800208
 - Pump B: LC-30AD S/N L20554800211
 - Degasser: DGU-20A5 S/N L20244808284
 - Autosampler: SIL-30AC S/N L20564800083
 - Column Oven: CTO-20AC S/N L20214806626
 - Diode Array Detector: SPD-M20A S/N L20154806675
 - Communication Bus Module: CMB-20A S/N L20234811943
 - Software: LabSolutions Version 5.30 SP1

- High Performance Liquid Chromatography (HPLC) Shimadzu[®] รุ่น Prominence ซึ่งประกอบด้วย

- Pump A: LC-20AD S/N L20104613839
- Auto sampler: SIL-20A HT S/N L20344600681
- UV/Vis Detector: SPD-20A S/N L20134609588
- Software: LCSolution version 1.22 SP1
- Column (Shim-pack XR-ODS III) 2.2 μm 2.0 \times 150 mm S/N 00325043
- Column (Inertsil[®] ODS-3) 5.0 μm 4.6 \times 150 mm S/N OJI85109
- UV-VIS spectrophotometer (Evolution[®] 600)
 - Software: VisionPro[®] vision version 4.20 Math version 24.00
- Analytical Balance (Mettler Toledo Model XP26 DeltaRange[®]) S/N B121145711
- pH Meter (Beckman[®] PHI 50)
- Sonicator (Elma[®]) Elmasonic S60H
- Vacuum Pump

- Membrane Filter Nylon 47 mm, 0.2 μ m Lot.No. 00056547
- Syringe Filters Nylon 13 mm, 0.2 μ m Lot.No. 00056482
- Clear Vial PTFE/SIL (Fisherbrand[®]) 2 ml Cat.No. 03-391-15
- Weighing Paper (Whiteman[®]) 10×10 cm
- Laboratory Fume Hood: ProLab[®] Model 2000

3.2 สารเคมีและรีเอเจนต์

- Reference Standard or Working standard
 - Dihydroartemisinin TCI/JAPAN 1 g Lot.No. 56MTB-0L
 - Uracil 10 g Lot.No. D00132392
 - Propylbenzene 5 ml Lot.No. S6159421
 - Ethylbenzene 100 ml Lot.No. S6559772
- Acetonitrile (Berdick & Jackson[®]) ACS/HPLC Lot.No. 10071743
- Methanol (Berdick & Jackson[®]) ACS/HPLC Lot.No. 10071753
- Ultrapure[®] water
- Acetic acid (Merck[®]) JN 2789 Lot.No. 607002006
- Phosphoric acid (Univar[®]) JN 1805 Lot.No. AA341005
- Ammonium hydroxide (Univar[®]) Lot.No. 1336-21-6
- Concentrated Hydrochloric acid (Univar[®]) Lot.No. 7647-01-0
- Sodium hydroxide Lot.No. AF 510195

3.3 การศึกษา Stereodynamic ของยา Dihydroartemisinin

จากบทความที่ได้ศึกษามาพบว่า ยา Dihydroartemisinin จะสามารถกลับไปมาได้เป็น 2 รูปแบบ คือ Alpha และ Beta forms การศึกษานี้ทำเพื่อทดสอบดูว่าการที่ยาเกิดเป็น 2 รูปแบบได้นั้น เป็นลักษณะเฉพาะตัวของตัวยาหรือเกิดจากสถานะของเครื่อง HPLC ที่ใช้ในการฉีดสารละลายตัวยา ซึ่งทำการศึกษาโดยฉีดยา Dihydroartemisinin ความเข้มข้น 3 mg/ml ใน diluents เป็น Acetonitrile : Water อัตราส่วน 60 : 40 เข้าเครื่อง HPLC ปริมาณการฉีด (Injection Volume) เป็น 20 μ l ใช้ Mobile phase เป็น Acetonitrile : Water อัตราส่วน 60 : 40 แล้วเก็บ fraction ส่วนของพีคที่เป็น alpha form, beta form, บริเวณระหว่าง alpha และ

beta form และบริเวณหลัง beta form แล้วนำมาฉีดเข้าเครื่อง HPLC โดยใช้ปริมาตรการฉีด (Injection Volume) เป็น 60 μ l

การเตรียมสารละลายยา Dihydroartemisinin ความเข้มข้น 1 mg/ml

ชั่งยา Dihydroartemisinin 10 mg ใส่ลงใน Volumetric flask ขนาด 10 ml จากนั้นเปิด Acetonitrile 6 ml และ Ultrapure[®] water 4 ml ใส่ลงไป จะได้เป็นสารละลายยา Dihydroartemisinin ความเข้มข้น 1 mg/ml ใน Acetonitrile : Water อัตราส่วน 60 : 40

3.4 การศึกษาวิธีวิเคราะห์ Dihydroartemisinin และสารสลาย (Degraded products)

3.4.1 การศึกษาเพื่อกำหนดสถานะของ HPLC ที่เหมาะสมสำหรับการทำ stress test ของ Dihydroartemisinin

1) การเตรียม Mobile phase ที่เป็น Acetonitrile : Water อัตราส่วน 60 : 40

กรณีเครื่อง HPLC ที่มี 1 pump

1. ตวงน้ำ 400 ml โดยใช้กระบอکتวงขนาด 500 ml
2. เทน้ำที่ตวงได้จากข้อ 1 ใส่ Volumetric flask ขนาด 1000 ml
3. ใส่ Acetonitrile ลงไปจนครบ 1000 ml แล้วเขย่าผสมจนเข้ากัน
4. ปรับปริมาตรด้วย Acetonitrile ให้ครบ 1000 ml
5. นำไปกรองผ่านเครื่องกรองระบบ Vacuum โดยใช้ membrane filter ชนิด Nylon ขนาด 0.2 μ m โดยสารผสมที่กรองได้ในช่วง 20 ml แรกให้เททิ้งไป
6. นำสารผสมที่กรองได้ใส่ขวด Duran ปิดฝาให้สนิท แล้ว Label ระดับสารละลาย
7. นำขวด Duran ไปผ่านการ Sonicate เป็นเวลา 5-10 นาที

กรณีเครื่อง HPLC ที่มี 2 pump

1. นำน้ำไปกรองผ่านเครื่องกรองระบบ Vacuum โดยใช้ membrane filter ชนิด Nylon ขนาด 0.2 μ m โดยสารผสมที่กรองได้ในช่วง 20 ml แรกให้เททิ้งไป
2. นำน้ำที่กรองได้ใส่ในขวด Duran A ปิดฝาให้สนิท แล้ว Label ระดับน้ำ
3. นำ Acetonitrile ไปกรองผ่านเครื่องกรองระบบ Vacuum โดยใช้ membrane filter ชนิด Nylon ขนาด 0.2 μ m โดยสารผสมที่กรองได้ในช่วง 20 ml แรกให้เททิ้งไป
4. นำ Acetonitrile ที่กรองได้ใส่ขวด Duran B ปิดฝาให้สนิท แล้ว Label ระดับ Acetonitrile
5. นำขวด Duran ทั้งสองใบไปผ่านการ Sonicate เป็นเวลา 5-10 นาที

2) การศึกษาหาระบบบัฟเฟอร์และ pH ที่เหมาะสมของสารละลาย

หาระบบบัฟเฟอร์และส่วนประกอบของบัฟเฟอร์ที่เหมาะสม รวมทั้งหา pH ที่เหมาะสมของสารละลายยา Dihydroartemisinin ในสภาวะปกติ และในสภาวะที่ทำให้เกิดสารละลายของยา โดยจากการศึกษาได้ใช้ Phosphate Buffer Solution เป็นสารละลายบัฟเฟอร์ในระบบ

การเตรียมสารละลาย Phosphate Buffer Solution (pH 5.10, 52 mM)

1. ใส่น้ำ 300 ml ลงใน Volumetric flask ขนาด 500 ml
2. ปิเปต 85% Phosphoric acid ใส่วolumetric flask ข้อ 1 โดยใช้ Transferring pipette ขนาด 3 ml
3. ชั่ง NaOH มา 1 g โดยใช้กระดาษชั่ง และเครื่องชั่งที่ผ่านการสอบเทียบแล้ว
4. นำ NaOH ที่ชั่งใส่ลงใน Volumetric flask ข้อ 2 แล้วนำไป Sonicate จนละลายหมด
5. ปรับ pH ให้ได้ 5.10 ด้วย 0.2 N NaOH และปรับปริมาตรจนครบ 500 ml ด้วยน้ำ

การเตรียมสารละลาย Ammonium acetate Acetic acid Buffer (pH 4.80, 208.8 mM)

1. ใส่น้ำ 600 ml ลงใน Volumetric flask ขนาด 1000 ml
2. ปิเปต Glacial acetic acid ปริมาตร 12 ml ใส่วolumetric flask ข้อ 1 โดยใช้ Transferring pipette ขนาด 6 ml
3. ปิเปต ammonia ปริมาตร 6 ml ใส่วolumetric flask ข้อ 1 โดยใช้ Transferring pipette ขนาด 6 ml
4. ปรับ pH ให้ได้ 4.80 ด้วย 0.2 N ammonia และปรับปริมาตรจนครบ 1000 ml ด้วยน้ำ

การเตรียม Mobile phase ที่เป็น Acetonitrile : Phosphate buffer อัตราส่วน 60 : 40

กรณีเครื่อง HPLC ที่มี 1 pump

1. ตวง 52 mM Phosphate buffer 400 ml โดยใช้กระบอบอกตวงขนาด 500 ml
2. เทบัฟเฟอร์ที่ตวงได้จากข้อ 1 ใส่วolumetric flask ขนาด 1000 ml
3. ใส่ว Acetonitrile ลงไปจนครบ 1000 ml แล้วเขย่าผสมจนเข้ากัน
4. ปรับปริมาตรด้วย Acetonitrile ให้ครบ 1000 ml
5. นำไปกรองผ่านเครื่องกรองระบบ Vacuum โดยใช้ membrane filter ชนิด Nylon ขนาด 0.2 μm โดยสารผสมที่กรองได้ในช่วง 20 ml แรกให้เททิ้งไป

6. นำสารผสมที่กรองได้ใส่ขวด Duran ปิดฝาให้สนิท แล้ว Label ระดับสารละลาย

7. นำขวด Duran ไปผ่านการ Sonicare เป็นเวลา 5-10 นาที

กรณีเครื่อง HPLC ที่มี 2 pump

1. นำ 52 mM Phosphate buffer ไปกรองผ่านเครื่องกรองระบบ Vacuum โดยใช้ membrane filter ชนิด Nylon ขนาด 0.2 μm โดยสารผสมที่กรองได้ในช่วง 20 ml แรกให้เททิ้งไป

2. นำ 52 mM Phosphate buffer ที่กรองได้ใส่ในขวด Duran A ปิดฝาให้สนิท แล้ว Label ระดับ Phosphate buffer

3. นำ Acetonitrile ไปกรองผ่านเครื่องกรองระบบ Vacuum โดยใช้ membrane filter ชนิด Nylon ขนาด 0.2 μm โดยสารผสมที่กรองได้ในช่วง 20 ml แรกให้เททิ้งไป

4. นำ Acetonitrile ที่กรองได้ใส่ขวด Duran B ปิดฝาให้สนิท แล้ว Label ระดับ Acetonitrile

5. นำขวด Duran ทั้งสองใบไปผ่านการ Sonicare เป็นเวลา 5-10 นาที

การเตรียม Mobile phase ที่เป็น Acetonitrile : Ammonium-acetate-acetic acid buffer

อัตราส่วน 60 : 40

กรณีเครื่อง HPLC ที่มี 1 pump

1. ตวง 208.8 mM Ammonium acetate Acetic acid Buffer 400 ml โดยใช้กระบอกตวง ขนาด 500 ml

2. เทบัฟเฟอร์ที่ตวงได้จากข้อ 1 ใส่ Volumetric flask ขนาด 1000 ml

3. ใส่ Acetonitrile ลงไปจนครบ 1000 ml แล้วเขย่าผสมจนเข้ากัน

4. ปรับปริมาตรด้วย Acetonitrile ให้ครบ 1000 ml

5. นำไปกรองผ่านเครื่องกรองระบบ Vacuum โดยใช้ membrane filter ชนิด Nylon ขนาด 0.2 μm โดยสารผสมที่กรองได้ในช่วง 20 ml แรกให้เททิ้งไป

6. นำสารผสมที่กรองได้ใส่ขวด Duran ปิดฝาให้สนิท แล้ว Label ระดับสารละลาย

7. นำขวด Duran ไปผ่านการ Sonicare เป็นเวลา 5-10 นาที

กรณีเครื่อง HPLC ที่มี 2 pump

1. นำ 208.8 mM Ammonium acetate Acetic acid Buffer ไปกรองผ่านเครื่องกรองระบบ Vacuum โดยใช้ membrane filter ชนิด Nylon ขนาด 0.2 μm โดยสารผสมที่กรองได้ในช่วง 20 ml แรกให้เท

ทิ้งไป

2. นำ 208.8 mM Ammonium acetate Acetic acid Buffer ที่กรองได้ใส่ในขวด Duran A ปิดฝาให้สนิท แล้ว Label ระดับ Phosphate buffer

3. นำ Acetonitrile ไปกรองผ่านเครื่องกรองระบบ Vacuum โดยใช้ membrane filter ชนิด Nylon ขนาด 0.2 μm โดยสารผสมที่กรองได้ในช่วง 20 ml แรกให้เททิ้งไป

4. นำ Acetonitrile ที่กรองได้ใส่ขวด Duran B ปิดฝาให้สนิท แล้ว Label ระดับ Acetonitrile

5. นำขวด Duran ทั้งสองใบไปผ่านการ Sonicate เป็นเวลา 5-10 นาที

3.4.2 การศึกษาสถานะที่ทำให้เกิดสารละลายของยา Dihydroartemisinin

1) การเตรียม Stock solution ของยา Dihydroartemisinin ความเข้มข้น 5 mg/ml

เตรียมสารละลายในสถานะป้องกันแสง โดยชั่ง Dihydroartemisinin 50 mg ใส่ลงใน Volumetric flask ขนาด 10 ml ละลายและปรับปริมาตรด้วย Acetonitrile จนครบ 10 ml

2) การเตรียมสารละลายยา Dihydroartemisinin ความเข้มข้น 1 mg/ml ในสถานะปกติสำหรับฉีด HPLC

ปิเปตสารละลาย Stock solution ของยา Dihydroartemisinin มา 2 ml ใส่ลงใน Volumetric flask ขนาด 10 ml จากนั้นปิเปต Acetonitrile 4 ml และ Ultrapure[®] water 4 ml ใส่ลงไป จะได้สารละลายยา Dihydroartemisinin ความเข้มข้น 1 mg/ml ใน Acetonitrile : Water อัตราส่วน 60 : 40

3) การสลายของยา Dihydroartemisinin ภายใต้สภาวะกรด

การเตรียมสารละลาย 0.2 N HCl

1. ใส่น้ำ 60 ml ลงใน Volumetric Flask ขนาด 100 ml

2. ปิเปต Concentrated Hydrochloric acid 2 ml โดยใช้ Transferring Pipette ใส่ลงใน Volumetric Flask ในข้อ 1

3. ปรับปริมาตรด้วยน้ำจนครบ 100 ml จะได้สารละลาย 0.2 N HCl

การเตรียมสารละลาย Blank Acid-Stress 14 hr [ความเข้มข้น 1.0 mg/ml ใน Mobile Phase]

1. ปิเปต Acetonitrile 2 ml ใส่ลงใน Volumetric flask ขนาด 10 ml โดยใช้ Transferring Pipette

2. ปิเปต 0.2 N HCl 1 ml โดยใช้ Transferring Pipette ผสมจนเข้ากัน และเริ่มจับเวลา

3. ปิด Volumetric flask ห่อฟอยล์ และ Parafilm เพื่อป้องกันการระเหยและแสงแดด และ

เก็บในที่ควบคุมอุณหภูมิที่ 25 องศาเซลเซียส

4. เมื่อเวลาผ่านไป 14 ชั่วโมง ให้แกะฟอยล์ออก
5. ปิเปิด Phosphate Buffer Solution (pH 5.10, 52mM) 2 ml โดยใช้ Transferring Pipette
6. ปิเปิด 0.2 N NaOH 1 ml โดยใช้ Transferring Pipette
7. ปรับปริมาตรด้วย Acetonitrile จนได้ปริมาตรครบ 10 ml ผสมจนเข้ากัน และนำไปวัด

pH ด้วย pH meter

8. กรองสารละลายที่ได้ผ่านหัวกรอง Syringe ใสลงใน Vial

การเตรียมสารละลายยา Dihydroartemisinin Acid-Stress 14 hr [ความเข้มข้น 1.0 mg/ml ใน

Mobile Phase]

1. ปิเปิด Dihydroartemisinin Stock Solution 2 ml ใสลงใน Volumetric flask ขนาด 10 ml
2. ปิเปิด 0.2 N HCl 1 ml โดยใช้ Transferring Pipette ผสมจนเข้ากัน และเริ่มจับเวลา
3. ปิด Volumetric flask ห่อฟอยล์ และ Parafilm เพื่อป้องกันการระเหยและแสงแดด และ

เก็บในที่ควบคุมอุณหภูมิที่ 25 องศาเซลเซียส

4. เมื่อเวลาผ่านไป 14 ชั่วโมง ให้แกะฟอยล์ออก
5. ปิเปิด Phosphate Buffer Solution (pH 5.10, 52mM) 2 ml โดยใช้ Transferring Pipette
6. ปิเปิด 0.2 N NaOH 1 ml โดยใช้ Transferring Pipette
7. ปรับปริมาตรด้วย Acetonitrile จนได้ปริมาตรครบ 10 ml ผสมจนเข้ากัน และนำไปวัด

pH ด้วย pH meter

8. กรองสารละลายที่ได้ผ่านหัวกรอง Syringe ใสลงใน Vial

4) การสลายของยา Dihydroartemisinin ภายใต้สภาวะต่าง

การเตรียมสารละลาย 0.2 N NaOH

1. ใส่น้ำ 60 ml ลงใน Volumetric flask ขนาด 100 ml
2. ชั่ง NaOH 0.8 g โดยใช้กระดาษชั่ง และเครื่องชั่งที่ผ่านการสอบเทียบแล้ว
3. นำ NaOH ที่ชั่งใส่ลงใน Volumetric flask ข้อ 1 แล้วนำไป Sonicate จนละลายหมด
4. ปรับปริมาตรด้วยน้ำจนครบ 100 ml แล้วเทใส่ภาชนะพลาสติก จะได้สารละลาย 0.2 N NaOH

การเตรียมสารละลาย Blank Base-Stress 1 hr [ความเข้มข้น 1.0 mg/ml ใน Mobile Phase]

1. ปิเปต Acetonitrile 2 ml ใสลงใน Volumetric Flask ขนาด 10 ml โดยใช้ Transferring Pipette
2. ปิเปต 0.2 N NaOH 1 ml โดยใช้ Transferring Pipette ผสมจนเข้ากัน และเริ่มจับเวลา
3. ปิด Volumetric flask ห่อฟอยล์ และ Parafilm เพื่อป้องกันการระเหยและแสงแดด และเก็บในที่ควบคุมอุณหภูมิที่ 25 องศาเซลเซียส
4. เมื่อเวลาผ่านไป 1 ชั่วโมง ให้แกะฟอยล์ออก
5. ปิเปต Phosphate Buffer Solution (pH 5.10, 52mM) 2 ml โดยใช้ Transferring Pipette
6. ปิเปต 0.2 N HCl 1 ml โดยใช้ Transferring Pipette
7. ปรับปริมาตรด้วย Acetonitrile จนได้ปริมาตรครบ 10 ml ผสมจนเข้ากัน และนำไปวัด pH ด้วย pH meter

8. กรองสารละลายที่ได้ผ่านหัวกรอง Syringe ใสลงใน Vial

การเตรียมสารละลาย Dihydroartemisinin Base-Stress 1 hr [ความเข้มข้น 1.0 mg/ml ใน Mobile Phase]

1. ปิเปต Dihydroartemisinin Stock Solution 2 ml ใสลงใน Volumetric flask ขนาด 10 ml โดยใช้ Transferring Pipette
2. ปิเปต 0.2 N NaOH 1 ml โดยใช้ Transferring Pipette ผสมจนเข้ากัน และเริ่มจับเวลา
3. ปิด Volumetric flask ห่อฟอยล์ และ Parafilm เพื่อป้องกันการระเหยและแสงแดด และเก็บในที่ควบคุมอุณหภูมิที่ 25 องศาเซลเซียส
4. เมื่อเวลาผ่านไป 1 ชั่วโมง ให้แกะฟอยล์ออก
5. ปิเปต Phosphate Buffer Solution (pH 5.10, 52mM) 2 ml โดยใช้ Transferring Pipette
6. ปิเปต 0.2 N HCl 1 ml โดยใช้ Transferring Pipette
7. ปรับปริมาตรด้วย Acetonitrile จนได้ปริมาตรครบ 10 ml ผสมจนเข้ากัน และนำไปวัด pH ด้วย pH meter

8. กรองสารละลายที่ได้ผ่านหัวกรอง Syringe ใสลงใน Vial

3.4.3 คุณลักษณะของ peak profile ที่เหมาะสม^[8]

- Peak Purity Index	:	≥ 0.99
- Resolution	:	> 2
- Tailing factor	:	≤ 2
- %RSD	:	< 2

3.5 การทดสอบความคงตัวของยา Dihydroartemisinin ในสารละลายที่เป็น Acetonitrile : Water (60 : 40)

ในการทดลองได้นำสารละลาย Dihydroartemisinin ความเข้มข้น 1 mg/ml ใน Acetonitrile : Water อัตราส่วน 60 : 40 ซึ่งเป็นตัวทำละลายตามที่กำหนดใน The International Pharmacopoeia Monograph 2011 Method A ผ่านการวิเคราะห์โดยใช้ Reverse Phase High Performance Liquid Chromatography ซึ่งมีรายละเอียดดังนี้

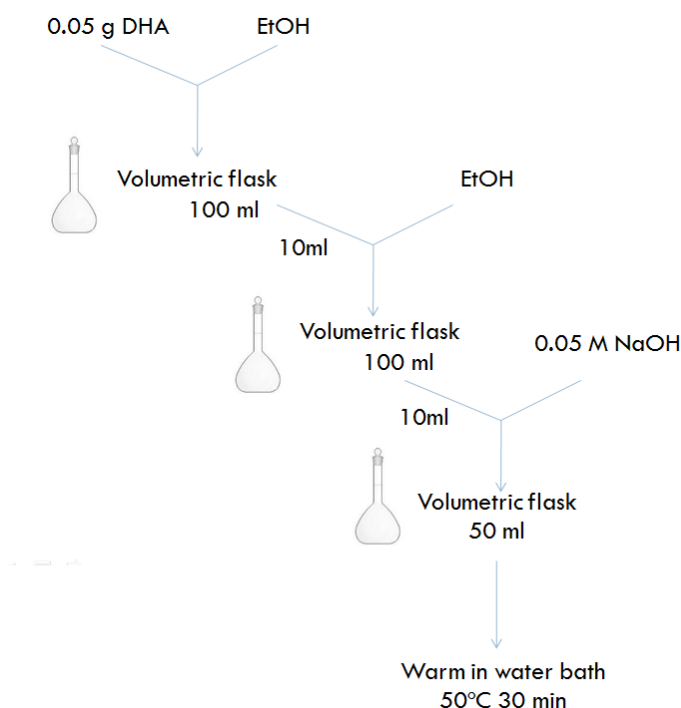
Stationary phase	:	Inertsil [®] ODS-3 C18 (4.6×150 mm), 5.0 μm
Mobile phase	:	Acetonitrile : Water (60 : 40)
Flow rate	:	0.6 ml/min
UV detector	:	216 nm
Injection volume	:	20 μl

โดยการวิเคราะห์จะทำการฉีดสารละลายทั้งหมด 18 ครั้ง ซึ่งแบ่งออกเป็น 6 ชุด ชุดละ 3 ครั้ง ซึ่งแต่ละชุดจะคั่นด้วย Blank ชุดละ 3 ครั้ง ดังนั้นเข็มแรกของแต่ละชุดจะใช้เวลาห่างกัน 3 ชั่วโมง (แต่ละเข็มใช้เวลา 30 นาที)

3.6 การวิเคราะห์โดยใช้ UV-Visible Spectrophotometer ตาม The International Pharmacopoeia

Monograph 2011 Method B

วิธีวิเคราะห์หาปริมาณ Dihydroartemisinin ตาม The International Pharmacopoeia Monograph 2011 Method B มีวิธีดังนี้



รูปที่ 9 แสดงขั้นตอนการเตรียมสารละลายเพื่อทำการวิเคราะห์หาปริมาณของ Dihydroartemisinin

ตาม The International Pharmacopoeia Monograph 2011 Method B

การเตรียมสารละลายตัวอย่างและสารละลายมาตรฐาน (ตามรูปที่ 9)

1. ชั่งสารตัวอย่าง Dihydroartemisinin มา 0.05 g (50 mg)
2. นำสารตัวอย่างที่ชั่งมาละลายด้วย Ethanol ใน Volumetric flask ขนาด 100 ml จนตัวยาละลายหมด แล้วปรับปริมาตรด้วย Ethanol จนครบ 100 ml จะได้สารละลาย Dihydroartemisinin ความเข้มข้น 0.5 mg/ml ใน Ethanol
3. ปิเปตสารละลายในข้อ 2 มา 10 ml โดยใช้ Transferring pipette ขนาด 10 ml ลงใน Volumetric flask ขนาด 100 ml
4. เจือจางสารละลายที่ปิเปตมาด้วย Ethanol จนครบ 100 ml จะได้สารละลาย Dihydroartemisinin

ความเข้มข้น 0.05 mg/ml ใน Ethanol

5. เตรียมสารละลาย 0.05 N NaOH โดย

- 1) ชั่ง NaOH มา 0.5 g ใส่ลงใน Volumetric flask ขนาด 250 ml
- 2) เติมน้ำเพื่อละลาย NaOH จนละลายหมด
- 3) ปรับปริมาตรด้วยน้ำจนครบ 250 ml
- 4) เทสารละลายเก็บในภาชนะพลาสติก

6. ปิ่เปตสารละลาย Dihydroartemisinin ความเข้มข้น 0.05 mg/ml ใน Ethanol ในข้อ 4 มา 10 ml โดยใช้ Transferring pipette ขนาด 10 ml ลงใน Volumetric flask ขนาด 50 ml

7. เจือจางสารละลาย Dihydroartemisinin ในข้อ 6 ด้วย 0.05 N NaOH จนละลายเข้ากัน และปรับปริมาตรด้วย 0.05 N NaOH จนครบ 50 ml จะได้สารละลาย Dihydroartemisinin ความเข้มข้น 0.01 mg/ml ใน Ethanol : 0.05 N NaOH (1:4)

8. ให้ความร้อนสารละลายข้อ 7 ที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที

9. นำสารละลายในข้อ 8 ไปวัดการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 292 นาโนเมตร โดยใช้เครื่อง UV-Vis-Spectrophotometer และเทียบปริมาณสารที่วิเคราะห์ได้กับสารมาตรฐานที่ผ่านวิธีการเดียวกัน

การเตรียมสารละลาย Blank

1. ปิ่เปต Ethanol มา 10 ml โดยใช้ Transferring pipette ขนาด 10 ml ลงใน Volumetric flask ขนาด 50 ml

2. ผสมสารละลายข้อ 1 ด้วย 0.05 N NaOH จนละลายเข้ากัน และปรับปริมาตรด้วย 0.05 N NaOH จนครบ 50 ml จะได้สารผสม Ethanol : 0.05 N NaOH (1:4)

3. ให้ความร้อนสารละลายข้อ 2 ที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที

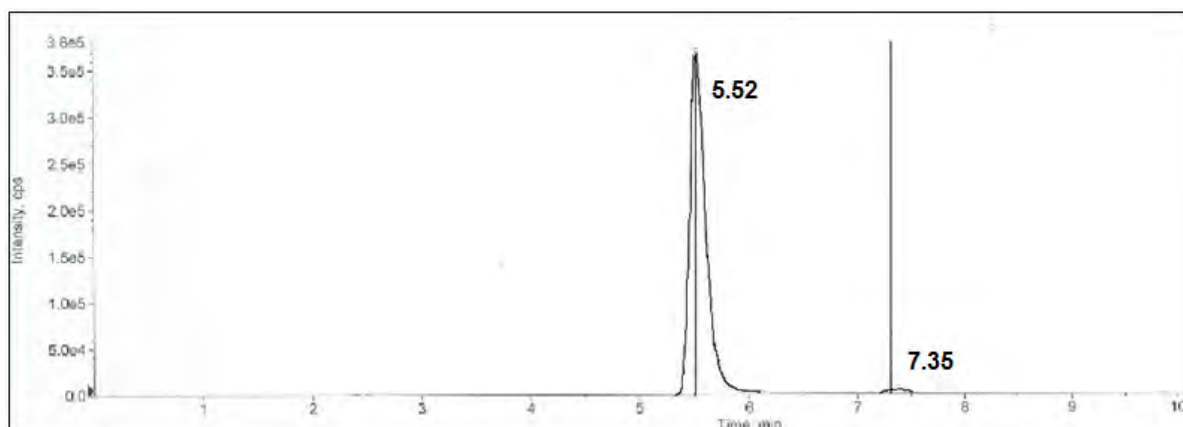
บทที่ 4

ผลการวิจัยและอภิปรายผล

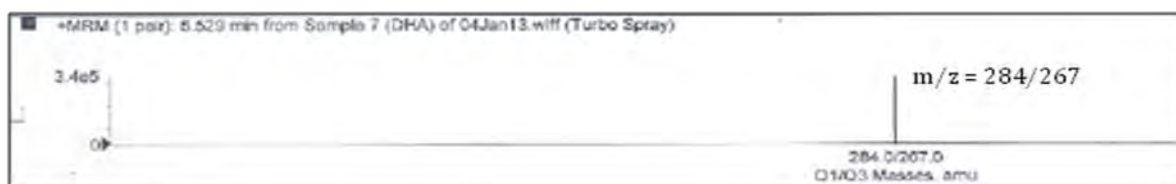
4.1 การศึกษา two-principle peak โดยใช้ Mass spectrometer

ในการวิเคราะห์หาปริมาณของ Dihydroartemisinin จะได้ลักษณะโครมาโทแกรมที่เป็น Two-principle peak จึงต้องทำให้มั่นใจก่อนว่า peak หลักทั้งสองเป็นพีคของตัวยาจริง โดยในการศึกษาครั้งนี้จะใช้เครื่อง Liquid Chromatography-Mass Spectrometry ซึ่งสามารถบอกได้ว่าสารที่ให้พีคในโครมาโทแกรมใน Retention time หนึ่งๆ มี Mass to Charge Ratio (m/z) เท่าใด แต่อย่างไรก็ตาม Liquid Chromatography-Mass Spectrometry ไม่สามารถใช้ศึกษาคุณสมบัติการเกิด Epimerization ของตัวยาได้

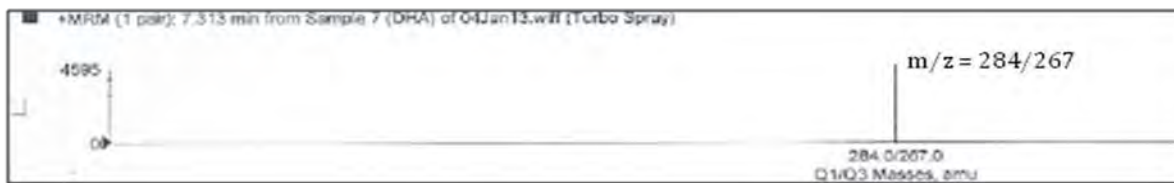
ผลจากการวิเคราะห์โดยใช้วิธี Liquid Chromatography-Mass Spectrometry ได้ผลดังรูปที่ 10, 11 และ 12 ตามลำดับ



รูปที่ 10 แสดง chromatogram ของ Dihydroartemisinin

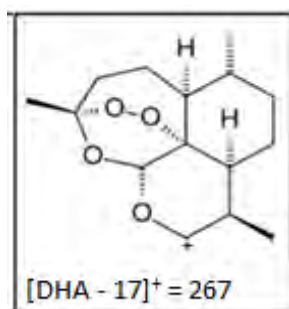


รูปที่ 11 แสดง mass spectrum ของ peak หลัก peak แรกของ chromatogram รูปที่ 10



รูปที่ 12 แสดง mass spectrum ของ peak หลัก peak ที่สองของ chromatogram รูปที่ 10

จากรูปที่ 10 จะพบว่ามี peak ขึ้นมาที่นาที่ที่ 5.52 และ 7.35 ซึ่งแต่ละ Peak จะให้ mass spectrum ในรูปที่ 11 และ 12 ตามลำดับ จะเห็นได้ว่า mass spectrum ที่ได้จากทั้งสอง peak จะแสดง Mass to Charge Ratio เหมือนกันทั้งสอง peak คือที่ 267 และ 284 ซึ่ง 284 เป็นมวลโมเลกุลของตัวยา Dihydroartemisinin ส่วน 267 จะเป็นมวลโมเลกุลของสารในรูปที่ 13 ซึ่งเป็นโครงสร้างที่เกิดจากการตัด hydroxyl group ออกจาก Dihydroartemisinin จึงมีมวลโมเลกุลน้อยกว่า Dihydroartemisinin 17 ($[DHA-17]^+$)



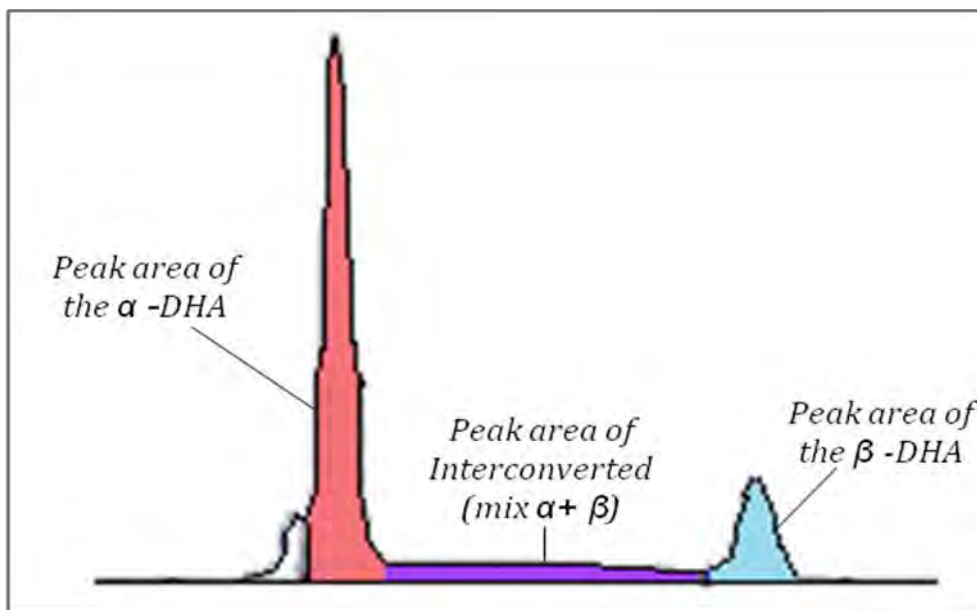
รูปที่ 13 แสดง โครงสร้างของ $[DHA-17]^+$

จากผลการทำศึกษาโดย Liquid Chromatography-Mass Spectrometry สรุปได้ว่าพีคหลักทั้งสองพีคที่เกิดขึ้นใน chromatogram เป็นพีคของตัวยา Dihydroartemisinin ซึ่งมีคุณสมบัติที่ทำให้เกิด Epimerization ส่งผลให้ตัวยามี 2 form คือ Alpha form และ Beta form แต่อย่างไรก็ตามการศึกษาโดยใช้ Liquid Chromatography-Mass Spectrometry ไม่สามารถระบุได้ว่า peak ที่เกิดขึ้น peak ไคเป็น peak ของ Alpha form หรือ Beta form

จากภาพ 14 ซึ่งในการคำนวณหาปริมาณยาจะทำได้โดยนำพื้นที่ใต้พีคมาทำการคำนวณ ซึ่งพื้นที่ที่นำมาใช้คำนวณจะเป็นผลรวมของส่วนต่างๆ 3 ส่วนคือ

- ส่วนของ Alpha peak (พื้นที่สีชมพู)
- ส่วนของ Beta peak (พื้นที่สีฟ้า)

- ส่วนที่มีการ interconvert ของ Alpha และ Beta (พื้นที่สีม่วง)

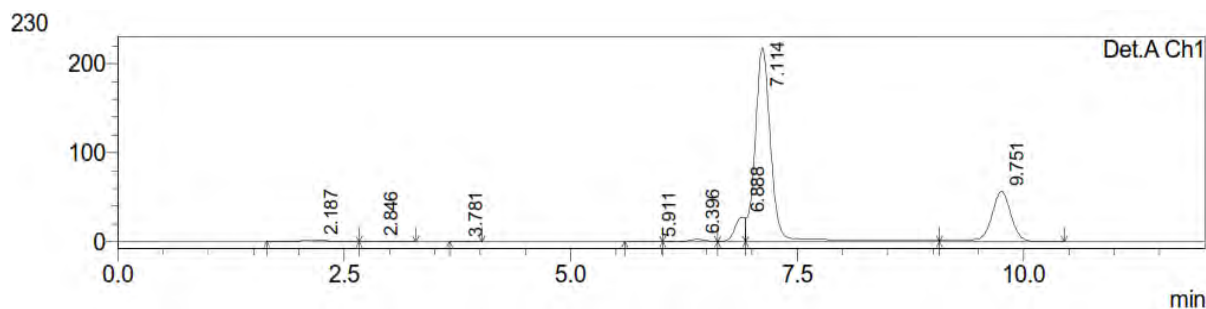


รูปที่ 14 แสดงพื้นที่ใต้พีคที่มีลักษณะของพีคเป็น two-principle peak ของ DHA

ดังนั้นในกรณีที่ว่ายา Dihydroartemisinin เกิดการเสื่อมสลายได้สารที่มี Retention time อยู่ในระหว่างพีคหลักสองพีค (อยู่ในส่วนที่มีการ interconvert ของ Alpha และ Beta) การวิเคราะห์หาปริมาณยาที่จะวิเคราะห์พื้นที่ของสารเสื่อมสลายที่ไม่มีฤทธิ์ทางยารวมกับพื้นที่ของยา จึงทำให้เกิดความผิดพลาดจากการวิเคราะห์โดยวิธีนี้ได้ ดังนั้นจึงทำการศึกษาการ Stereodynamic ของยา Dihydroartemisinin เพื่อดูผลของการเกิด epimerization ที่มีต่อการวิเคราะห์หาปริมาณตามวิธีของ The International Pharmacopeia 2011 method B ในหัวข้อที่ 4.2

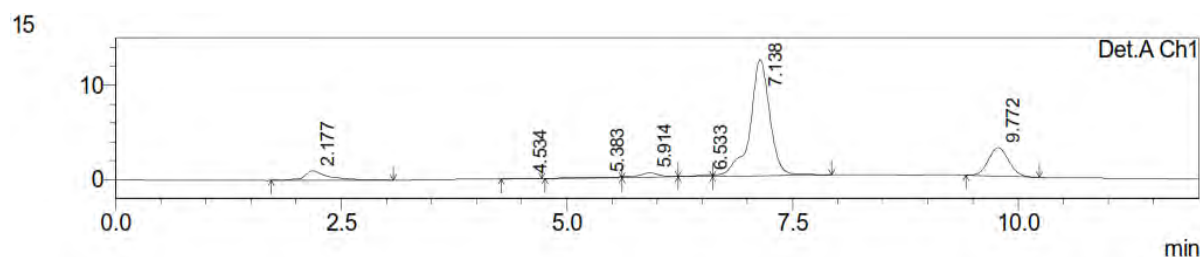
4.2 การศึกษา Stereodynamic ของยา Dihydroartemisinin

จากการฉีดสารละลายยา Dihydroartemisinin ความเข้มข้น 3 mg/ml 20 μ l พบว่าได้โครมาโทแกรมดังรูปที่ 15 ซึ่งจะเห็นว่าพีคของ Alpha form ออกมาที่นาฬิกาที่ 7.114 และพีคของ Beta form ออกมาที่นาฬิกาที่ 9.751



รูปที่ 15 แสดง โครมาโทแกรมของสารละลายยา Dihydroartemisinin ความเข้มข้น 3 mg/ml

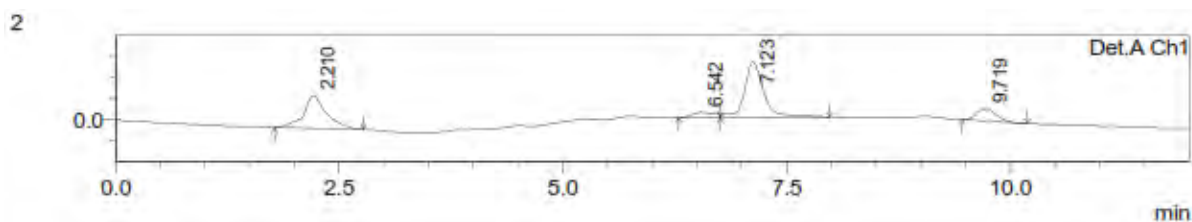
จากการทดลองฉีด fraction ของยา Dihydroartemisinin ที่เก็บจากการฉีดสารละลายยา Dihydroartemisinin ความเข้มข้น 3 mg/ml ในช่วงของพีคหลักพีคแรก (Alpha form) คือประมาณช่วงเวลาที่ 7.0 ถึง 7.9 โดยฉีดเข้าเครื่อง HPLC 60 μ l พบว่าได้โครมาโทแกรมดังรูปที่ 16



รูปที่ 16 แสดง โครมาโทแกรมของ fraction ที่เก็บได้จากสารละลายยา Dihydroartemisinin ความเข้มข้น 3 mg/ml บริเวณ Alpha form

จากโครมาโทแกรม พบว่ายังคงเห็นพีคของทั้ง Alpha และ Beta form ออกมาที่ Retention time เฉลี่ยเป็น 7.138 และเวลาที่ 9.771 ตามลำดับ ซึ่งใกล้เคียงกับ Retention time ของพีคของ Alpha และ Beta form ที่ได้จากการฉีดสารละลายยา Dihydroartemisinin ความเข้มข้น 3 mg/ml

จากนั้นได้ทำการทดลองฉีด fraction ของยา Dihydroartemisinin ที่เก็บจากการฉีดสารละลายยา Dihydroartemisinin ความเข้มข้น 3 mg/ml ในช่วงระหว่างพีคหลัก 2 พีค (ส่วนที่ Alpha และ Beta มีการ interconvert กัน) คือประมาณช่วงเวลาที่ 8.0 ถึง 8.9 โดยฉีดเข้าเครื่อง HPLC 60 μ l พบว่าได้โครมาโทแกรม ดังรูปที่ 17

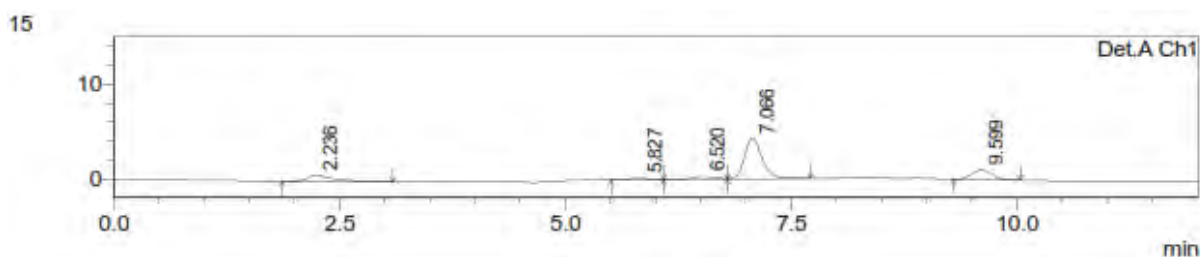


รูปที่ 17 แสดงโครมาโทแกรมของ fraction ที่เก็บได้จากสารละลายยา Dihydroartemisinin

ความเข้มข้น 3 mg/ml บริเวณระหว่าง Alpha และ Beta form

จากโครมาโทแกรม พบว่ายังคงเห็นพีคของทั้ง Alpha และ Beta form ออกมาที่ Retention time เฉลี่ยเป็น 7.121 และเวลาที่ 9.715 ตามลำดับ ซึ่งใกล้เคียงกับ Retention time ของพีคของ Alpha และ Beta form ที่ได้จากการฉีดสารละลายยา Dihydroartemisinin ความเข้มข้น 3 mg/ml

ต่อจากนั้น ได้ทำการทดลองฉีด fraction ของยา Dihydroartemisinin ที่เก็บจากการฉีดสารละลายยา Dihydroartemisinin ความเข้มข้น 3 mg/ml ในช่วงพีคหลักพีคที่สอง (Beta form) คือประมาณช่วงเวลาที่ 9.5 ถึง 10.4 โดยฉีดเข้าเครื่อง HPLC 60 μ l พบว่าได้โครมาโทแกรมดังรูปที่ 18

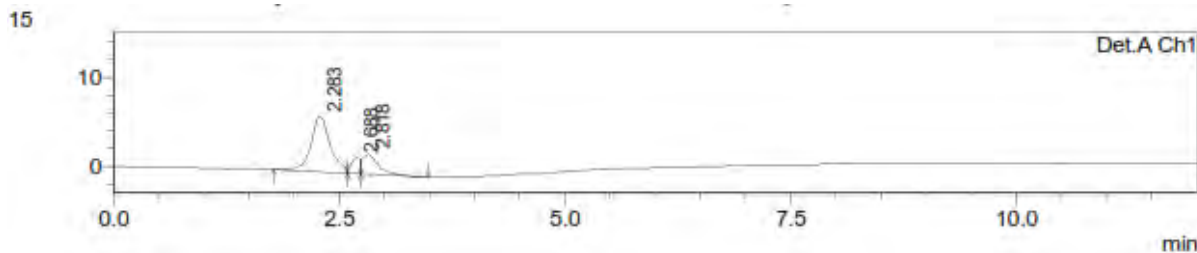


รูปที่ 18 แสดงโครมาโทแกรมของ fraction ที่เก็บได้จากสารละลายยา Dihydroartemisinin

ความเข้มข้น 3 mg/ml บริเวณ Beta form

จากโครมาโทแกรมของ fraction ที่เก็บได้จากสารละลายยา Dihydroartemisinin ความเข้มข้น 3 mg/ml บริเวณ Beta form พบว่ายังคงเห็นพีคของทั้ง Alpha และ Beta form ออกมาที่ Retention time เฉลี่ย เป็น 7.063 และเวลาที่ 9.591 ตามลำดับ ซึ่งใกล้เคียงกับ Retention time ของพีคของ Alpha และ Beta form ที่ได้จากการฉีดสารละลายยา Dihydroartemisinin ความเข้มข้น 3 mg/ml

และสุดท้ายได้ทำการทดลองฉีด fraction ของยา Dihydroartemisinin ที่เก็บจากการฉีดสารละลายยา Dihydroartemisinin ความเข้มข้น 3 mg/ml ในช่วงหลังจากพีคหลักทั้ง 2 พีค คือประมาณช่วงเวลาที่ 10.9 เป็นต้นไป โดยฉีดเข้าเครื่อง HPLC 60 μ l พบว่าได้โครมาโทแกรมดังรูปที่ 19



รูปที่ 19 แสดงโครมาโทแกรมของ fraction ที่เก็บได้จากสารละลายยา Dihydroartemisinin ความเข้มข้น 3 mg/ml บริเวณหลังจาก Alpha และ Beta form

จากโครมาโทแกรมของ fraction ที่เก็บได้จากสารละลายยา Dihydroartemisinin ความเข้มข้น 3 mg/ml บริเวณหลังจาก Alpha และ Beta form พบว่าไม่เห็นพีคที่ประมาณเวลาที่ 7.1 และ 9.7 แล้ว ซึ่งเป็น Retention time โดยประมาณของ Alpha และ Beta form ที่ได้จากการฉีดสารละลายยา Dihydroartemisinin ความเข้มข้น 3 mg/ml

จากผลการฉีด fraction ทั้งหมด จึงสรุปได้ว่าการที่ตัวยา Dihydroartemisinin สามารถเกิดเป็น 2 รูปแบบคือ Alpha และ Beta form ได้นั้น เป็นลักษณะเฉพาะตัวของตัวยา ที่สามารถเกิด Epimerization ได้ เป็น 2 form คือ Alpha และ Beta form

4.3 การศึกษาหาระบบบัฟเฟอร์และ pH ที่เหมาะสมของสารละลาย

ในการศึกษานี้ เป็นการศึกษาหาระบบบัฟเฟอร์และ pH ที่เหมาะสมของสารละลาย โดยในการเลือกใช้บัฟเฟอร์นั้น มีข้อควรพิจารณาดังนี้

1. สามารถคุมค่า pH ของสารละลายให้อยู่ในช่วงที่คอลัมน์ทนได้
2. สารในบัฟเฟอร์ควรมีค่า UV Cutoff ต่ำกว่าความยาวคลื่นที่ใช้ในการวิเคราะห์
3. สารในบัฟเฟอร์จะต้องไม่ทำปฏิกิริยากับสารที่วิเคราะห์

1. สามารถคุมค่า pH ของสารละลายให้อยู่ในช่วงที่คอลัมน์ทนได้

ในการวิเคราะห์โดย HPLC นั้น Stationary phase ถือเป็นส่วนที่สำคัญมากส่วนหนึ่ง ดังนั้น สารละลายที่ใช้จึงต้องเป็นสารละลายที่ไม่ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลง Stationary phase ในคอลัมน์ ซึ่งในใบ Certificate of Analysis ของคอลัมน์จะระบุรายละเอียดต่างๆ ของคอลัมน์ รวมถึงช่วง pH ของสารละลายที่คอลัมน์สามารถทนได้

ในการวิจัยครั้งนี้ได้ใช้คอลัมน์ที่สามารถทนค่า pH ของสารละลายได้ในช่วง 2.0 ถึง 7.5 ดังนั้นบัฟเฟอร์ที่ใช้จะต้องสามารถคุม pH ของสารละลายให้ได้ในช่วงดังกล่าว ซึ่งได้เลือกบัฟเฟอร์มาใช้สองชนิดคือ

1) Ammonium acetate-acetic acid Buffer (pKa =4.8)

เนื่องจากค่า pH ของบัฟเฟอร์ที่จะให้ pH efficacy สูงสุดคือที่ pH เท่ากับค่า pKa ดังนั้นจึงใช้สารละลายบัฟเฟอร์ที่มีค่า pH = 4.80 และจะเลือกความเข้มข้นที่ต่ำที่สุดที่สามารถควบคุม pH ได้ ซึ่งสามารถทดสอบโดยการวัด pH ของสารละลายที่ใช้บัฟเฟอร์ความเข้มข้นต่างๆ ผลของค่า pH เป็นดังที่แสดงในตารางที่ 2

	10 mM	20 mM	40 mM
Blank*	6.02	5.82	5.71
Sample**	6.14	5.90	5.77

ตารางที่ 2 แสดงประสิทธิภาพของ Ammonium acetate-acetic acid Buffer (pH = 4.80)

ในความเข้มข้น 10, 20, 40 mM

*Blank = Acetonitrile + H₂O + Buffer (6 : 2 : 2)

**Sample = Acetonitrile + 0.2N HCl + 0.2N NaOH + H₂O + Buffer (6 : 1 : 1 : 2)

จากผลที่ได้ จึงเลือกใช้ Ammonium acetate-acetic acid Buffer ความเข้มข้น 20 mM เนื่องจากที่ความเข้มข้น 10 mM pH ของสารละลายจะค่อนข้างสูง และมีการเปลี่ยนแปลงมากเมื่อเทียบจาก Blank และ Sample ส่วน pH ของความเข้มข้น 40 mM ไม่แตกต่างจาก 20 mM มากนัก จึงเลือกใช้ความเข้มข้นที่ต่ำกว่า คือ 20 mM

2) Sodium dihydrogen phosphate-phosphoric acid Buffer (pH = 5.10, 5 mM)

ได้เลือกความเข้มข้นที่ต่ำที่สุดที่สามารถควบคุม pH ได้มาทดสอบโดยการวัด pH ของสารละลายที่ใช้บัฟเฟอร์ความเข้มข้นต่างๆ ผลของค่า pH ที่วัดได้เป็นดังแสดงในตารางที่ 3

	5 mM	10 mM	20 mM
Blank*	5.38	5.34	5.29
Sample**	5.33	5.31	5.27

ตารางที่ 3 แสดงประสิทธิภาพของ Sodium dihydrogen phosphate-phosphoric acid Buffer (pH = 5.10) ในความเข้มข้น 5, 10, 20 mM

*Blank = Acetonitrile + H₂O + Buffer (6 : 2 : 2)

**Sample = Acetonitrile + 0.2N HCl + 0.2N NaOH + H₂O + Buffer (6 : 1 : 1 : 2)

จากผลที่ได้ จึงเลือกใช้ Sodium dihydrogen phosphate-phosphoric acid Buffer ความเข้มข้น 5 mM เนื่องจากที่ความเข้มข้น 10 mM และ 20 mM ไม่แตกต่างจาก 5 mM มากนัก จึงเลือกใช้ 5 mM

2. สารในบัฟเฟอร์ควรมีค่า UV Cutoff ต่ำกว่าความยาวคลื่นที่ใช้ในการวิเคราะห์

ค่า UV cutoff คือ ค่าของความยาวคลื่นที่มีการดูดกลืนแสงเท่ากับ 1.0 Absorbance unit สำหรับ HPLC ในทางปฏิบัติแล้วจะไม่เลือกใช้ความยาวคลื่นที่ Background absorbance ของ Mobile phase อยู่ใกล้ค่า UV cutoff ซึ่งนอกจากจะทำให้ Baseline noise มีค่ามากแล้ว ยังทำให้ Linear dynamic range เปลี่ยนไป อันเป็นผลมาจาก Mobile phase มีการดูดกลืนแสงได้มาก และ Background absorbance มีค่าสูง

ดังนั้น การที่จะให้ค่า Sensitivity สูงสุด ควรเลือก Mobile phase ที่มีค่า UV cutoff น้อยกว่า wavelength ที่เลือกใช้ในการวิเคราะห์ตัวอย่าง โดยค่า UV cutoff ของสารเป็นดังที่กำหนดในตารางที่ 4 ซึ่งจะช่วยในการเลือก Mobile phase และบัฟเฟอร์ที่เหมาะสมในการวิเคราะห์ทาง HPLC ที่ใช้ UV Detector

Solvent	UV cutoff (nm)
Acetonitrile	190
Water	190
0.1% HCl	190
0.1% NaOH	190
1 M NaCl	208
Acetic acid	230
Ammonium hydroxide/ammonia	200
10 mM Ammonium acetate	205
Phosphoric acid	190
10 mM Sodium phosphate-monobasic	190

ตารางที่ 4 แสดงค่า UV cutoff ของ Mobile phase

จากตารางจะเห็นได้ว่าใน Mobile phase ที่กำหนดไว้ใน Monograph มีเพียง Acetonitrile กับน้ำ ที่มีค่า UV cutoff เท่ากับ 190 ซึ่งเป็นค่าที่ต่ำกว่าความยาวคลื่นที่ใช้ในการวิเคราะห์ (216 nm) ดังนั้นใน Mobile phase และ Injected solution ดังกล่าวจะมีผลจากค่า UV cutoff น้อย

แต่ในสภาวะที่ทำการ stress ซึ่งมีสารละลาย 0.2 N HCl และ 0.2 N NaOH ปริมาณอย่างละ 10% ของ Injected solution ที่วิเคราะห์ ดังนั้นใน Injected solution จะมีความเข้มข้นของ HCl และ NaOH อย่างละ 0.2 N จากในตารางที่ 4 ค่า UV cutoff ของ 0.1% HCl และ 0.1% NaOH (มีความเข้มข้นคิดเป็น 0.025 N ซึ่งสูงกว่าที่ใช้ในการวิเคราะห์จริง) มีค่าเพียง 190 nm ซึ่งต่ำกว่าความยาวคลื่นที่ใช้ในการวิเคราะห์ (216 nm) ดังนั้นสารละลายกรด-ด่างที่นำมาเพื่อให้เร่งและหยุดเกิดการเสื่อมสลายจึงไม่มีผลกระทบในเรื่อง UV cutoff ต่อวิธีวิเคราะห์

ต่อมาจะพิจารณาการเลือกใช้บัฟเฟอร์ ซึ่งมีอยู่สองชนิดคือ

1) Ammonium acetate-acetic acid Buffer (20 mM)

จากตารางที่ 4 ค่า UV cutoff ของ Acetic acid, Ammonium hydroxide/ammonia และ 10 mM Ammonium acetate มีค่าเท่ากับ 230, 200 และ 205 ตามลำดับ

2) Sodium dihydrogen phosphate-phosphoric acid Buffer (5 mM)

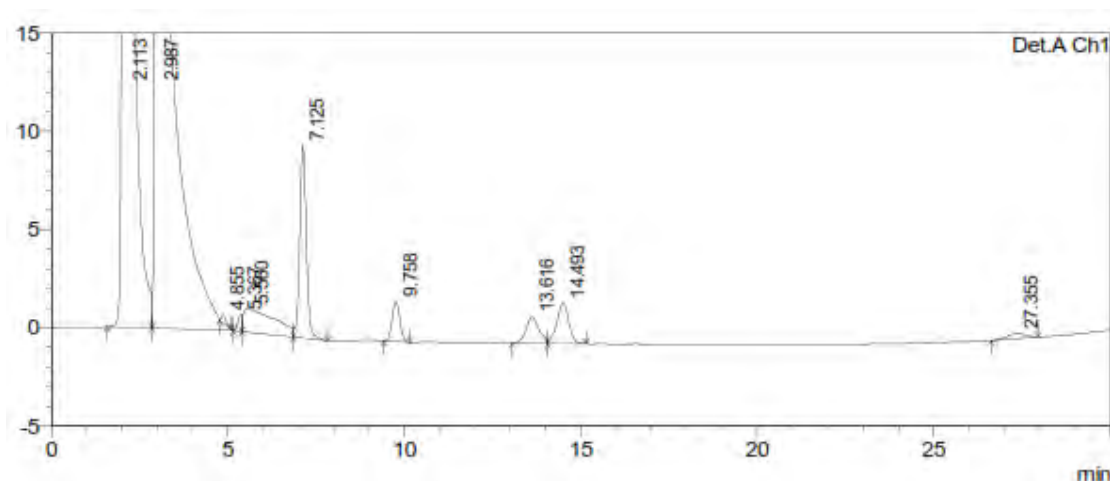
จากตารางที่ 4 ค่า UV cutoff ของทั้ง Phosphoric acid และ 10 mM Sodium phosphate-monobasic Buffer เท่ากับ 190 nm

ดังนั้น Sodium dihydrogen phosphate-phosphoric acid Buffer จะมีผลของ UV cutoff ต่ำกว่า Ammonium acetate-acetic acid Buffer

3. สารในบัฟเฟอร์จะต้องไม่ทำปฏิกิริยากับสารที่วิเคราะห์

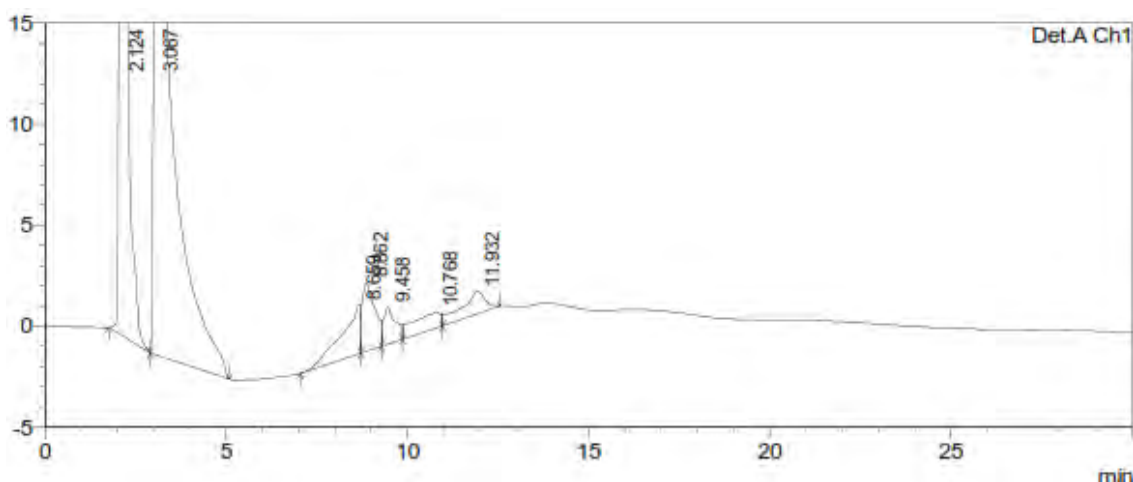
ในการวิเคราะห์ปริมาณด้วย บัฟเฟอร์ที่ใช้ต้องไม่ทำปฏิกิริยากับสารสำคัญที่ต้องการวิเคราะห์ เนื่องจากอาจส่งผลให้เกิดความผิดพลาดในการวิเคราะห์ได้ ดังนั้นในโครมาโทแกรมของสารละลาย Dihydroartemisinin ที่ละลายอยู่ใน Acetonitrile : Buffer อัตราส่วน 60 : 40 โดยที่สารละลายดังกล่าวไม่ได้ผ่านการกระตุ้นให้เกิดการเสื่อมสลาย ไม่ควรพบพีคใดนอกจากพีคของตัวยาและพีคของตัวทำละลาย จึงได้ทำการทดสอบบัฟเฟอร์ทั้งสองชนิดว่ามีการเกิดปฏิกิริยากับตัวยาหรือไม่

จากโครมาโทแกรมที่ได้จากการฉีดสารละลาย Dihydroartemisinin ใน Ammonium acetate-acetic acid Buffer ดังแสดงในรูปที่ 20 พบว่ามีพีคเกิดขึ้นประมาณนาที่ที่ 13.6 และ 14.5

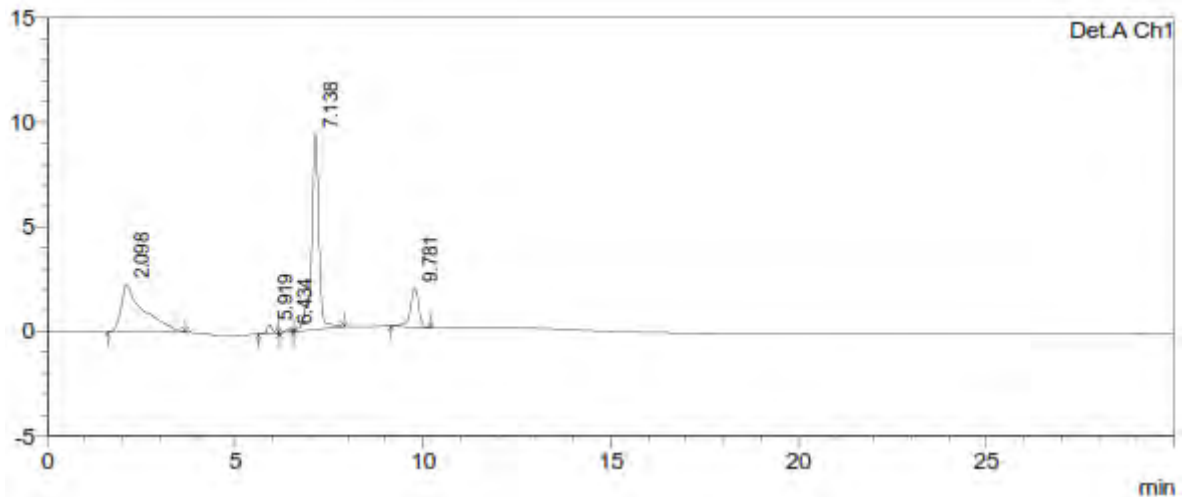


รูปที่ 20 แสดงโครมาโทแกรมของสารละลาย Dihydroartemisinin 1 mg/ml

ใน diluents ที่เป็น Acetonitrile : Ammonium Acetate-Acetic acid Buffer อัตราส่วน 60 : 40



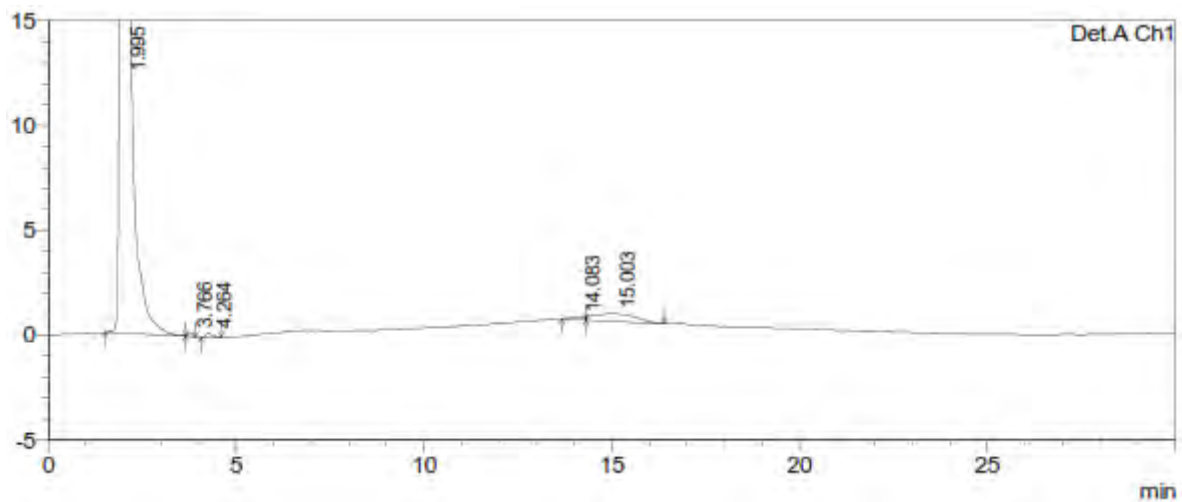
รูปที่ 21 แสดงโครมาโทแกรมของ Acetonitrile : Ammonium Acetate-Acetic acid Buffer อัตราส่วน 60 : 40



รูปที่ 22 แสดงโครมาโทแกรมของสารละลาย Dihydroartemisinin 1 mg/ml

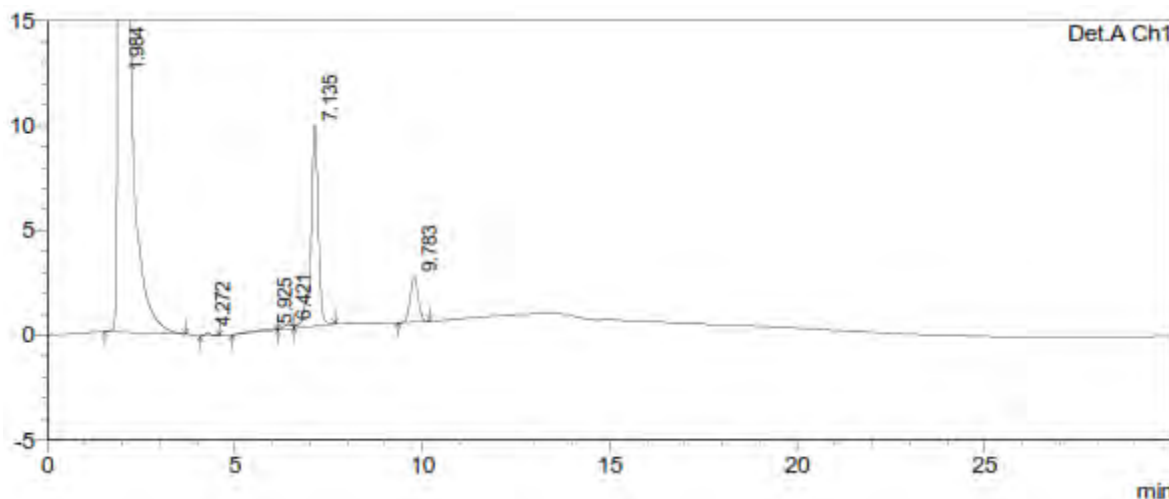
ใน diluents ที่เป็น Acetonitrile : น้ำ อัตราส่วน 60 : 40

ซึ่งทั้งในโครมาโทแกรมในรูปที่ 21 ซึ่งเป็นโครมาโทแกรมของสารละลาย Blank [Acetonitrile : Buffer (60 : 40)] และโครมาโทแกรมในรูปที่ 22 ซึ่งเป็นโครมาโทแกรมของสารละลายยาที่ละลายใน [Acetonitrile : Water (60 : 40)] ไม่พบพีคที่เวลา 13 ถึง 15 นาที จึงสรุปได้ว่า Ammonium acetate-acetic acid Buffer สามารถเกิดปฏิกิริยากับโครงสร้างของยาได้



รูปที่ 23 แสดงโครมาโทแกรมของสารละลาย

Acetonitrile : Soium dihydrogen Phosphate-Phosphoric acid Buffer อัตราส่วน 60 : 40



รูปที่ 24 แสดงโครมาโทแกรมของสารละลาย Dihydroartemisinin 1 mg/ml

ใน diluents ที่เป็น Acetonitrile : Sodium dihydrogen Phosphate-Phosphoric acid Buffer อัตราส่วน 60 : 40

ส่วน Sodium dihydrogen phosphate-phosphoric acid Buffer พบว่าไม่มีพีคเกิดขึ้นบริเวณดังกล่าว ซึ่งเกิดขึ้นใน Ammonium acetate-acetic acid Buffer เมื่อพิจารณาจากโครมาโทแกรม ดังรูปที่ 22, 23, 24

ดังนั้นในการทำ Stress testing จึงเลือก Sodium dihydrogen phosphate-phosphoric acid Buffer (pH 5.10, 5 mM) เป็นสารละลายบัฟเฟอร์ที่ใช้ในการทดลอง เนื่องจากสามารถคุม pH ของสารละลายยาให้อยู่ในช่วงที่คอลัมน์ทนได้ และมีผลของ UV cutoff ต่ำกว่า Ammonium acetate-acetic acid Buffer นอกจากนี้สารในบัฟเฟอร์ยังไม่เกิดปฏิกิริยากับสารที่วิเคราะห์อีกด้วย

4.4 การศึกษาสภาวะที่ทำให้เกิดสารสลายของยา Dihydroartemisinin เพื่อศึกษาความจำเพาะของวิธีวิเคราะห์

ในการทดสอบความจำเพาะของวิธีวิเคราะห์นั้นทำได้โดยพิจารณาความสามารถของวิธีวิเคราะห์นั้นๆ ว่ามีความสามารถในการแยกความแตกต่างของสารที่เป็นตัวยาสำคัญกับสารปนเปื้อนได้ดีพอหรือไม่ โดยในการประเมินความจำเพาะนั้นจะต้องมีตัวยาสำคัญที่มีการปนเปื้อนด้วยสารเสื่อมสลาย ในการทำให้เกิดการปนเปื้อนของสารสลายมีวิธีทำโดยตั้งใจใส่สารเสื่อมสลายลงไป ซึ่งต้องทราบสารเสื่อมสลายและสามารถหา pure substance ของสารลายนั้นได้ แต่ในกรณีที่ไม่สามารถทำวิธีดังกล่าวได้ อาจศึกษาได้โดยทำให้สารอยู่ในสภาวะเครียด (stress condition) เพื่อเร่งให้เกิดการเสื่อมสลายของยาในสภาวะต่างๆ

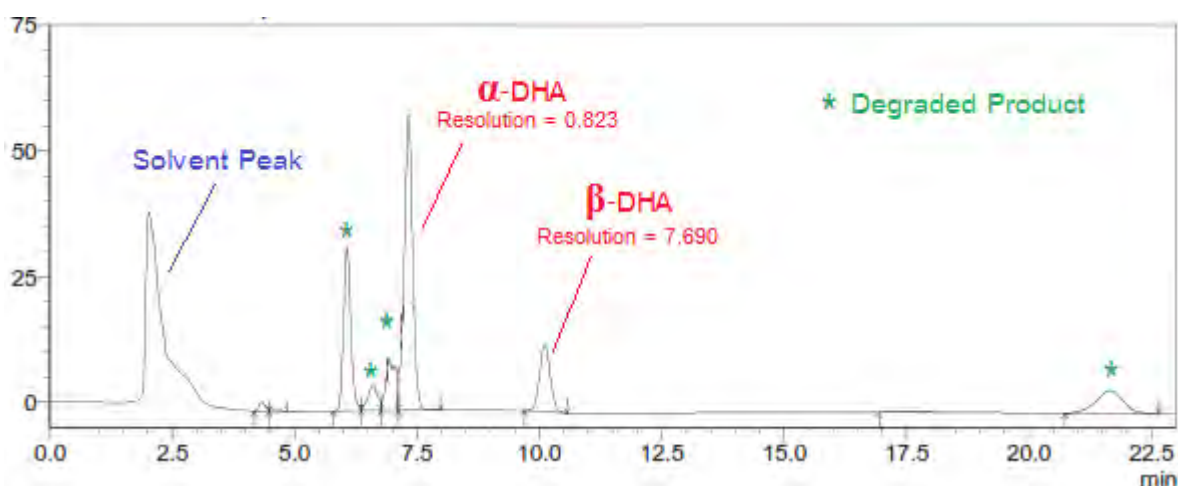
การทำ Stress testing ทำให้ตัวยาเกิดการเสื่อมสลายจนได้สารเสื่อมสลายในปริมาณที่เหมาะสม ซึ่งในปกติแล้วจะนิยมให้เกิดสารเสื่อมสลายร้อยละ 20-30 เนื่องจากเป็นปริมาณที่ไม่น้อยเกินไปและไม่มาก

จนเกินไป ซึ่งในการวิเคราะห์โดย HPLC จะประเมินโดยพิจารณาจาก chromatogram ว่าพีคของยาสามารถแยกออกจากสารอื่นได้ดีหรือไม่ โดยดูจากพารามิเตอร์ต่างๆ ได้แก่ Resolution และ %Peak purity index

จากการศึกษาที่ผ่านมาพบว่าตัวยา Dihydroartemisinin สามารถเกิดการเสื่อมสลายได้โดยการเกิดปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสทั้งในสภาวะกรดและสภาวะด่าง ในขั้นตอนดำเนินการวิจัยจึงได้ทำ Stress testing โดยทดสอบในสภาวะต่างๆ ดังนี้

- 0.2 N HCl เป็นเวลา 1, 3, 6 และ 14 ชั่วโมง
- 0.2 N NaOH เป็นเวลา 1, 3, 6 และ 14 ชั่วโมง
- 0.2 N HCl พร้อมกับ ให้ความร้อนกับสารละลายที่อุณหภูมิ 70°C เป็นเวลา 3 ชั่วโมง
- ให้ความร้อนกับสารละลาย DHA 70°C เป็นเวลา 1, 3, และ 6 ชั่วโมง

เมื่อตัวยาได้ผ่านการ Stress ในสภาวะต่างๆ แล้ว ก็จะเลือกเพียงสภาวะที่เหมาะสม ที่สามารถทำให้เกิดการเสื่อมสลายของตัวยาสำคัญจนได้เป็นสารเสื่อมสลายในปริมาณร้อยละ 20-30 เพื่อนำมาทำการประเมินความจำเพาะของวิธีวิเคราะห์ ด้วยสาเหตุดังกล่าวจึงได้เลือกประเมินความจำเพาะของวิธีโดยใช้สภาวะที่ตัวยาถูกเร่งให้เกิดการเสื่อมสลายในสภาวะกรด (0.2 N HCl) เป็นเวลา 14 ชั่วโมง ซึ่งให้ผลการทดลองดังรูปที่ 25

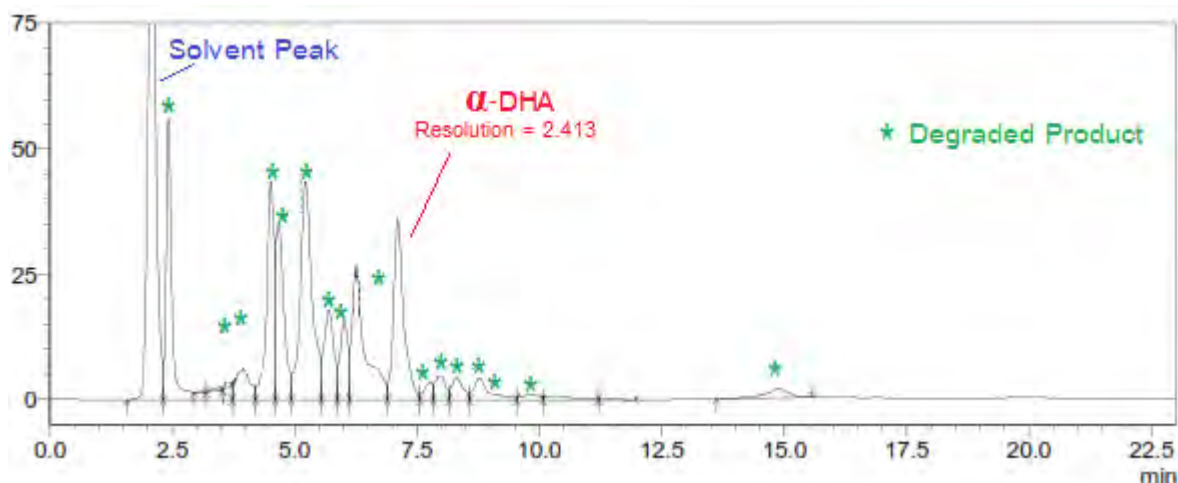


รูปที่ 25 แสดงโครมาโทแกรมของสารละลาย Dihydroartemisinin 1 mg/ml ที่ผ่านการ stress ในสภาวะกรด (0.2 N HCl) เป็นเวลา 14 ชั่วโมง

จากรูปที่ 25 จะเห็นว่าค่า Resolution ของ Alpha และ Beta peaks มีค่าเป็น 0.823 และ 7.690 ตามลำดับ ซึ่งค่า Resolution ของ Alpha peak มีค่าน้อยกว่าที่กำหนดใน Acceptance criteria (Resolution > 2.0) ซึ่งบ่งบอกถึงความสามารถของวิธีวิเคราะห์ในการแยกพีคของยาออกจากพีคของสารอื่น ว่าวิธีดังกล่าว

มีความจำเพาะต่อตัวยาต่ำ ส่งผลให้ในการวิเคราะห์หาปริมาณตัวยา Dihydroartemisinin มีข้อผิดพลาดคือ วิเคราะห์ได้ปริมาณตัวยาที่มากเกินไปกว่าความเป็นจริงอยู่จริง

นอกจากนี้เมื่อทำการทดสอบในสภาวะต่าง (0.2 N NaOH) เมื่อเวลาผ่านไปเพียง 1 ชั่วโมง จะได้ผล ดังรูปที่ 26



รูปที่ 26 แสดงโครมาโทแกรมของสารละลาย Dihydroartemisinin 1 mg/ml ที่ผ่านการ Stress ในสภาวะต่าง (0.2 N NaOH) เป็นเวลา 1 ชั่วโมง

จากรูปที่ 26 พบว่าตัวยาเกิดการเสื่อมสลายได้อย่างรวดเร็ว เมื่อเวลาผ่านไปเพียง 1 ชั่วโมง พบว่า สารสำคัญลดลงเหลือเพียงจำนวนที่น้อยมาก และพีคของ Beta ลดลงมากจนไม่สามารถระบุพิกัดได้จากโครมาโทแกรมที่แสดง ในสภาวะดังกล่าวถือว่าเป็นสภาวะที่ไม่เหมาะสมในการนำมาประเมินความจำเพาะของวิธีวิเคราะห์ เนื่องจากมีการเกิดสารเสื่อมสลายที่มากเกินไป ควรจะมีการเปลี่ยนแปลงสภาวะให้มีความเป็นต่างลดลง หรือลดระยะเวลาในการ stress เพื่อลดอัตราเร็วของการเกิดปฏิกิริยาที่ทำให้เกิดการเสื่อมสลายลง

แต่ข้อน่าสังเกตที่ได้จากการทำการ stress ในสภาวะต่าง (0.2 N NaOH) เป็นเวลา 1 ชั่วโมง คือ จะพบว่ามีพีคของสารเสื่อมสลายเกิดขึ้นระหว่างพีคของยาหลักทั้งสองพีค (ที่ Retention time ระหว่าง 7.5 และ 10.0) ซึ่งการที่มีสารเสื่อมสลายปรากฏขึ้นในบริเวณดังกล่าวส่งผลให้การวิเคราะห์หาปริมาณมีข้อผิดพลาดได้ปริมาณมากเกินไปกว่าที่มีอยู่จริง

จากการศึกษาในหัวข้อการทำ Stress testing นี้ พบว่าวิธีวิเคราะห์หาปริมาณยา Dihydroartemisinin ตาม The International Pharmacopeia 2011 method A ซึ่งเป็นวิธีที่ใช้หลักการ Reversed phase HPLC (RP-

HPLC) มีความจำเพาะต่อตัวยาต่ำกว่าข้อกำหนด และยังพบว่ามีการเสื่อมสลายที่แสดงพีกอยู่ระหว่างพีกหลัก ทั้งสองสาเหตุนี้ส่งผลให้เกิดข้อผิดพลาดจากการวิเคราะห์ โดยจะวิเคราะห์ได้ปริมาณยาที่มากเกินไปซึ่งมีผลต่อการนำไปใช้ในทางคลินิกต่อไป

4.5 การทดสอบความคงตัวของยา Dihydroartemisinin ในสารละลายที่เป็น Acetonitrile : Water (60 : 40)

ผลการวิเคราะห์เป็นตามตารางที่ 5 และตารางที่ 6 ดังนี้

	Freshly Prepared			After 3 hour			After 6 hour		
	mean	SD	%RSD	mean	SD	%RSD	mean	SD	%RSD
α -DHA Peak	604644	29253.23	4.838092	533567	16486.32	3.089832	429721.3	43574.85	10.14026
β -DHA Peak	490503	575110.7	117.2492	131320	6109.248	4.652184	103759	5780.674	5.571251

ตารางที่ 5 แสดงค่าเฉลี่ยของพื้นที่ใต้กราฟ ค่า SD และ %RSD ของทั้ง alpha และ beta-DHA Peak ของ

สารละลาย Freshly Prepared และเมื่อเวลาผ่านไป 3 และ 6 ชั่วโมงตามลำดับ

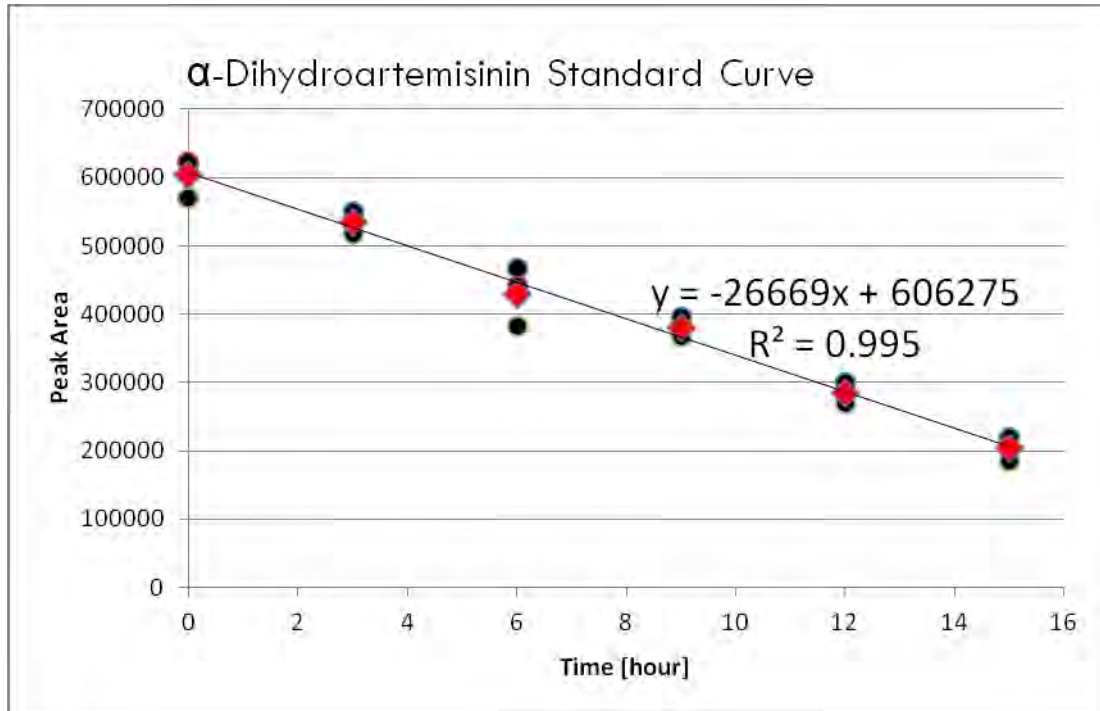
	After 9 hour			After 12 hour			After 15 hour		
	mean	SD	%RSD	mean	SD	%RSD	mean	SD	%RSD
α -DHA Peak	381072.7	14313.2	3.756028	285210	15203.63	5.33068	203346.7	17323.04	8.51897
β -DHA Peak	96844.33	4905.526	5.065372	67828	4205.732	6.200584	48713.67	2607.557	5.352825

ตารางที่ 6 แสดงค่าเฉลี่ยของพื้นที่ใต้กราฟ ค่า SD และ %RSD ของทั้ง alpha และ beta-DHA Peak ของ

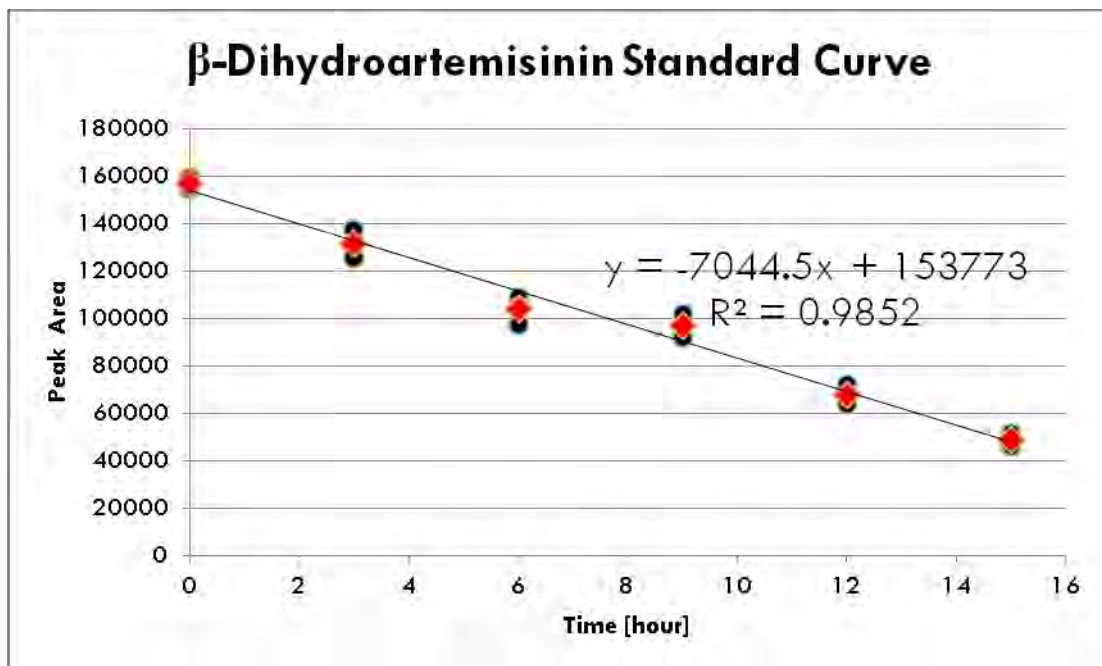
สารละลาย เมื่อเวลาผ่านไป 9, 12 และ 15 ชั่วโมงตามลำดับ

จากผลการวิเคราะห์พบว่าเมื่อเวลาผ่านไปพื้นที่ใต้กราฟของยาที่ผ่านการวิเคราะห์ด้วย

Chromatography ดังกล่าว ทั้งใน alpha และ beta form จะลดลงเรื่อยๆ ซึ่งมีความสัมพันธ์เป็นเส้นตรง ดังแสดงในรูปที่ 27 และรูปที่ 28

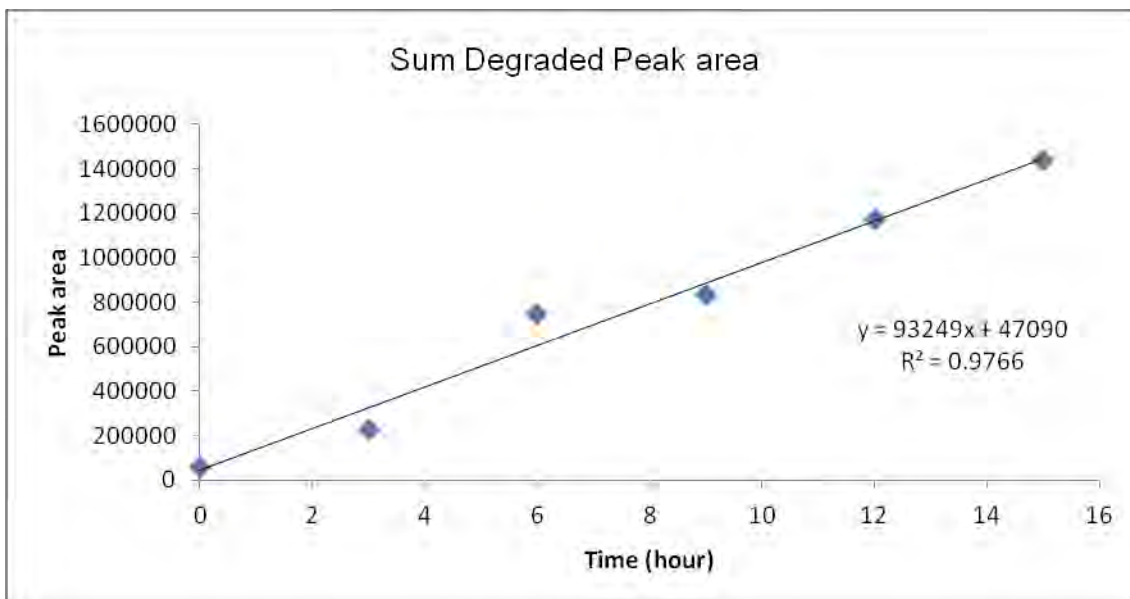


รูปที่ 27 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างพื้นที่ใต้กราฟและเวลาที่ผ่านไป ของ Alpha-DHA Peak



รูปที่ 28 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างพื้นที่ใต้กราฟและเวลาที่ผ่านไป ของ Beta-DHA Peak

นอกจากนี้ยังพบว่ามีการเพิ่มขึ้นของพื้นที่ใต้กราฟของสารเสื่อมสลาย ดังแสดงในรูปที่ 29



รูปที่ 29 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างพื้นที่ใต้กราฟและเวลาที่ผ่านไป
ของ Degraded DHA Peak

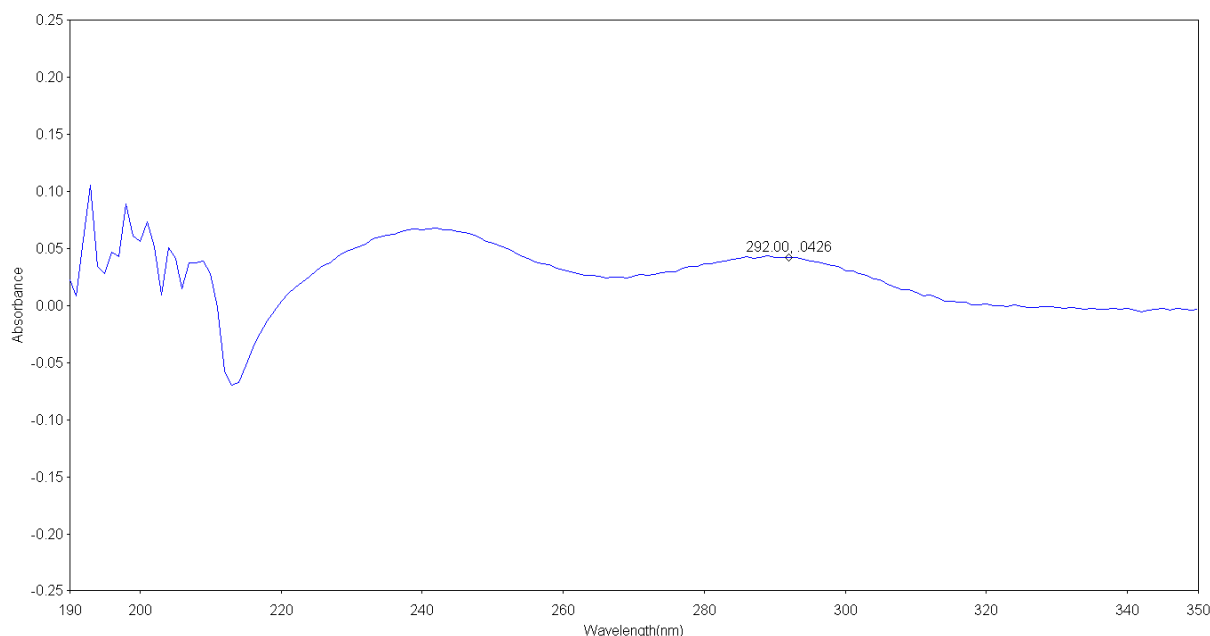
จากการทดลองพบว่ามีสารเสื่อมสภาพออกมาในช่วงเวลาต่างๆดังนี้ 5.954, 6.461, 6.935, 21.771 นาที ซึ่งสารเสื่อมสภาพที่ออกมาในช่วง 5.954, 6.461, 6.935 นาที พบว่ามีอยู่แล้วใน Chromatogram ที่ฉีดทันทีหลังจากที่เตรียมสารละลายเสร็จ (Freshly Prepare) แต่สารเสื่อมสภาพที่ออกมาในช่วง 21.771 นาที จะเริ่มออกมาเมื่อมีการเตรียมสารละลายเสร็จแล้ว 9 ชั่วโมง

จากผลการวิเคราะห์จึงสรุปได้ว่า วิเคราะห์หาปริมาณตาม The International Pharmacopoeia Monograph 2011 Method A มีข้อบกพร่องในเรื่องของความคงตัวของยา เนื่องจากสารละลาย Dihydroartemisinin ความเข้มข้น 1 mg/ml ในตัวทำละลายที่กำหนดคือ Acetonitrile : Water ในอัตราส่วน 60 : 40 จะเกิดการเสื่อมสภาพของยา ทำให้ปริมาณยาลดลงตามเวลาที่ผ่านไป และจะพบการเพิ่มขึ้นของพื้นที่ใต้กราฟของสารเสื่อมสภาพ การเสื่อมสภาพที่เกิดขึ้นคาดว่าเกิดจากปฏิกิริยา Hydrolysis เนื่องจากสภาวะกรด เนื่องจากเมื่อวัดค่า pH ของสารละลายดังกล่าวจะมีค่า pH อยู่ในช่วง 4.0-5.0 ซึ่งมีฤทธิ์เป็นกรดอ่อน แต่เมื่อนิยดสารละลาย Dihydroartemisinin ในตัวทำละลาย Acetonitrile : Phosphate Buffer (10mM) ในอัตราส่วน 60 : 40 ซึ่งมีค่า pH อยู่ในช่วง 5.0-6.0 เมื่อเวลาผ่านไปจะไม่พบการเปลี่ยนแปลงดังกล่าว ซึ่งใน monograph ได้กำหนดให้ทำการวิเคราะห์สารละลายยาทันที (freshly prepared) ทั้งนี้ในการวิเคราะห์จึงอาจเกิดการเหลื่อมล้ำในด้านเวลาของการวิเคราะห์ ส่งผลให้เกิดความผิดพลาดในการวิเคราะห์ได้

4.6 การวิเคราะห์โดยใช้ UV-Visible Spectrophotometer ตาม The International Pharmacopoeia Monograph 2011 Method B

หลักการของวิธีวิเคราะห์นี้คือทำให้ตัวยาเกิดการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างเป็นสารอื่นที่สามารถดูดกลืนแสงได้ในช่วงความยาวคลื่น 292 นาโนเมตร เนื่องจาก Dihydroartemisinin สามารถดูดกลืนได้ในช่วงความยาวคลื่นที่ต่ำมาก (190-200 นาโนเมตร) ซึ่งความยาวคลื่นในช่วงนั้นจะพบการรบกวนของสารต่างๆ (เช่น ตัวทำละลาย แก้ว เป็นต้น) ได้มากจึงไม่สามารถใช้ความยาวคลื่นในช่วงดังกล่าวในการวิเคราะห์หาปริมาณได้

ผลการวิเคราะห์ด้วย UV-Visible Spectrophotometer ได้ผล Spectrum ดังรูปที่ 30



รูปที่ 30 แสดง UV Spectrum ของการวิเคราะห์หาปริมาณ Dihydroartemisinin

ตามวิธีวิเคราะห์ของ The International Pharmacopoeia Monograph 2011 Method B

จากการประเมินวิธีวิเคราะห์หาปริมาณ Dihydroartemisinin ตามวิธี The International Pharmacopoeia Monograph 2011 Method B พบข้อบกพร่องต่างๆ ดังนี้

1. วิธีดังกล่าวไม่มีความจำเพาะเพียงพอ เนื่องจาก

a) สารอื่นทำปฏิกิริยาได้สารที่สามารถดูดกลืนแสงในช่วงความยาวคลื่น 292 นาโนเมตร

สารอื่นที่ไม่ใช่สารสำคัญอาจทำปฏิกิริยากับ Ethanol และ NaOH ในความร้อนจนได้สารที่มีโครงสร้างที่สามารถดูดกลืนแสงได้ในช่วงความยาวคลื่น 292 นาโนเมตร ทำให้เมื่อทำการวิเคราะห์จะพบว่า มีปริมาณของ Dihydroartemisinin มากกว่าปริมาณสารที่มีอยู่จริง ส่งผลให้เกิดความผิดพลาดในการวิเคราะห์ได้

b) กรณีที่มีสารที่ดูดกลืนแสงในช่วงความยาวคลื่นใกล้เคียง 292 นาโนเมตร

ในการวิเคราะห์อาจเกิดความผิดพลาดได้ เนื่องจากอาจเกิดการดูดกลืนแสงของ โครงสร้างสารที่มี Chromophore คล้ายกัน หรืออาจเป็นสารที่เกิดจากการทำปฏิกิริยาระหว่างตัวยากับ NaOH โดยมีความร้อนเป็นตัวเร่งให้เกิดปฏิกิริยา หรือเป็นสารที่มีความสามารถในการดูดกลืนแสงในช่วงความยาวคลื่นใกล้เคียงกับช่วงความคลื่น 292 นาโนเมตร ถึงแม้ว่า λ_{\max} ของสารที่รบกวนการวิเคราะห์จะไม่ได้อยู่ที่ช่วงความยาวคลื่น 292 นาโนเมตร แต่หากยังสามารถดูดกลืนแสงในช่วง 292 นาโนเมตร ก็จะทำให้เมื่อทำการวิเคราะห์จะพบว่า มีปริมาณของ Dihydroartemisinin มากกว่าปริมาณสารที่มีอยู่จริง ส่งผลให้เกิดความผิดพลาดในการวิเคราะห์ได้

c) กรณีที่มีการเสื่อมสลายของยาก่อนการวิเคราะห์

เนื่องจากสารที่วัดได้ในช่วงความยาวคลื่น 292 นาโนเมตร คือสารที่เกิดจากการเปลี่ยนแปลง โครงสร้างของ Dihydroartemisinin ในสภาวะต่าง โดยอาศัยความร้อนเป็นตัวเร่งในการเกิดปฏิกิริยา ดังนั้น ในกรณีที่ตัวยามีการเสื่อมสลายก่อนที่จะนำมาวิเคราะห์ เมื่อทำการวิเคราะห์จะพบว่า มีปริมาณของ Dihydroartemisinin มากกว่าปริมาณสารที่มีอยู่จริง ส่งผลให้เกิดความผิดพลาดในการวิเคราะห์ได้

จากผลของวิธีวิเคราะห์ที่มีความจำเพาะไม่เพียงพอส่งผลให้ในการวิเคราะห์นั้นพบปริมาณตัวยาคสำคัญมากกว่าปริมาณตัวยาคสำคัญที่มีอยู่จริง นอกจากนี้เมื่อนำยาคดังกล่าวไปรักษาโรคมมาลาเรียจะส่งผลให้ คนไข้ไม่หายขาดจากการรักษา ยังจะส่งผลให้เกิดปัญหาการดื้อยาของเชื้อก่อโรคมมาลาเรียในระยะยาวได้อีกด้วย

2. ปริมาณตัวยาคสัมพันธ์กับสารเสื่อมสลาย

เนื่องจากการวิเคราะห์ด้วยวิธีนี้เป็น การวิเคราะห์หาปริมาณสารที่เกิดการเปลี่ยนแปลง โครงสร้างในสภาวะต่างซึ่งใช้ความร้อนเป็นตัวเร่งที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที ซึ่งตามหลักการแล้ว เมื่อครบเวลา 30 นาทีควรจะเกิดการเปลี่ยนแปลง โครงสร้างจากตัวยาคสำคัญมาเป็นสารที่มีการดูดกลืนแสงที่

ช่วงความยาวคลื่น 292 นาโนเมตรทั้งหมด (100%) จึงจะสามารถบอกได้วิธีวิเคราะห์นี้สามารถใช้วิเคราะห์ได้อย่างมีประสิทธิภาพ เนื่องจากสามารถบอกได้ว่าปริมาณตัวยาสำคัญ (Dihydroartemisinin) มีความสัมพันธ์กับปริมาณสารที่ดูดกลืนแสงในช่วงความยาวคลื่น 292 นาโนเมตรจริง ในการดำเนินการวิจัยได้มีการทดสอบความไม่คงตัวของยา Dihydroartemisinin พบว่ายาสามารถเกิดการเปลี่ยนแปลงโครงสร้าง (Degradation) ได้ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส ดังนั้น หากในสถานะที่เป็นด่าง (0.04 NaOH) เป็นเวลา 30 นาที ยังเกิดการทำให้ปฏิกิริยาไม่สมบูรณ์ เมื่อนำมาตั้งในอุณหภูมิห้องระหว่างรอการนำไปวิเคราะห์โดยเครื่อง UV-Vis Spectrophotometer อาจเกิดการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างของยาต่อได้ ซึ่งถ้าสารตัวอย่างกับสารมาตรฐานที่นำมาเทียบมีเวลาที่เกิดการทำให้ปฏิกิริยาต่อไม่เท่ากัน ซึ่งปกติในการวิเคราะห์จะทำการวิเคราะห์หาปริมาณสารมาตรฐานก่อน ทำให้สารตัวอย่างสามารถเกิดปฏิกิริยาต่อได้มากกว่า ทำให้เมื่อนำไปวิเคราะห์จะพบปริมาณยามากกว่าความสัมพันธ์ของปริมาณยากับการดูดกลืนแสงจริง ในกรณีนี้ทางโรงงานทำการวิเคราะห์สารมาตรฐานครั้งเดียวแล้วใช้เทียบกับสารตัวอย่างหลายๆ lot ก็จะต้องมั่นใจว่าสามารถควบคุมสถานะที่ใช้ในการวิเคราะห์ให้ได้เหมือนกันทุกครั้ง เพราะอาจทำให้วิเคราะห์หาปริมาณตัวยาสำคัญได้มากหรือน้อยกว่าความเป็นจริงได้ ดังนั้นจึงควรควบคุมสถานะในการวิเคราะห์เพื่อลดความผิดพลาดจากการวิเคราะห์โดยการแก้ไขและป้องกัน เนื่องจากจัดเป็นความผิดพลาดแบบ Systemic error

3. ความเข้มข้นที่ใช้ในการวิเคราะห์ต่ำเกินไป

ความเข้มข้นที่ใช้ในการวิเคราะห์ที่ต่ำเกินไป (0.01 mg/ml) ส่งผลให้ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 292 นาโนเมตรมีค่าน้อย (ประมาณ 0.04 A) ดังที่แสดงในรูปที่ 31 ส่งผลให้เกิดความคลาดเคลื่อนของการวิเคราะห์หาปริมาณ Dihydroartemisinin ได้ ทั้งในกรณีที่วิเคราะห์ปริมาณยาได้มากเกินไปจริงและน้อยเกินจริงเนื่องจากผลของ noise

a) กรณีวิเคราะห์หาปริมาณยาได้มากเกินไปจริง

ดังที่กล่าวไว้ในข้อ 1 ผลของวิธีวิเคราะห์ที่มีความจำเพาะต่อยา Dihydroartemisinin ไม่เพียงพอ นั้นทำให้วิเคราะห์ได้ปริมาณตัวยาสำคัญมากกว่าปริมาณตัวยาสำคัญที่มีอยู่จริง ส่งผลให้เมื่อนำยาดังกล่าวไปใช้ในการรักษาผู้ป่วยโรคมมาลาเรีย ขนาดยาอาจต่ำกว่าขนาดยาที่ใช้ในการรักษา ทำให้ฤทธิ์ในการฆ่าเชื้อลดลง ผู้ป่วยอาจไม่หายขาดจากการรักษา และยังสามารถส่งผลให้เกิดปัญหาการดื้อยาของเชื้อก่อโรคมมาลาเรียเมื่อใช้ในระยะยาวได้อีกด้วย

b) กรณีวิเคราะห์หาปริมาณยาได้น้อยเกินจริง

การที่วิเคราะห์พบตัวยาน้อยกว่าที่เป็นจริงนั้น อาจส่งผลดีต่อคนไข้ แต่ในทางกลับกันจะส่งผลเสียให้กับโรงงานผู้ผลิตยา เพราะถ้าปริมาณยาจริงที่มีอยู่มีปริมาณอยู่ในเกณฑ์มาตรฐานที่กำหนด แต่เมื่อวิเคราะห์มาแล้วพบปริมาณตัวยาน้อยกว่าปริมาณจริงที่มีแล้วต่ำกว่าเกณฑ์มาตรฐานก็จะต้องทำการ Reject ยาใน lot นั้นทั้งหมด หรืออาจแก้ปัญหาโดยการนำไปผสมกับตัวยาแล้วทำการผลิตใหม่ ทั้งนี้ทั้งนั้นก็ทำให้ทางโรงงานเสียค่าใช้จ่ายไปอย่างสูญเปล่า

ความผิดพลาดของการวิเคราะห์หาปริมาณยาทั้งสองกรณีเกิดจากการรบกวนของ noise ซึ่งเป็นความผิดพลาดที่เรียกว่า Random error ซึ่งหมายความว่า เป็นความผิดพลาดที่สามารถเกิดขึ้นได้อยู่เสมอ ไม่สามารถควบคุมได้ ทำให้ไม่สามารถทำนายได้เลยว่าจะเกิดความผิดพลาดในการวิเคราะห์ในครั้งไหน จะพบปริมาณตัวยาสำคัญมากหรือน้อยกว่าความเป็นจริง

แนวทางแก้ไข ในกรณีที่ความผิดพลาดเกิดจาก noise สามารถแก้ไขได้โดย

1) เพิ่มความเข้มข้นของปริมาณตัวยาที่ใช้ในการวิเคราะห์

ในการเพิ่มความเข้มข้นของยาจะทำให้การดูดกลืนแสงของสารละลายเพิ่มสูงขึ้น ส่งผลให้ %error ลดลง เนื่องจากความผิดพลาดจะเทียบจากการดูดกลืนแสงที่เพิ่มขึ้น แต่หลักสำคัญคือ ตัวยาสำคัญจะต้องเกิดปฏิกิริยาทางเคมีกับปัจจัยที่ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงโครงสร้าง ทั้ง Sodium Hydroxide, Ethanol, ความร้อน เช่นเดียวกับกับวิธีเดิม

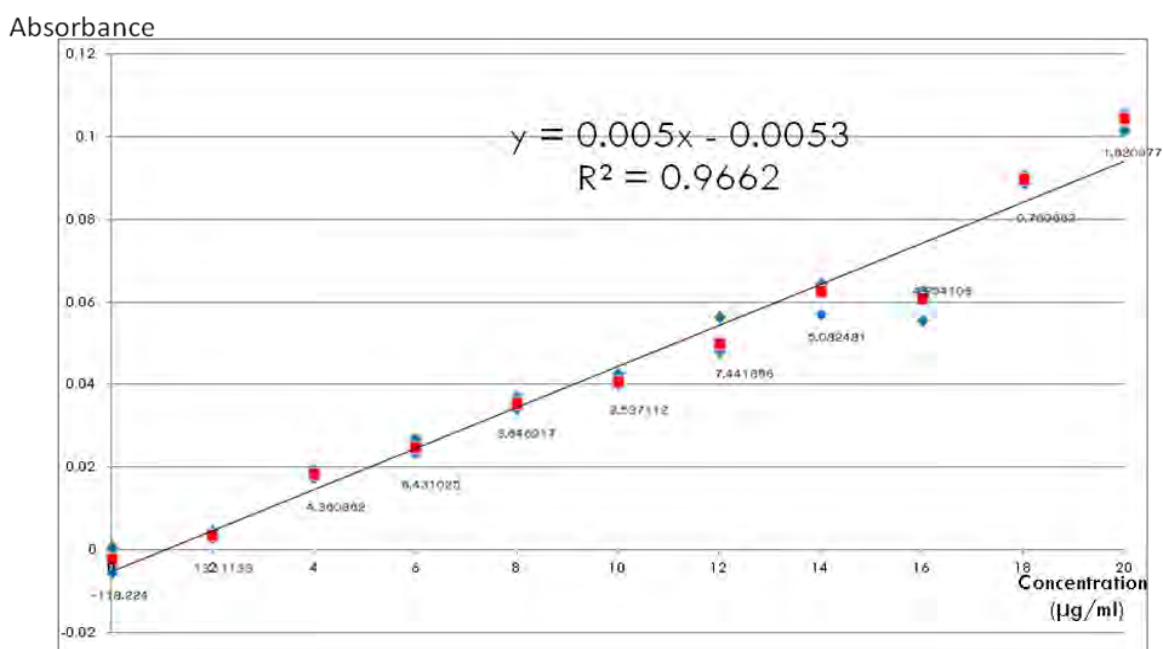
2) ทำการวิเคราะห์ซ้ำหลายๆ ครั้งแล้วนำมาหาค่าเฉลี่ย

การแก้ไข โดยการเพิ่มจำนวนกลุ่มตัวอย่างเป็นวิธีที่สามารถอธิบายได้โดยใช้หลักการทางสถิติ คือ เมื่อจำนวนกลุ่มตัวอย่าง (n) มากขึ้น จะส่งผลให้ Normal Curve มีลักษณะแคบลง ซึ่งหมายความว่า จะทำให้ Standard deviation ลดลง (การกระจายของข้อมูลลดลง) ซึ่งก็หมายความว่า จะทำให้เกิดข้อผิดพลาดของการวิเคราะห์น้อยลงนั่นเอง แต่ข้อเสียของวิธีนี้คือ นอกจากจะทำให้เสียค่าใช้จ่ายมากขึ้นแล้ว ยังทำให้ต้องเพิ่มระยะเวลาที่ใช้ในการวิเคราะห์อีกด้วย เนื่องจากต้องเพิ่มปริมาณกลุ่มตัวอย่างก็เท่ากับเป็นการเพิ่มงานให้กับฝ่ายควบคุมคุณภาพจากเดิมที่ทำการวิเคราะห์จำนวน 3 ตัวอย่างก็ต้องเพิ่มจำนวนกลุ่มตัวอย่างขึ้น ซึ่งปกติแล้วฝ่ายควบคุมคุณภาพในโรงงานผลิตยาจะเป็นส่วนที่เป็นคอขวดในการผลิต ถ้าเสียเวลาในการวิเคราะห์มากก็จะส่งผลต่อกำหนดการผลิตของโรงงานได้

4. ความสัมพันธ์ระหว่างการดูดกลืนแสงกับความเข้มข้นเป็นเส้นตรงที่มีค่า R^2 น้อยกว่าที่ควร

เนื่องจากข้อบกพร่องในข้อ 3 ที่กล่าวว่าความเข้มข้นที่ใช้ในการวิเคราะห์มีความเข้มข้นที่น้อยเกินไป และได้เสนอแนวทางแก้ไขโดยเพิ่มความเข้มข้นของ Dihydroartemisinin ซึ่งก่อนที่จะทำการวิเคราะห์โดยใช้ความเข้มข้นที่ไม่ได้ระบุไว้ใน Monograph นั้น จะต้องทำการพิสูจน์ก่อนว่าความสามารถในการดูดกลืนแสง (Absorbance) มีความสัมพันธ์เป็นแบบเส้นตรงเมื่อทำการเปลี่ยนแปลงความเข้มข้นในช่วงต่างๆ

ในการวิจัยจึงได้มีการทำ Standard Curve ของการดูดกลืนแสงในความเข้มข้นของตัวยาสำคัญ (Dihydroartemisinin) ที่เกิดปฏิกิริยาในสภาวะต่างและใช้ความร้อนเป็นตัวเร่งปฏิกิริยาตาม The International Pharmacopoeia Monograph 2011 Method B โดยใช้ความเข้มข้นในช่วงต่างๆทั้งหมด 11 ความเข้มข้น ดังนี้ 0.00 , 0.02 , 0.04 , 0.06 , 0.08 , 0.10 , 0.12 , 0.14 , 0.16 , 0.18 และ 0.20 mg/ml (ความเข้มข้นที่ระบุไว้ใน monograph คือ 0.10 mg/ml การทำ Standard Curve จึงครอบคลุมช่วงความเข้มข้นที่ระบุใน Monograph และให้ความเข้มข้นนั้นอยู่ตรงกลางของความเข้มข้นทั้งหมดที่ใช้ในการวิเคราะห์) โดยจำนวนตัวอย่างของแต่ละความเข้มข้นคือ 5 ($n = 5$) ผลที่ได้จากการทำ Standard Curve เป็นดังรูปที่ 31



รูปที่ 31 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างการดูดกลืนแสง (Absorbance) และความเข้มข้นของยาที่ใช้ในการวิเคราะห์ตาม The International Pharmacopoeia Monograph 2011 Method B

จากผลการทำ Standard Curve พบว่าความสัมพันธ์ระหว่างการดูดกลืนแสง (Absorbance) และความเข้มข้น มีความสัมพันธ์เป็นแบบเส้นตรงที่มีค่า $R^2 = 0.9662$ ซึ่งถือว่ามีความสัมพันธ์เป็นเส้นตรงน้อยกว่าที่ควรจะเป็น ($R^2 \geq 0.995$) นอกจากนี้ยังพบว่า %RSD มีค่ามากกว่าที่ควรจะเป็น ($\%RSD \leq 2\%$) ดังแสดงในตารางที่ 7

ความเข้มข้น (mg/ml)	0.00	0.02	0.04	0.06	0.08	0.10	0.12	0.14	0.16	0.18	0.20
%RSD	-118.22	13.11	4.36	6.43	3.65	1.62	0.76	4.95	5.08	7.44	2.54

ตารางที่ 7 แสดงค่า %RSD ของการทำ Standard Curve ในช่วงความเข้มข้นในช่วงต่างๆ

จึงสรุปได้ว่าการแก้ไขปัญหาที่ความเข้มข้นของตัวอย่างที่ใช้ในการวิเคราะห์ตาม The International Pharmacopoeia Monograph 2011 Method B ต่ำเกินไป ไม่สามารถแก้ปัญหาค่าได้โดยการเพิ่มความเข้มข้น เนื่องจากการทำ Standard Curve ระหว่างการดูดกลืนแสงและความเข้มข้นของยาในช่วงต่างๆ มีความสัมพันธ์เป็นแบบเส้นตรงที่มีค่าความสัมพันธ์ (R^2) น้อยกว่าที่ควรจะเป็น และยังพบว่าเกิดความแปรปรวนของการวิเคราะห์ (%RSD) สูงมากในแต่ละจุดที่ทำกรวิเคราะห์

จากการวิจัยพบว่ากรวิเคราะห์หาปริมาณตัวยาสำคัญ (Dihydroartemisinin) ตามวิธีของ The International Pharmacopoeia Monograph 2011 Method B ไม่เหมาะสมในการนำมาใช้วิเคราะห์หาปริมาณตัวยา เนื่องจากเกิดข้อผิดพลาดของขั้นตอนการวิเคราะห์หลายประการดังที่กล่าวไว้ข้างต้น

บทที่ 5

สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ

5.1 สรุปผลการวิจัย

วิธีวิเคราะห์ยา Dihydroartemisinin ตามวิธีของ The International Pharmacopoeia monograph 2011 มีสถานะการวิเคราะห์ ดังนี้

Stationary phase	:	C18 (4.6×100 mm), 3.0 μm
Mobile phase	:	Acetonitrile : Water (60 : 40)
Flow rate	:	0.6 ml/min
UV detector	:	216 nm
Injection volume	:	20 μl

สถานะการวิเคราะห์ที่ใช้ในการทดลอง มีดังนี้

Stationary phase	:	C18 (4.6×150 mm), 5.0 μm
Mobile phase	:	Acetonitrile : Water (60 : 40)
Flow rate	:	0.6 ml/min
UV detector	:	216 nm
Injection volume	:	20 μl

จากการทดลอง สรุปได้ว่า วิธีวิเคราะห์ดังกล่าวมีความจำเพาะต่อการวิเคราะห์หาปริมาณยา Dihydroartemisinin ไม่เพียงพอ เนื่องจากค่า Resolution ระหว่างพีคหลักของยาและ related substances มีค่าต่ำกว่าเกณฑ์ที่ยอมรับ (ต่ำกว่า 2.0)

5.2 ข้อเสนอแนะ

จากผลการทดลองดังกล่าว ควรมีการทดลองโดยใช้สถานะการวิเคราะห์ที่ใกล้เคียงกับวิธีของ The International Pharmacopoeia monograph 2011 เพื่อยืนยันความแน่นอนของผลการวิเคราะห์ โดยปรับสถานะการวิเคราะห์เป็น

Stationary phase	:	C18 (2.0×150 mm), 2.2 μm
Mobile phase	:	Acetonitrile : water (60 : 40)
Flow rate	:	0.3 ml/min
UV detector	:	216 nm
Injection volume	:	20 μl

นอกจากนี้ ควรมีการศึกษาเพื่อหาสภาวะการวิเคราะห์ยา Dihydroartemisinin และสภาวะการเตรียมสารละลายยาใหม่ เพื่อให้ลักษณะ โครมาโทแกรมมีการแยกระหว่างพีคหลักของยาและ related substances อย่างชัดเจน รวมทั้งมีค่า Resolution และค่า parameter ต่างๆ ของโครมาโทแกรมที่เป็นไปตามเกณฑ์ที่ยอมรับได้ต่อไป

เอกสารอ้างอิง

- 1) Song J, Socheat D, Tan B, Seila S, Xu Y, Ou F, et al. Randomized trials of artemisinin-piperaquine, dihydroartemisinin-piperaquine phosphate and artemether-lumefantrine for the treatment of multi-drug resistant falciparum malaria in Cambodia-Thailand border area. *Malaria Journal* 2011; 10: 1-8.
- 2) Haynes RK, Chan HW, Lung CM, Ng NC, Wong HN, Shek LY, et al. Artesunate and Dihydroartemisinin (DHA): Unusual Decomposition Products Formed under Mild Conditions and Comments on the Fitness of DHA as an Antimalarial Drug. *ChemMedChem* 2007; 2: 1450-5.
- 3) Haynes RK, Pai HHO, and Voerste A. Ring Opening of Artemisinin (Qinghaosu) and Dihydroartemisinin and Interception of the Open Hydroperoxides with Formation of N-Oxides - A Chemical Model for Antimalarial Mode of Action. *Tetrahedron Letters* 1999; 40: 4715-8.
- 4) World Health Organization. Proposal for Revision of Monograph Published in The Fourth Edition of The International Pharmacopoeia Arteminol. Geneva; 2011.
- 5) Chinese Pharmacopoeia Commission. Pharmacopoeia of the People's Republic of China 2005; 2: 282-3.
- 6) Skoog DA, West DM, and Holler FJ. Chapter 30: High-Performance Liquid Chromatography. *Fundamentals of Analytical Chemistry*. 7th ed. United States of America: Saunders College Publishing; 1996. 701-9.
- 7) Cabri W, Ciogli A, D'Acquarica I, Mattia MD, Galletti B, Gasparrini F, et al. On-column epimerization of Dihydroartemisinin: An effective analytical approach to overcome the shortcomings of the International Pharmacopoeia monograph. *Journal of Chromatography B* 2008; 875: 180-91.
- 8) Center for Drug Evaluation and Research (CDER). Reviewer Guidance, Validation of Chromatographic Methods. 1994.

ภาคผนวก

การทดสอบประสิทธิภาพคอลัมน์

คอลัมน์ที่นำมาทดสอบประสิทธิภาพคือ Inertsil® ODS-3 (5µm, 4.6×150 mm)

สารที่ใช้ในการทดสอบคือ Uracil, Ethylbenzene และ Propylbenzene

ระบบที่ใช้ในการทดสอบประสิทธิภาพคอลัมน์ตามใบ Column Performance Report คือ

Stationary phase	:	C18 (4.6×150 mm), 5.0 µm
Mobile phase	:	Methanol : Water (85 : 15)
Flow rate	:	0.8 ml/min
Pressure	:	3.5 MPa
Column temp	:	40°C
UV detector	:	254 nm
Injection volume	:	1 µl

การเตรียมสารละลายที่ใช้ในการทดสอบประสิทธิภาพคอลัมน์

- **Uracil** ความเข้มข้นที่เหมาะสมสำหรับการทดสอบประสิทธิภาพคอลัมน์คือ 0.006 mg/ml ใน diluents เป็น Methanol : Water อัตราส่วน 85 : 15

ชั่งผง Uracil 100 mg ใส่ลงใน Volumetric flask ขนาด 100 ml ละลายด้วยน้ำร้อน จะได้สารละลาย Uracil ที่มีความเข้มข้น 1 mg/ml

เปิดสารละลาย Uracil 1 mg/ml มา 1.5 ml ใส่ลงใน Volumetric flask ขนาด 10 ml ปรับปริมาตรด้วย Methanol จะได้สารละลาย Uracil ที่มีความเข้มข้น 0.006 mg/ml ใน diluents (Methanol : Water อัตราส่วน 85 : 15) นำไปสแกน UV-Vis Spectrophotometer ในช่วง 190-400 nm โดยใช้ Methanol : Water อัตราส่วน 85 : 15 เป็น Blank

- **Ethylbenzene** (ความเข้มข้นของสารมาตรฐานคือ 870 mg/ml) ความเข้มข้นที่เหมาะสมในการทดสอบประสิทธิภาพคอลัมน์คือ 0.348 mg/ml ใน diluents เป็น Methanol : Water อัตราส่วน 85 : 15

เปิด Ethylbenzene 2 ml ใส่ลงใน Volumetric flask ขนาด 100 ml ปรับปริมาตรด้วย Methanol จะได้สารละลาย Ethylbenzene ที่มีความเข้มข้น 17.4 mg/ml

เปิดสารละลาย Ethylbenzene 17.4 mg/ml มา 1 ml ใส่ลงใน Volumetric flask ขนาด 25 ml ปรับปริมาตรด้วย Methanol จะได้สารละลาย Ethylbenzene ที่มีความเข้มข้น 0.696 mg/ml

เปิดสารละลาย Ethylbenzene 0.696 mg/ml มา 5 ml ใส่ลงใน Volumetric flask ขนาด 10

ml ปิเปต Ultrapure® water 1.5 ml ใส่ลงไป แล้วปรับปริมาตรด้วย Methanol จะได้สารละลาย Ethylbenzene ที่มีความเข้มข้น 0.348 mg/ml ใน diluents (Methanol : water อัตราส่วน 85 : 15) นำไปแสดกน UV-Vis Spectrophotometer ในช่วง 190-400 nm โดยใช้ Methanol : Water อัตราส่วน 85 : 15 เป็น Blank

- **Propylbenzene** (Density = 0.86 g/cm³) ความเข้มข้นที่เหมาะสมสำหรับการทดสอบ ประสิทธิภาพคอลัมน์คือ 0.1032 mg/ml ใน diluents เป็น Methanol : Water อัตราส่วน 85 : 15

ปิเปต Propylbenzene 1 ml ใส่ลงใน Volumetric flask ขนาด 10 ml ปรับปริมาตรด้วย Methanol จะได้สารละลาย Propylbenzene ที่มีความเข้มข้น 86 mg/ml

ปิเปตสารละลาย Propylbenzene 86 mg/ml มา 1 ml ใส่ลงใน Volumetric flask ขนาด 25 ml ปรับปริมาตรด้วย Methanol จะได้สารละลาย Propylbenzene ที่มีความเข้มข้น 3.44 mg/ml

ปิเปตสารละลาย Propylbenzene 3.44 mg/ml มา 3 ml ใส่ลงใน Volumetric flask ขนาด 10 ml ปรับปริมาตรด้วย Methanol จะได้สารละลาย Propylbenzene ที่มีความเข้มข้น 1.032 mg/ml

ปิเปตสารละลาย Propylbenzene 1.032 mg/ml มา 1 ml ใส่ลงใน Volumetric flask ขนาด 10 ml ปิเปต Ultrapure® water 1.5 ml ใส่ลงไป แล้วปรับปริมาตรด้วย Methanol จะได้สารละลาย Propylbenzene ที่มีความเข้มข้น 0.132 mg/ml ใน diluents (Methanol : Water อัตราส่วน 85 : 15) นำไป แสดกน UV-Vis Spectrophotometer ในช่วง 190-400 nm โดยใช้ Methanol : Water อัตราส่วน 85 : 15 เป็น Blank

- สารผสมระหว่าง Uracil, Ethylbenzene และ Propylbenzene

ปิเปตสารละลาย Uracil 0.006 mg/ml มา 1 ml ปิเปตสารละลาย Ethylbenzene 0.348 mg/ml มา 3 ml และปิเปตสารละลาย Propylbenzene 0.1032 mg/ml มา 3 ml ใส่ลงใน Volumetric flask ขนาด 10 ml แล้วปรับปริมาตรด้วย Mobile Phase (Methanol : water อัตราส่วน 85 : 15) นำไปแสดกน UV-Vis Spectrophotometer ในช่วง 190-400 nm โดยใช้ Methanol : Water อัตราส่วน 85 : 15 เป็น Blank

การหาความเข้มข้นที่เหมาะสมของสารละลายที่ใช้ในการทดสอบประสิทธิภาพคอลัมน์

หาโดยใช้เครื่อง UV-Vis Spectrophotometer ตรวจวัดในช่วง 190-400 nm โดยพิจารณาที่ ความยาวคลื่น 254 nm โดยลองแสดกนจากสารละลายที่มีความเข้มข้นสูงก่อน แล้วจึง dilute ลงมาจนได้ความเข้มข้นของสารละลายที่มีค่าการดูดกลืนแสง (Absorbance) เหมาะสม ซึ่งเปรียบเทียบกับค่าการดูดกลืนแสงของสารละลายยา Dihydroartemisinin 1 mg/ml ใน diluents ที่เป็น Acetonitrile : Water อัตราส่วน 60 : 40

เมื่อนำสารละลายยา Dihydroartemisinin ความเข้มข้น 1 mg/ml ไปวัดด้วยเครื่อง UV-VIS spectrophotometer พบว่า ที่ความยาวคลื่น 254 nm สารละลายยา Dihydroartemisinin มีค่าการดูดกลืนแสง เป็น 0.327239 ซึ่งเมื่อนำไปฉีดเข้าเครื่อง HPLC จะได้สัญญาณที่เหมาะสม จึงใช้เป็นตัวเปรียบเทียบในการศึกษาหาความเข้มข้นที่เหมาะสมของสารละลายที่ใช้ในการทดสอบประสิทธิภาพคอลัมน์

จากการศึกษาหาความเข้มข้นที่เหมาะสมของสารละลายที่ใช้ในการทดสอบประสิทธิภาพคอลัมน์ พบว่า หากใช้ Uracil ความเข้มข้น 0.006 mg/ml Ethylbenzene ความเข้มข้น 0.348 mg/ml และ Propylbenzene ความเข้มข้น 1.032 mg/ml ใน diluents ที่เป็น Methanol : water อัตราส่วน 85 : 15 นำไปตรวจวัดด้วยเครื่อง UV-VIS spectrophotometer ที่ความยาวคลื่น 254 nm จะได้ค่าการดูดกลืนแสงเฉลี่ยเป็น 0.500129, 0.214653 และ 0.620888 ตามลำดับ ซึ่งเป็นค่าการดูดกลืนแสงที่ใกล้เคียงกับค่าการดูดกลืนแสงของสารละลายยา Dihydroartemisinin ความเข้มข้น 1 mg/ml และน่าจะให้สัญญาณจาก HPLC ใกล้เคียงกับของสารละลายยา Dihydroartemisinin จึงเลือกสารละลาย Uracil ความเข้มข้น 0.006 mg/ml Ethylbenzene ความเข้มข้น 0.348 mg/ml และ Propylbenzene ความเข้มข้น 1.032 mg/ml ใน diluents ที่เป็น Methanol : water อัตราส่วน 85 : 15 เป็นความเข้มข้นที่ใช้สำหรับการทดสอบประสิทธิภาพคอลัมน์ Inertsil® ODS-3 (5 μ m, 4.6 \times 150 mm)

จากการฉีดสารละลาย Uracil ความเข้มข้น 0.006 mg/ml เข้าเครื่อง HPLC พบว่าได้ผลการทดลอง ดังรูปที่ 1 และตารางที่ 1

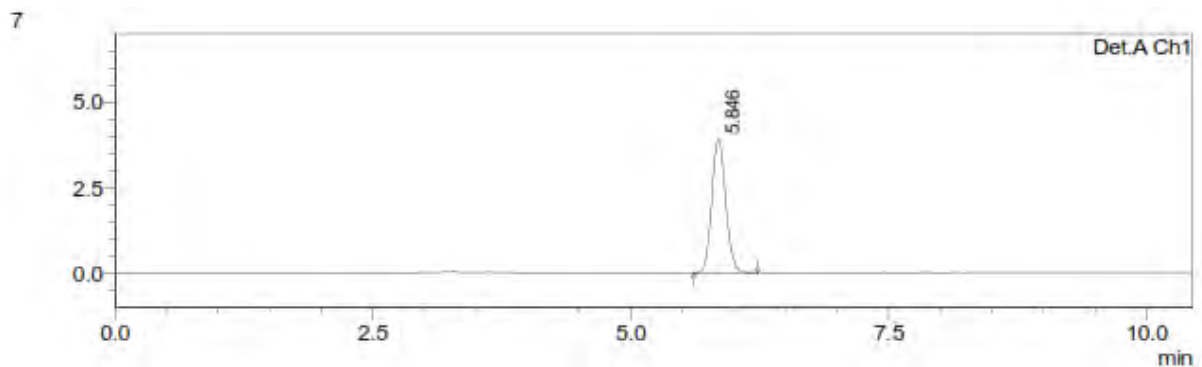


รูปที่ 1 แสดงโครมาโทแกรมของสารละลาย Uracil ความเข้มข้น 0.006 mg/ml

	Uracil ความเข้มข้น 0.006 mg/ml ใน Methanol : water อัตราส่วน 85 : 15					
	1	2	3	mean	SD	%RSD
Retention time	2.152	2.152	2.152	2.152	0	0
Area	31716	31907	31118	31580.33	411.624	1.303419
% Area	100	100	100	100	0	0
Tailing factor	1.327	1.327	1.323	1.325667	0.002309	0.174207
Resolution	-	-	-	-	-	-
Capacity factor	-	-	-	-	-	-
Theoretical Plates	20862.041	20884.336	20994.363	20913.58	70.84269	0.33874
HETP	47.934	47.883	47.632	47.81633	0.161661	0.338088

ตารางที่ 1 แสดง peak properties ของสารละลาย Uracil ความเข้มข้น 0.006 mg/ml

จากการฉีดสารละลาย Ethylbenzene ความเข้มข้น 0.348 mg/ml เข้าเครื่อง HPLC พบว่าได้ผลการทดลองดังรูปที่ 2 และตารางที่ 2

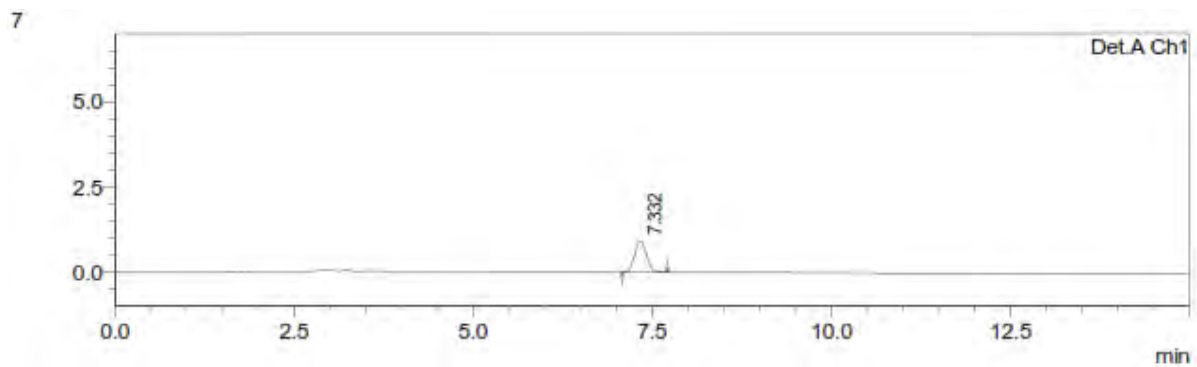


รูปที่ 2 แสดง โครมาโทแกรมของสารละลาย Ethylbenzene ความเข้มข้น 0.348 mg/ml

	Ethylbenzene ความเข้มข้น 0.348 mg/ml ใน Methanol : water อัตราส่วน 85 : 15					
	1	2	3	mean	SD	%RSD
Retention time	5.846	5.831	5.841	5.839333	0.007638	0.130796
Area	36699	36969	37218	36962	259.5708	0.702264
% Area	100	100	100	100	0	0
Tailing factor	1.139	1.142	1.135	1.138667	0.003512	0.308421
Resolution	-	-	-	-	-	-
Capacity factor	-	-	-	-	-	-
Theoretical Plates	56479.148	56230.429	56492.417	56400.66	147.5776	0.261659
HETP	17.706	17.784	17.701	17.73033	0.046544	0.26251

ตารางที่ 2 แสดง peak properties ของสารละลาย Ethylbenzene ความเข้มข้น 0.348 mg/ml

จากการฉีดสารละลาย Propylbenzene ความเข้มข้น 1.032 mg/ml เข้าเครื่อง HPLC พบว่าได้ผลการทดลองดังรูปที่ 3 และตารางที่ 3

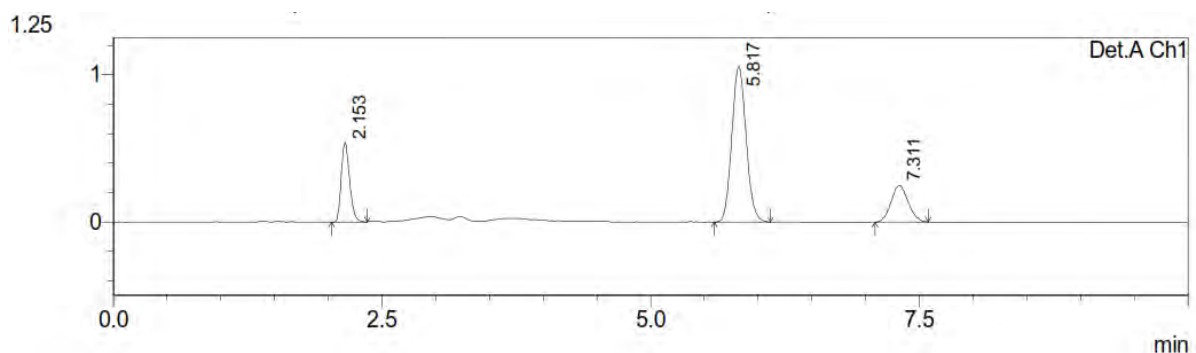


รูปที่ 3 แสดงโครมาโทแกรมของสารละลาย Propylbenzene ความเข้มข้น 1.032 mg/ml

	Propylbenzene ความเข้มข้น 0.1032 mg/ml ใน Methanol : water อัตราส่วน 85 : 15					
	1	2	3	mean	SD	%RSD
Retention time	7.332	7.343	7.321	7.332	0.011	0.150027
Area	10466	10493	10518	10492.33	26.00641	0.247861
% Area	100	100	100	100	0	0
Tailing factor	1.118	1.107	1.117	1.114	0.006083	0.546029
Resolution	-	-	-	-	-	-
Capacity factor	-	-	-	-	-	-
Theoretical Plates	61579.901	61839.962	61421.542	61613.8	211.2599	0.342878
HETP	16.239	16.171	16.281	16.23033	0.05551	0.342012

ตารางที่ 3 แสดง peak properties ของสารละลาย Propylbenzene ความเข้มข้น 1.032 mg/ml

เมื่อนำสารละลายผสมระหว่าง Uracil ความเข้มข้น 0.006 mg/ml Ethylbenzene ความเข้มข้น 0.348 mg/ml และ Propylbenzene ความเข้มข้น 1.032 mg/ml ใน diluents ที่เป็น Methanol : water อัตราส่วน 85 : 15 มาฉีดเข้าเครื่อง HPLC ได้ผลการทดลองดังรูปที่ 4 และตารางที่ 4



รูปที่ 4 แสดงโครมาโทแกรมของสารละลายผสมระหว่าง Uracil ความเข้มข้น 0.006 mg/ml Ethylbenzene ความเข้มข้น 0.348 mg/ml และ Propylbenzene ความเข้มข้น 1.032 mg/ml ตามลำดับ

		สารละลายผสม Uracil, Ethylbenzene และ Propylbenzene ใน Methanol : water (85 : 15)					
		1	2	3	mean	SD	%RSD
Peak 1	Retention time	2.153	2.152	2.151	2.152	0.001	0.046468
	Area	2891	3170	3155	3072	156.92992	5.108396
	% Area	18.717	18.888	18.817	18.807333	0.0859089	0.456784
	Tailing factor	1.331	1.33	1.327	1.3293333	0.0020817	0.156595
	Resolution	-	-	-	-	-	-
	Capacity factor	-	-	-	-	-	-
	Theoretical Plates	20761.104	20865.605	20855.577	20827.429	57.657274	0.276833
	HETP	48.167	47.926	47.949	48.014	0.133	0.277003
Peak 2	Retention time	5.817	5.81	5.787	5.8046667	0.015695	0.270386
	Area	9793	10585	10592	10323.333	459.29547	4.449101
	% Area	63.4	63.075	63.177	63.217333	0.1662117	0.262921
	Tailing factor	1.145	1.145	1.141	1.1436667	0.0023094	0.20193
	Resolution	18.052	18.119	18.005	18.058667	0.0572917	0.317253
	Capacity factor	1.702	1.699	1.69	1.697	0.006245	0.368002
	Theoretical Plates	56996.175	57677.62	57139.904	57271.233	359.20371	0.627197
	HETP	17.545	17.338	17.501	17.461333	0.109052	0.624534
Peak 3	Retention time	7.311	7.298	7.263	7.2906667	0.0248261	0.340518
	Area	2762	3027	3019	2936	150.7415	5.134247
	% Area	17.883	18.037	18.007	17.975667	0.0816415	0.454178
	Tailing factor	1.109	1.11	1.119	1.1126667	0.0055076	0.494988
	Resolution	5.377	5.389	5.335	5.367	0.0283549	0.528319
	Capacity factor	2.396	2.391	2.376	2.3876667	0.0104083	0.435921
	Theoretical Plates	61605.888	62110.813	61302.057	61672.919	408.52352	0.662403
	HETP	16.232	16.1	16.313	16.215	0.1075128	0.663045

ตารางที่ 4 แสดง peak properties ของสารละลายผสมระหว่าง Uracil ความเข้มข้น 0.006 mg/ml (peak 1)

Ethylbenzene ความเข้มข้น 0.348 mg/ml (peak 2) และ Propylbenzene ความเข้มข้น 1.032 mg/ml (peak 3)

จากผลการทดสอบคอลัมน์ที่ระบุไว้ในใบ Column Performance Report ดูผลจากโครมาโทแกรมของ

Propylbenzene โดยมี parameter ต่างๆ ดังนี้

- Retention Time มีค่าเป็น 6.16
- Capacity Factor (k') มีค่าเป็น 2.16
- Theoretical Plates (N) มีค่าเป็น 13299

- Peak Asymmetry (Tailing Factor) มีค่าเป็น 1.04

จากผลการทดสอบประสิทธิภาพคอลัมน์ พบว่าประสิทธิภาพของคอลัมน์โดยรวมยังจัดว่าอยู่ในสภาพดี โดยโครมาโทแกรมของ Propylbenzene มี parameter ต่างๆ เฉลี่ย ดังนี้

- Retention Time มีค่าเป็น 7.29

- Capacity Factor (k') มีค่าเป็น 2.39

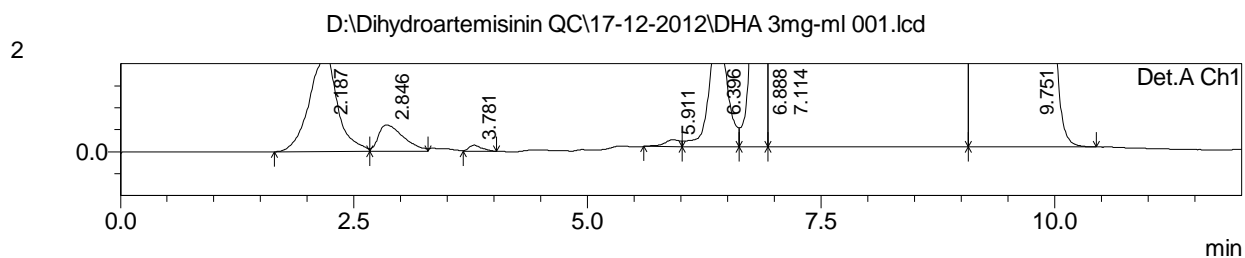
- Theoretical Plates (N) มีค่าเป็น 61673

- Peak Asymmetry (Tailing Factor) มีค่าเป็น 1.11

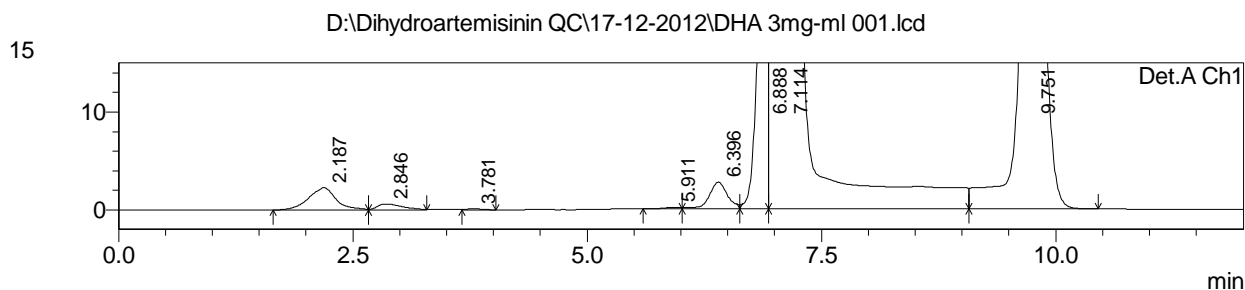
ซึ่งการที่ค่า parameter ต่างๆ นี้มีความแตกต่างไปจากค่า parameter ที่ระบุไว้ในใบ Column Performance Report ก็เนื่องมาจากการควบคุมสภาวะต่างๆ ระหว่างการทดสอบประสิทธิภาพคอลัมน์มีความแตกต่างกัน โดยใบ Column Performance Report กำหนดให้มีการควบคุมอุณหภูมิที่ 40°C แต่ในการทดสอบจริงไม่ได้มีการควบคุมอุณหภูมิเนื่องจากข้อจำกัดของเครื่อง HPLC ที่ใช้

==== Shimadzu LCsolution Analysis Report ====

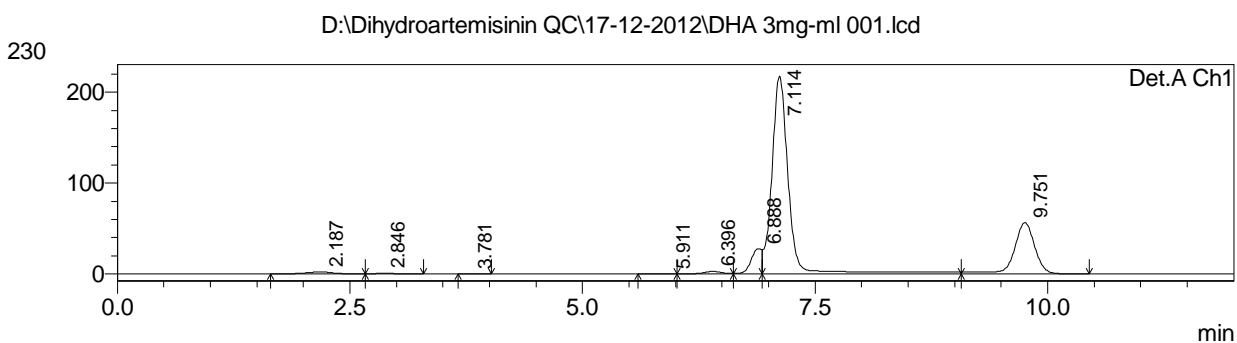
Sample Name : D:\Dihydroartemisinin QC\17-12-2012\DHA 3mg-ml 001.lcd
 Vial # : 48
 Injection Volume : 20 uL
 Data File Name : DHA 3mg-ml 001.lcd
 Method File Name : ACN-H2O 60-40 (12min).lcm
 Batch File Name : Collect fraction Batch.lcb
 Report File Name : Default.lcr
 Data Acquired : 17/12/2555 13:40:21
 Data Processed : 17/12/2555 13:52:22



1 Det.A Ch1/216nm



1 Det.A Ch1/216nm



1 Det.A Ch1/216nm

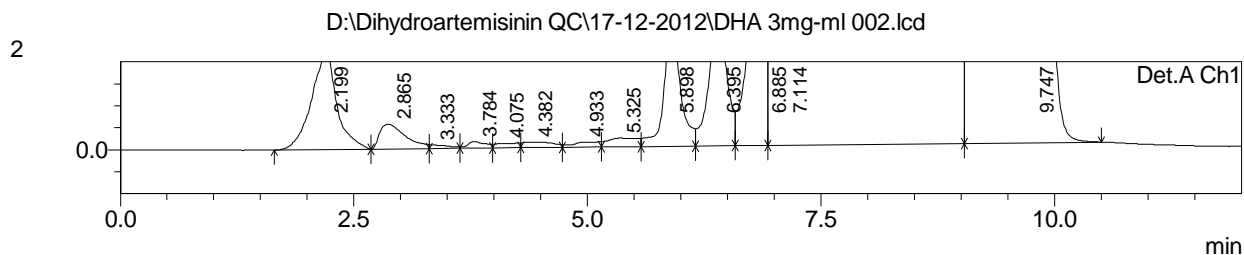
PeakTable

Detector A Ch1 216nm

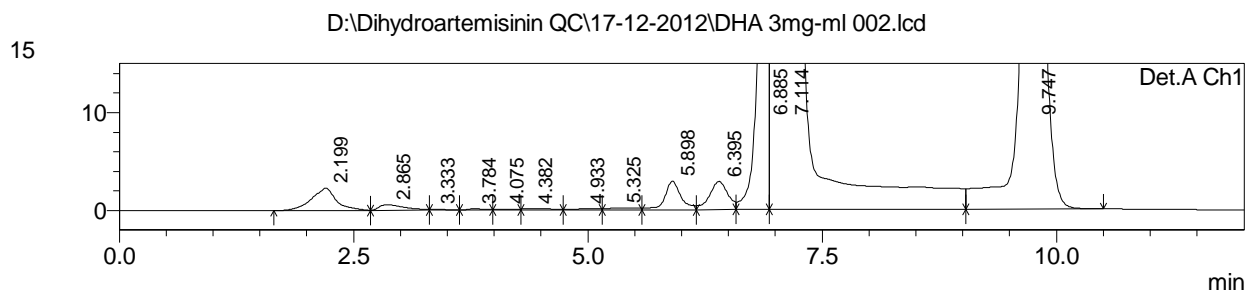
Peak#	Ret. Time	Area	Area %	Resolution	Tailing Factor	k'
1	2.187	46301	1.175	0.000	1.050	0.000
2	2.846	11370	0.289	1.317	0.000	0.302
3	3.781	1266	0.032	2.507	0.000	0.729
4	5.911	1882	0.048	5.421	0.000	1.703
5	6.396	36787	0.934	1.113	0.000	1.925
6	6.888	224794	5.706	0.780	0.000	2.150
7	7.114	2743185	69.628	0.369	0.000	2.254
8	9.751	874188	22.189	7.641	0.981	3.460
Total		3939773	100.000			

==== Shimadzu LCsolution Analysis Report ====

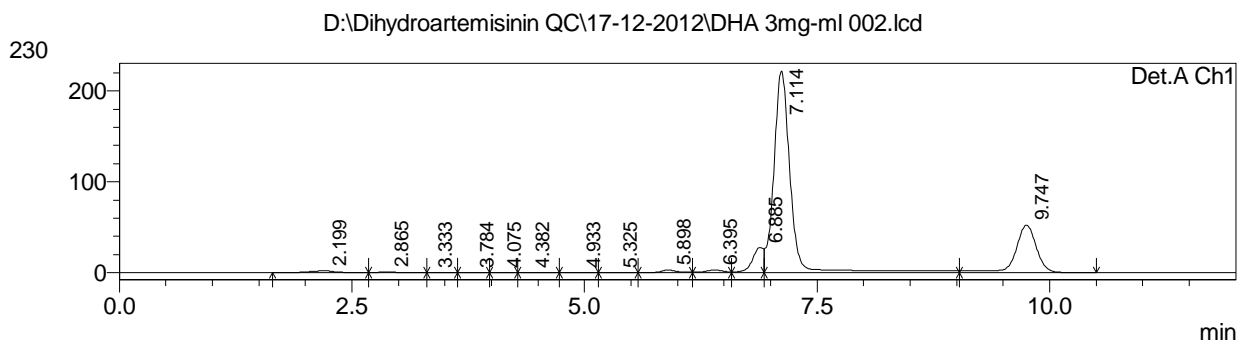
Sample Name : D:\Dihydroartemisinin QC\17-12-2012\DHA 3mg-ml 002.lcd
 Vail # : 48
 Injection Volume : 20 uL
 Data File Name : DHA 3mg-ml 002.lcd
 Method File Name : ACN-H2O 60-40 (12min).lcm
 Batch File Name : Collect fraction Batch.lcb
 Report File Name : Default.lcr
 Data Acquired : 17/12/2555 17:05:05
 Data Processed : 17/12/2555 17:17:08



1 Det.A Ch1/216nm



1 Det.A Ch1/216nm



1 Det.A Ch1/216nm

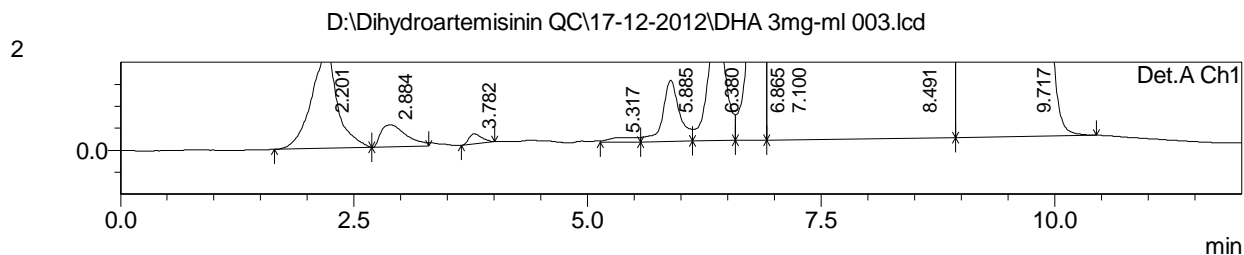
PeakTable

Detector A Ch1 216nm

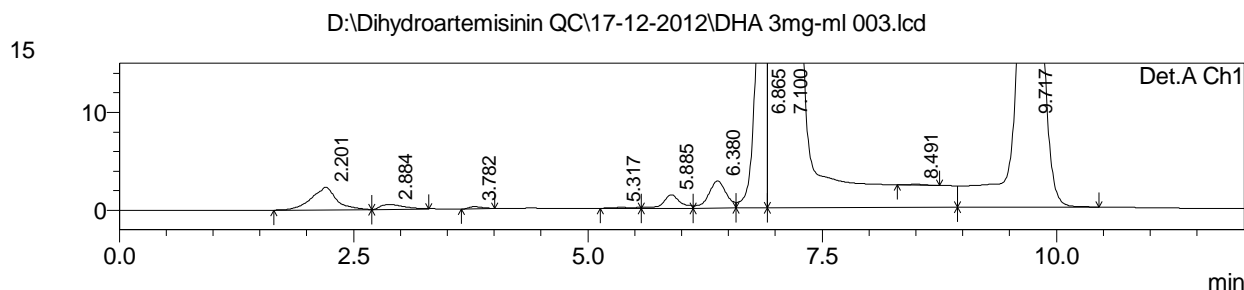
Peak#	Ret. Time	Area	Area %	Resolution	Tailing Factor	k'
1	2.199	42026	1.057	0.000	1.002	0.000
2	2.865	10916	0.275	1.410	0.000	0.303
3	3.333	1131	0.028	0.000	0.000	0.516
4	3.784	2021	0.051	0.000	0.000	0.721
5	4.075	1801	0.045	0.093	0.000	0.853
6	4.382	2840	0.071	0.093	0.000	0.993
7	4.933	2300	0.058	0.337	0.000	1.244
8	5.325	4496	0.113	0.102	0.000	1.422
9	5.898	34993	0.880	0.205	0.000	1.682
10	6.395	39124	0.984	1.530	0.000	1.908
11	6.885	238621	6.000	0.814	0.000	2.131
12	7.114	2778856	69.876	0.399	0.000	2.235
13	9.747	817726	20.562	7.648	0.973	3.433
Total		3976851	100.000			

==== Shimadzu LCsolution Analysis Report ====

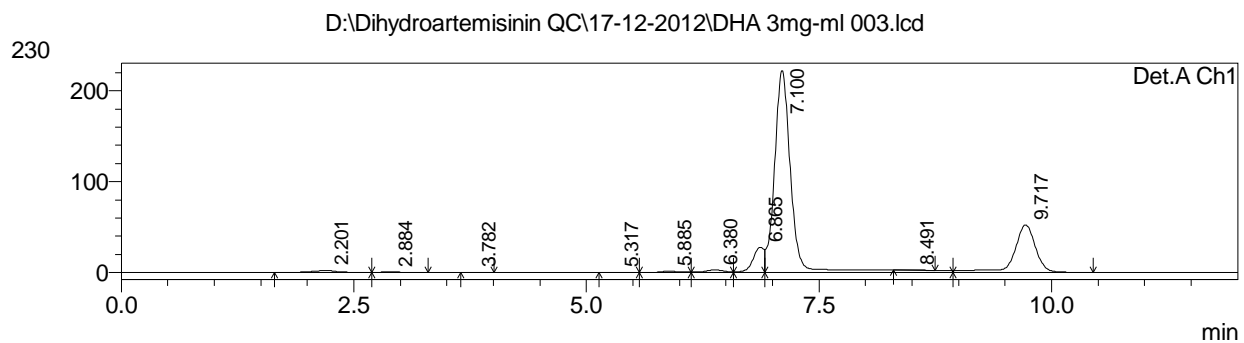
Sample Name : D:\Dihydroartemisinin QC\17-12-2012\DHA 3mg-ml 003.lcd
 Vial # : 48
 Injection Volume : 20 uL
 Data File Name : DHA 3mg-ml 003.lcd
 Method File Name : ACN-H2O 60-40 (12min).lcm
 Batch File Name : Collect fraction Batch.lcb
 Report File Name : Default.lcr
 Data Acquired : 17/12/2555 17:18:41
 Data Processed : 17/12/2555 17:30:44



1 Det.A Ch1/216nm



1 Det.A Ch1/216nm



1 Det.A Ch1/216nm

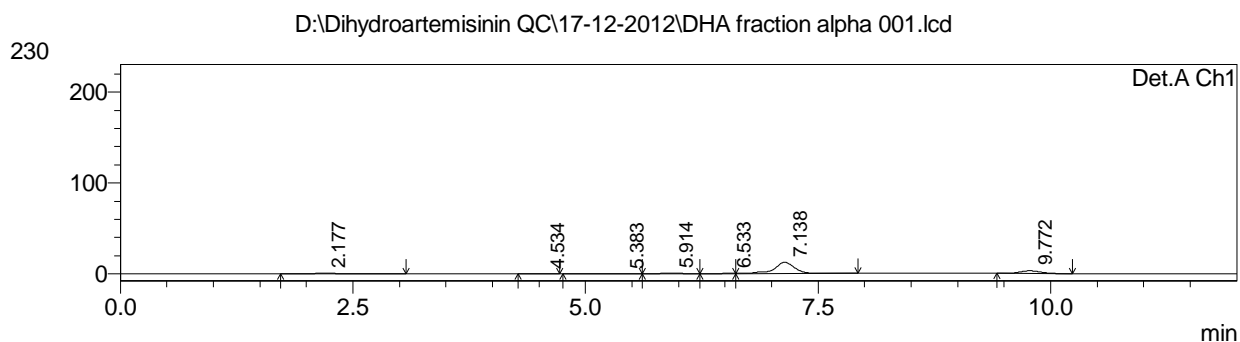
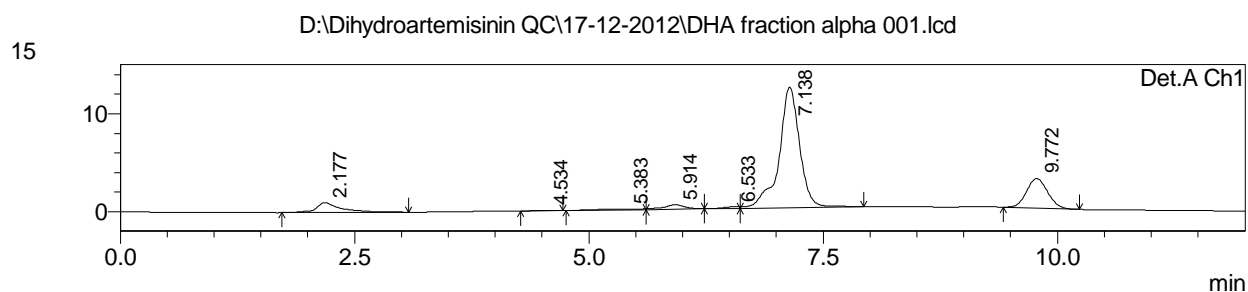
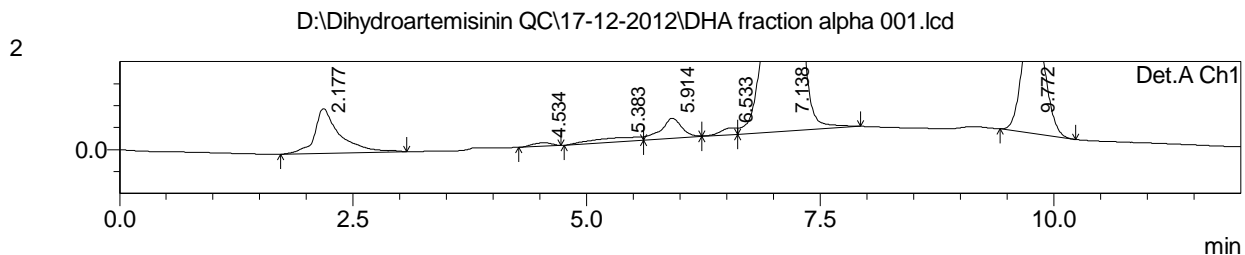
PeakTable

Detector A Ch1 216nm

Peak#	Ret. Time	Area	Area %	Resolution	Tailing Factor	k'
1	2.201	42884	1.088	0.000	0.998	0.000
2	2.884	9626	0.244	1.445	0.000	0.310
3	3.782	2223	0.056	2.434	1.433	0.718
4	5.317	2258	0.057	1.291	0.000	1.415
5	5.885	17544	0.445	0.472	0.000	1.673
6	6.380	36722	0.932	1.536	0.000	1.898
7	6.865	231544	5.876	0.997	0.000	2.119
8	7.100	2772623	70.358	0.502	0.000	2.225
9	8.491	1011	0.026	4.446	1.092	2.857
10	9.717	824326	20.918	3.474	0.961	3.414
Total		3940761	100.000			

==== Shimadzu LCsolution Analysis Report ====

Sample Name : D:\Dihydroartemisinin QC\17-12-2012\DHA fraction alpha 001.lcd
 Vail # : 50
 Injection Volume : 60 uL
 Data File Name : DHA fraction alpha 001.lcd
 Method File Name : ACN-H2O 60-40 (12min).lcm
 Batch File Name : Collect fraction Batch.lcb
 Report File Name : Default.lcr
 Data Acquired : 17/12/2555 15:43:46
 Data Processed : 17/12/2555 15:55:47



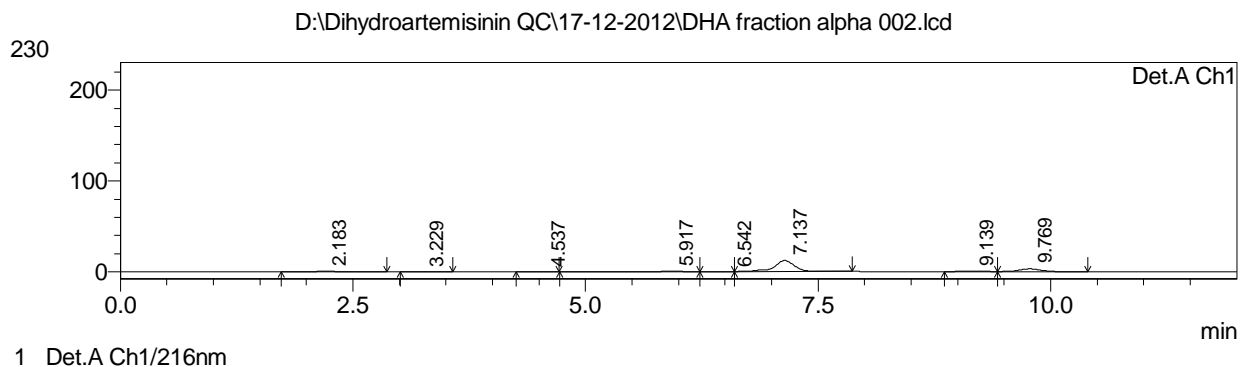
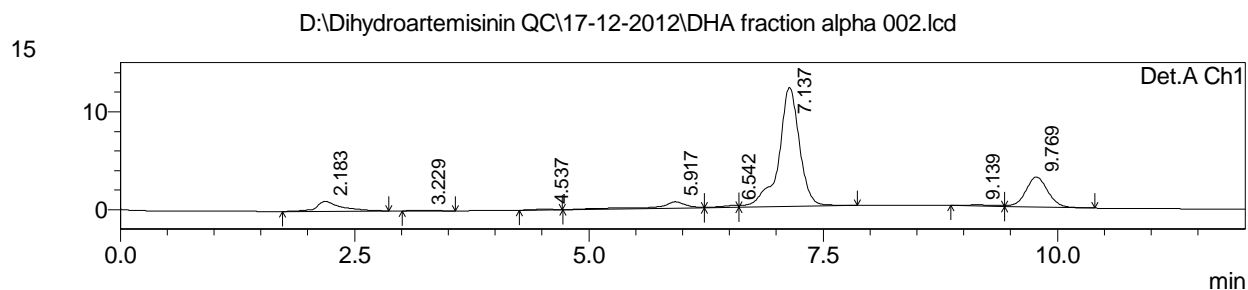
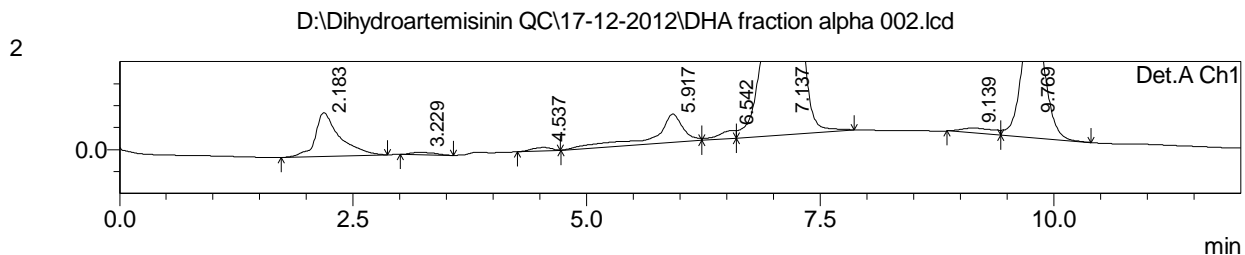
PeakTable

Detector A Ch1 216nm

Peak#	Ret. Time	Area	Area %	Resolution	Tailing Factor	k'
1	2.177	18992	7.083	0.000	1.503	0.000
2	4.534	1103	0.411	6.132	0.900	1.083
3	5.383	3554	1.325	0.639	0.000	1.473
4	5.914	7261	2.708	0.399	0.000	1.717
5	6.533	1878	0.700	1.102	0.000	2.002
6	7.138	187905	70.073	1.084	0.873	2.279
7	9.772	47462	17.699	6.703	1.112	3.490
Total		268156	100.000			

==== Shimadzu LCsolution Analysis Report ====

Sample Name : D:\Dihydroartemisinin QC\17-12-2012\DHA fraction alpha 002.lcd
 Vail # : 50
 Injection Volume : 60 uL
 Data File Name : DHA fraction alpha 002.lcd
 Method File Name : ACN-H2O 60-40 (12min).lcm
 Batch File Name : Collect fraction Batch.lcb
 Report File Name : Default.lcr
 Data Acquired : 17/12/2555 15:56:09
 Data Processed : 17/12/2555 16:08:11



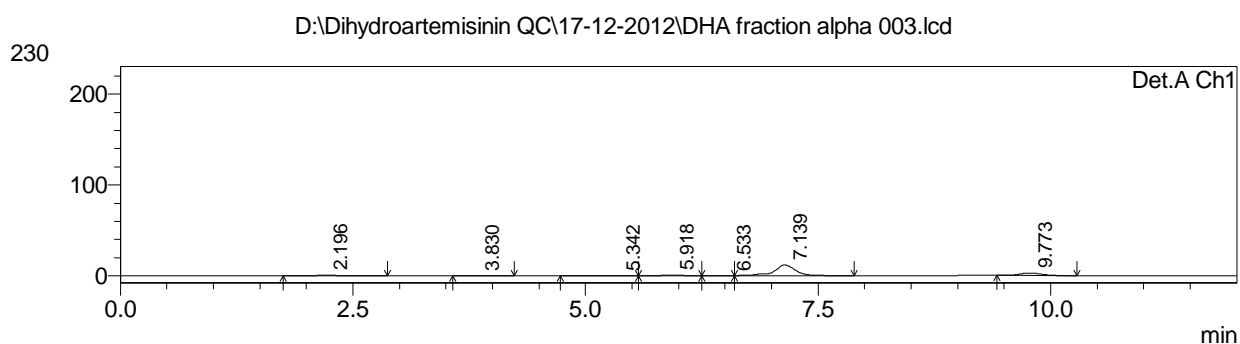
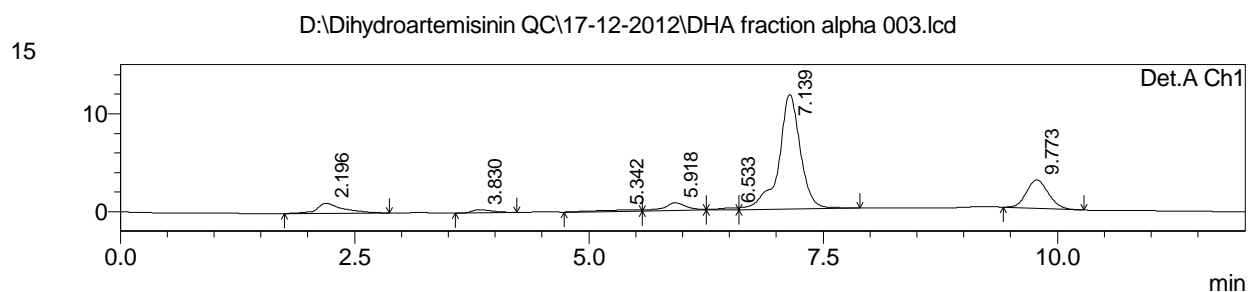
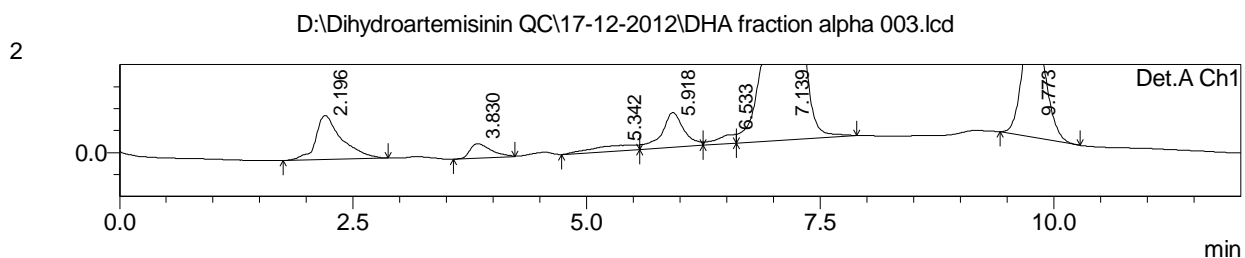
PeakTable

Detector A Ch1 216nm

Peak#	Ret. Time	Area	Area %	Resolution	Tailing Factor	k'
1	2.183	18125	6.536	0.000	1.399	0.000
2	3.229	1036	0.374	2.396	1.236	0.479
3	4.537	1113	0.401	3.064	0.845	1.078
4	5.917	14196	5.119	3.695	0.000	1.711
5	6.542	2354	0.849	0.904	0.000	1.997
6	7.137	187209	67.510	0.863	0.865	2.269
7	9.139	2947	1.063	0.688	0.000	3.186
8	9.769	50326	18.148	0.214	1.058	3.475
Total		277306	100.000			

==== Shimadzu LCsolution Analysis Report ====

Sample Name : D:\Dihydroartemisinin QC\17-12-2012\DHA fraction alpha 003.lcd
 Vial # : 50
 Injection Volume : 60 uL
 Data File Name : DHA fraction alpha 003.lcd
 Method File Name : ACN-H2O 60-40 (12min).lcm
 Batch File Name : Collect fraction Batch.lcb
 Report File Name : Default.lcr
 Data Acquired : 17/12/2555 16:08:34
 Data Processed : 17/12/2555 16:20:35



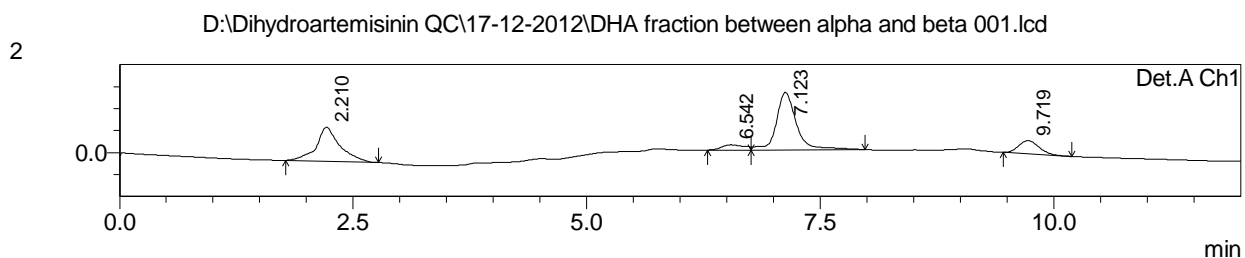
PeakTable

Detector A Ch1 216nm

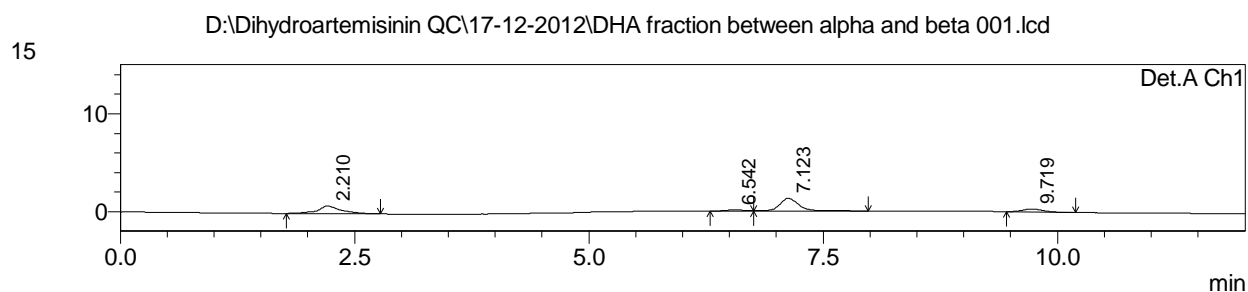
Peak#	Ret. Time	Area	Area %	Resolution	Tailing Factor	k'
1	2.196	19726	7.033	0.000	1.384	0.000
2	3.830	5211	1.858	3.862	1.758	0.744
3	5.342	4241	1.512	1.047	0.000	1.433
4	5.918	13150	4.689	0.404	0.000	1.695
5	6.533	2984	1.064	0.427	0.000	1.976
6	7.139	187957	67.017	0.421	0.883	2.251
7	9.773	47191	16.826	6.464	1.149	3.451
Total		280460	100.000			

==== Shimadzu LCsolution Analysis Report ====

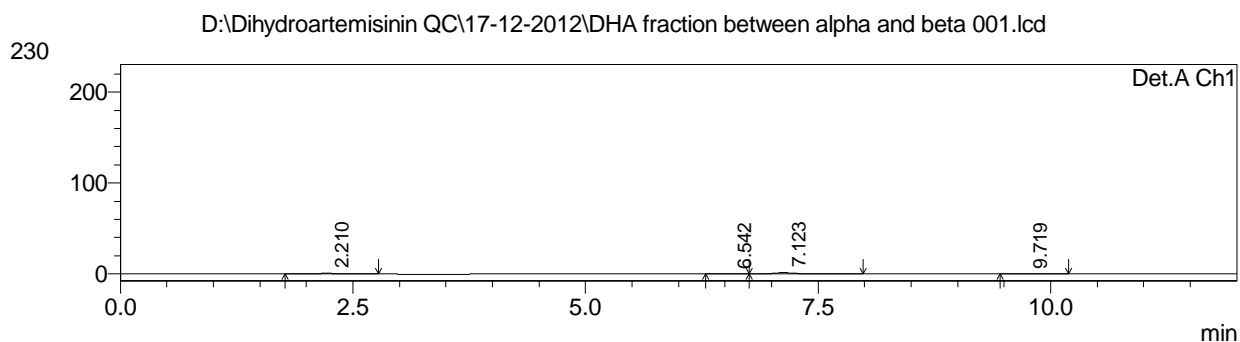
D:\Dihydroartemisinin QC\17-12-2012\DHA fraction between alpha and beta 001.lcd
 Sample Name : DHA between Alpha and Beta fraction from DHA 3 mg/ml in ACN:Water (60:40) 001
 Vial # : 52
 Injection Volume : 60 uL
 Data File Name : DHA fraction between alpha and beta 001.lcd
 Method File Name : ACN-H2O 60-40 (12min).lcm
 Batch File Name : Collect fraction Batch.lcb
 Report File Name : Default.lcr
 Data Acquired : 17/12/2555 19:00:54
 Data Processed : 17/12/2555 19:12:57



1 Det.A Ch1/216nm



1 Det.A Ch1/216nm



1 Det.A Ch1/216nm

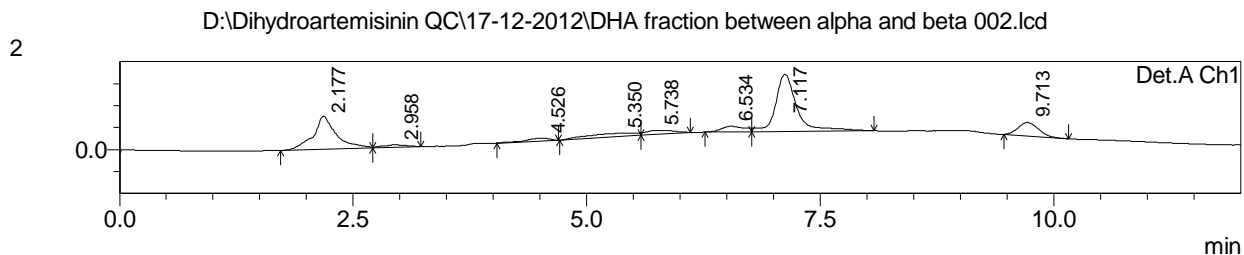
PeakTable

Detector A Ch1 216nm

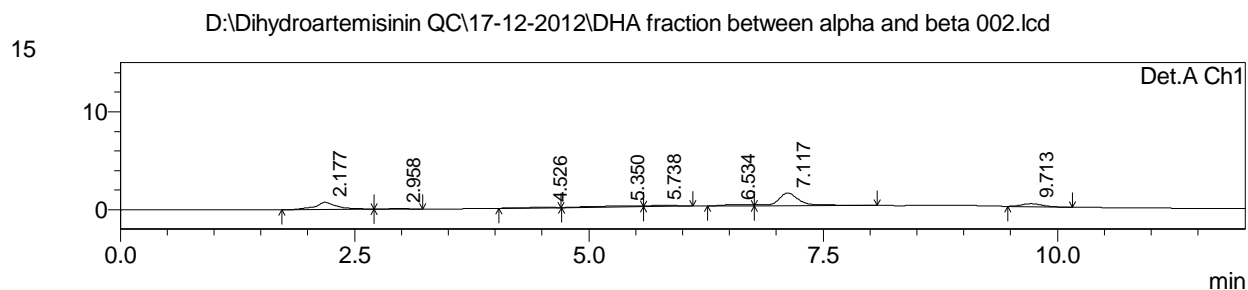
Peak#	Ret. Time	Area	Area %	Resolution	Tailing Factor	k'
1	2.210	13667	34.318	0.000	1.137	0.000
2	6.542	1987	4.990	6.802	0.000	1.960
3	7.123	19535	49.052	0.937	0.000	2.222
4	9.719	4636	11.640	6.719	1.191	3.397
Total		39825	100.000			

==== Shimadzu LCsolution Analysis Report ====

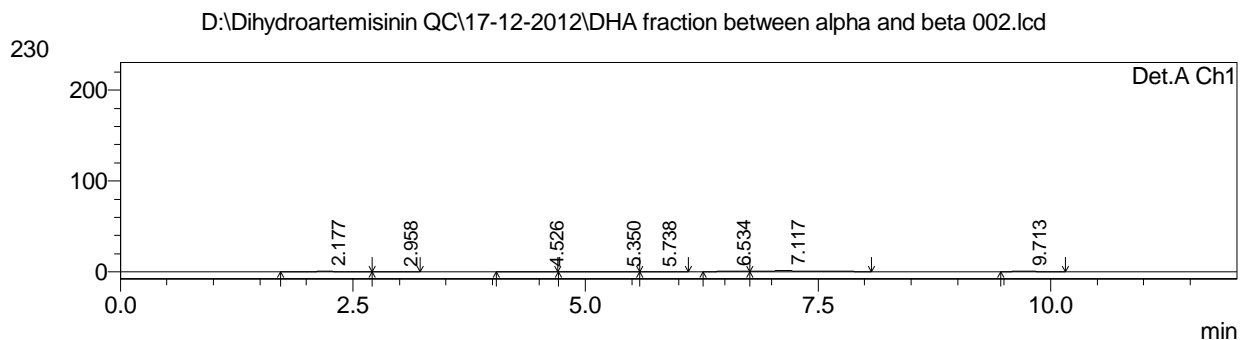
D:\Dihydroartemisinin QC\17-12-2012\DHA fraction between alpha and beta 002.lcd
 Sample Name : DHA between Alpha and Beta fraction from DHA 3 mg/ml in ACN:Water (60:40) 002
 Vial # : 52
 Injection Volume : 60 uL
 Data File Name : DHA fraction between alpha and beta 002.lcd
 Method File Name : ACN-H2O 60-40 (12min).lcm
 Batch File Name : Collect fraction Batch.lcb
 Report File Name : Default.lcr
 Data Acquired : 17/12/2555 19:13:21
 Data Processed : 17/12/2555 19:25:23



1 Det.A Ch1/216nm



1 Det.A Ch1/216nm



1 Det.A Ch1/216nm

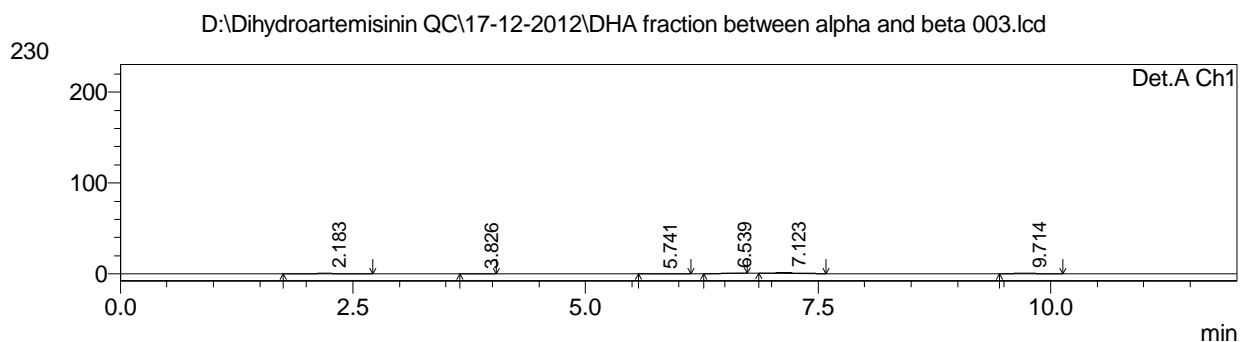
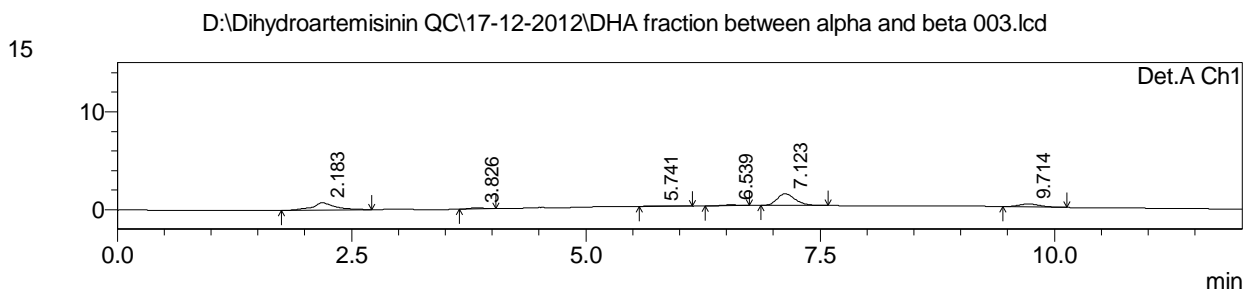
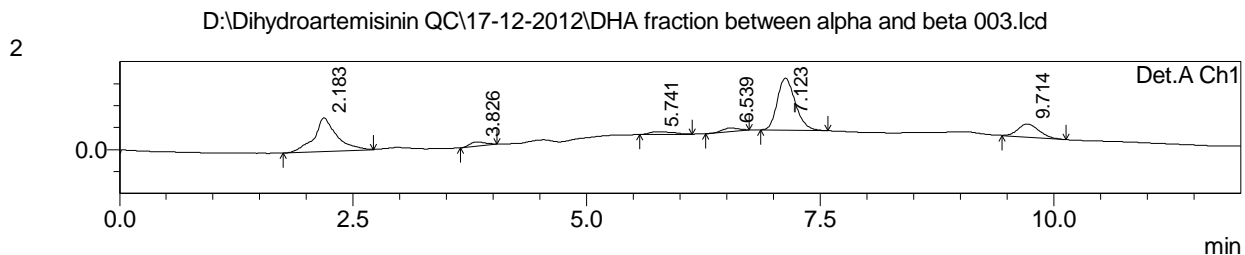
PeakTable

Detector A Ch1 216nm

Peak#	Ret. Time	Area	Area %	Resolution	Tailing Factor	k'
1	2.177	12820	26.959	0.000	1.219	0.000
2	2.958	1022	2.149	1.664	0.000	0.359
3	4.526	1439	3.027	3.115	0.000	1.079
4	5.350	3032	6.375	0.699	0.000	1.457
5	5.738	1778	3.739	0.308	0.000	1.635
6	6.534	2270	4.774	0.845	0.000	2.001
7	7.117	20540	43.194	0.706	0.000	2.269
8	9.713	4652	9.784	6.670	1.187	3.461
Total		47553	100.000			

==== Shimadzu LCsolution Analysis Report ====

D:\Dihydroartemisinin QC\17-12-2012\DHA fraction between alpha and beta 003.lcd
 Sample Name : DHA between Alpha and Beta fraction from DHA 3 mg/ml in ACN:Water (60:40) 003
 Vial # : 52
 Injection Volume : 60 uL
 Data File Name : DHA fraction between alpha and beta 003.lcd
 Method File Name : ACN-H2O 60-40 (12min).lcm
 Batch File Name : Collect fraction Batch.lcb
 Report File Name : Default.lcr
 Data Acquired : 17/12/2555 19:25:46
 Data Processed : 17/12/2555 19:37:47



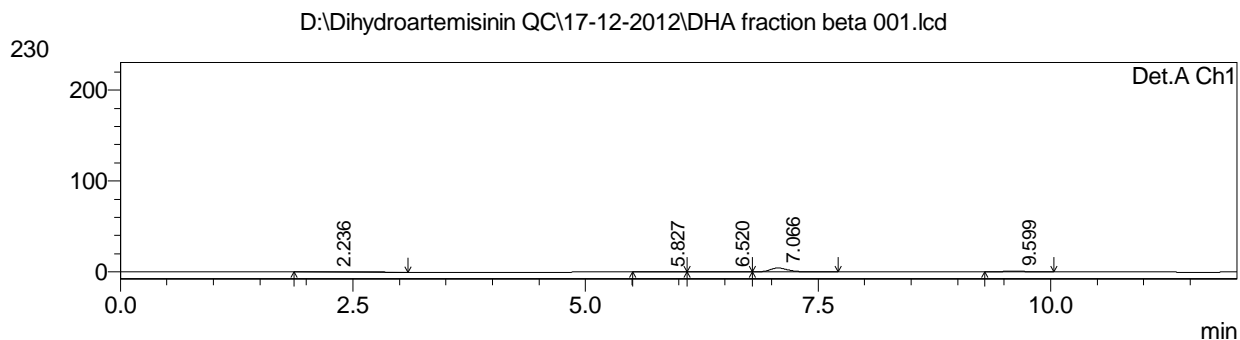
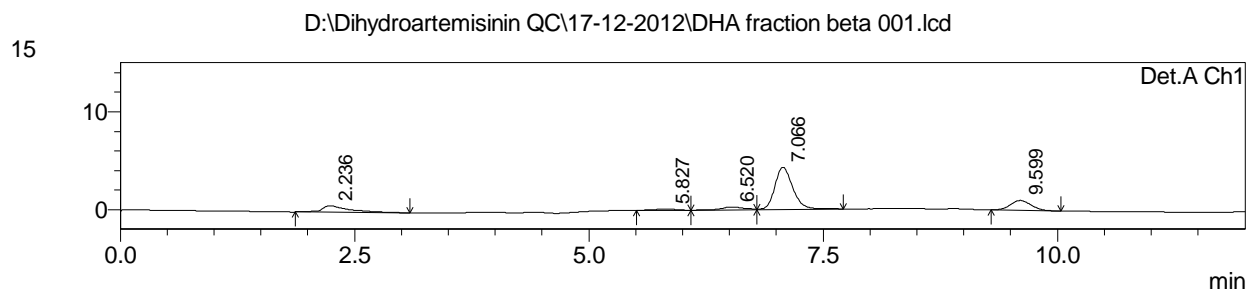
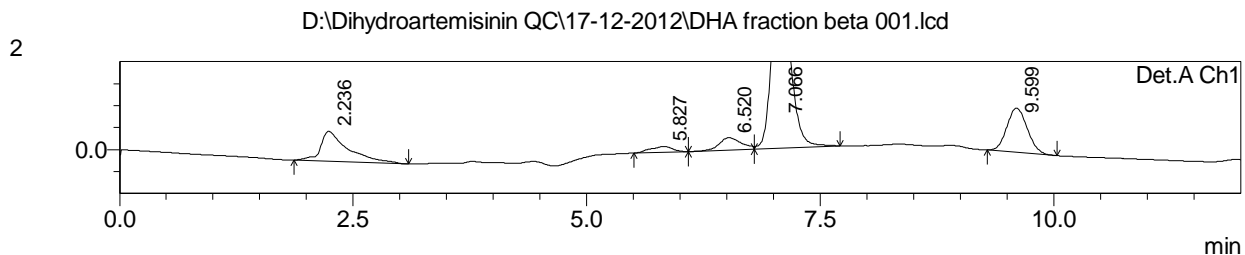
PeakTable

Detector A Ch1 216nm

Peak#	Ret. Time	Area	Area %	Resolution	Tailing Factor	k'
1	2.183	12971	35.394	0.000	1.166	0.000
2	3.826	1129	3.081	4.722	1.187	0.752
3	5.741	1021	2.786	4.956	1.685	1.629
4	6.539	1002	2.734	2.006	1.004	1.995
5	7.123	15821	43.170	1.671	1.281	2.262
6	9.714	4703	12.834	6.630	1.203	3.449
Total		36647	100.000			

==== Shimadzu LCsolution Analysis Report ====

Sample Name : D:\Dihydroartemisinin QC\17-12-2012\DHA fraction beta 001.lcd
 Vial # : 53
 Injection Volume : 60 µL
 Data File Name : DHA fraction beta 001.lcd
 Method File Name : ACN-H2O 60-40 (12min).lcm
 Batch File Name : Collect fraction Batch.lcb
 Report File Name : Default.lcr
 Data Acquired : 17/12/2555 20:41:04
 Data Processed : 17/12/2555 20:53:07



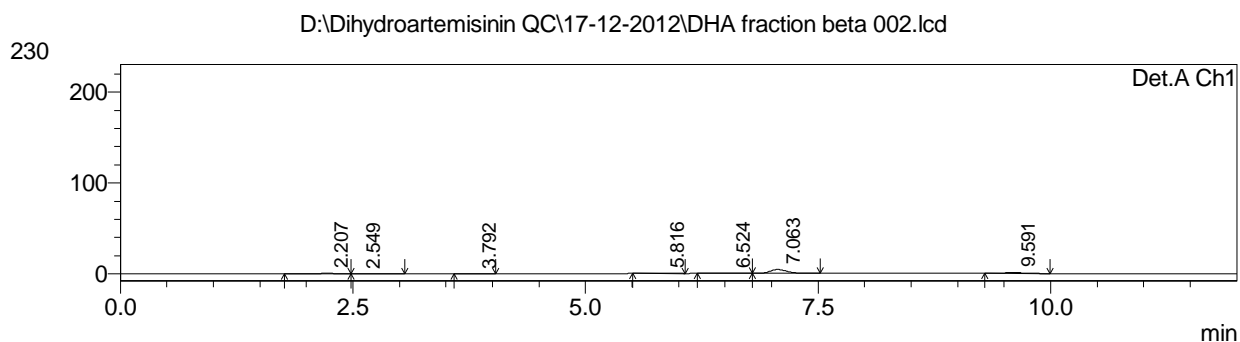
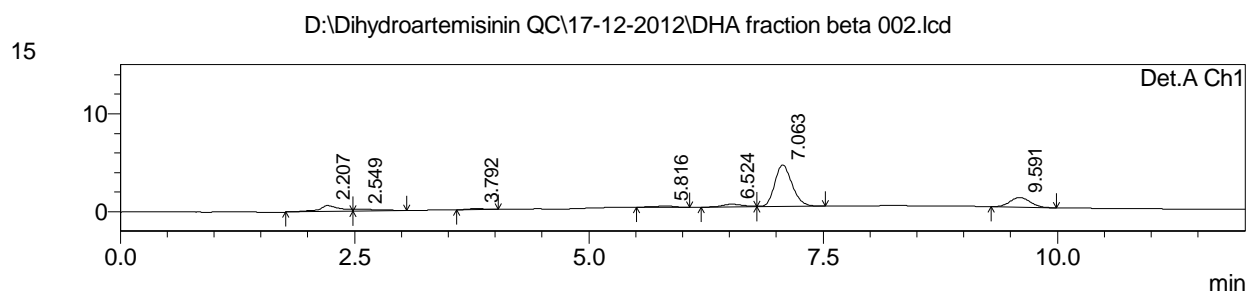
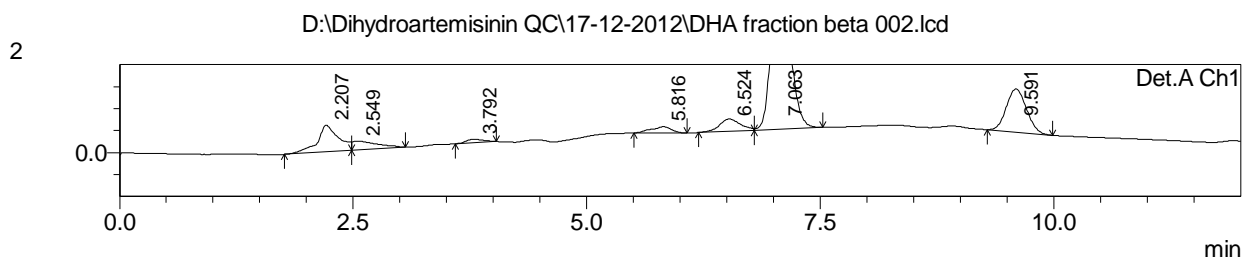
PeakTable

Detector A Ch1 216nm

Peak#	Ret. Time	Area	Area %	Resolution	Tailing Factor	k'
1	2.236	13970	14.979	0.000	1.771	0.000
2	5.827	2164	2.320	8.178	0.884	1.606
3	6.520	4691	5.030	1.574	0.000	1.916
4	7.066	57132	61.259	1.393	1.234	2.160
5	9.599	15306	16.412	6.669	1.116	3.293
Total		93263	100.000			

==== Shimadzu LCsolution Analysis Report ====

Sample Name : D:\Dihydroartemisinin QC\17-12-2012\DHA fraction beta 002.lcd
 Vial # : 53
 Injection Volume : 60 uL
 Data File Name : DHA fraction beta 002.lcd
 Method File Name : ACN-H2O 60-40 (12min).lcm
 Batch File Name : Collect fraction Batch.lcb
 Report File Name : Default.lcr
 Data Acquired : 17/12/2555 20:53:29
 Data Processed : 17/12/2555 21:05:31



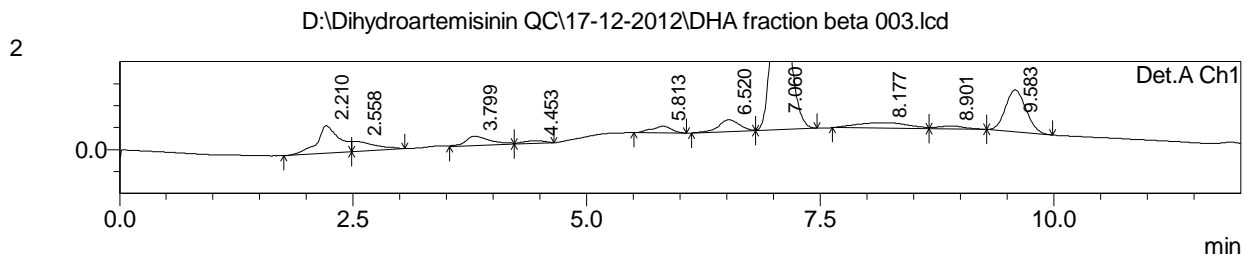
PeakTable

Detector A Ch1 216nm

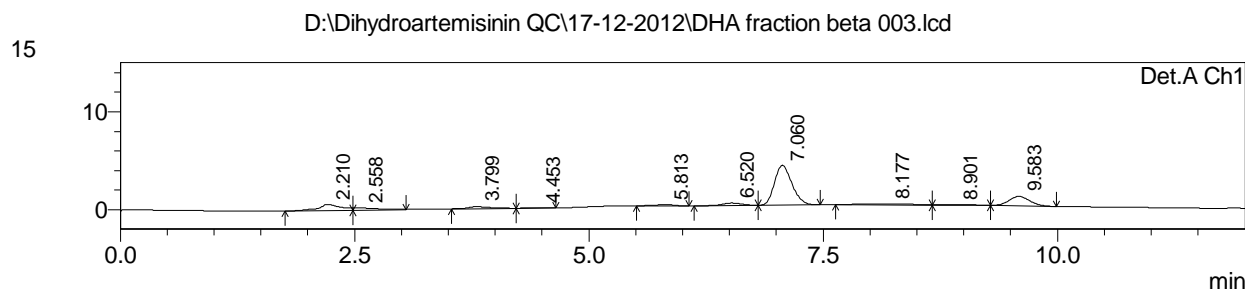
Peak#	Ret. Time	Area	Area %	Resolution	Tailing Factor	k'
1	2.207	9670	10.695	0.000	0.000	0.000
2	2.549	3568	3.946	0.294	0.000	0.155
3	3.792	1116	1.234	1.067	0.000	0.718
4	5.816	2146	2.373	5.391	0.875	1.635
5	6.524	4305	4.761	1.771	0.000	1.956
6	7.063	54793	60.599	1.425	1.213	2.200
7	9.591	14822	16.393	6.718	1.113	3.345
Total		90420	100.000			

==== Shimadzu LCsolution Analysis Report ====

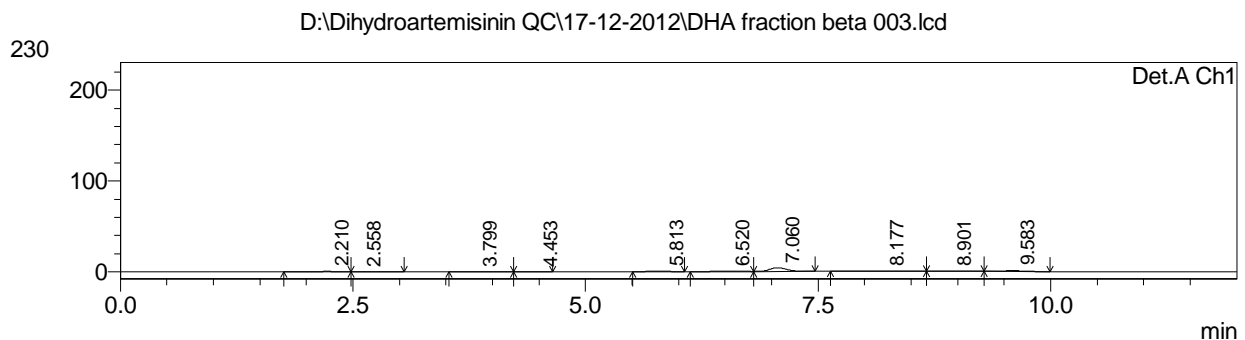
Sample Name : D:\Dihydroartemisinin QC\17-12-2012\DHA fraction beta 003.lcd
 Vail # : 53
 Injection Volume : 60 uL
 Data File Name : DHA fraction beta 003.lcd
 Method File Name : ACN-H2O 60-40 (12min).lcm
 Batch File Name : Collect fraction Batch.lcb
 Report File Name : Default.lcr
 Data Acquired : 17/12/2555 21:05:54
 Data Processed : 17/12/2555 21:17:57



1 Det.A Ch1/216nm



1 Det.A Ch1/216nm



1 Det.A Ch1/216nm

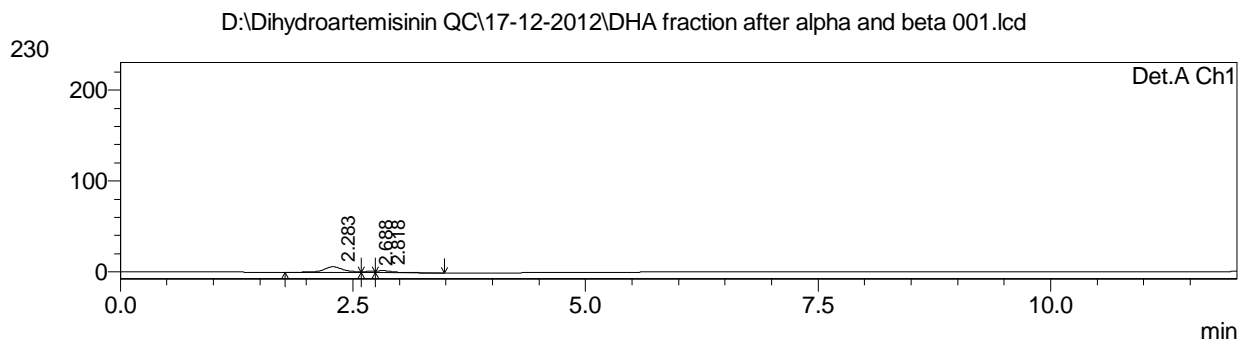
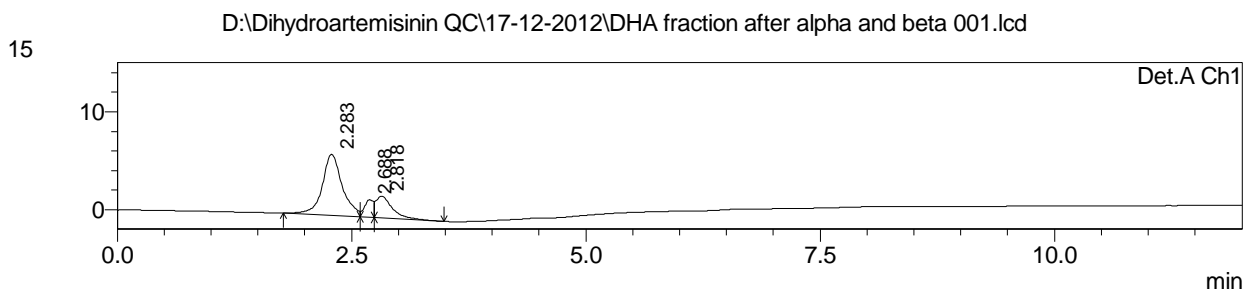
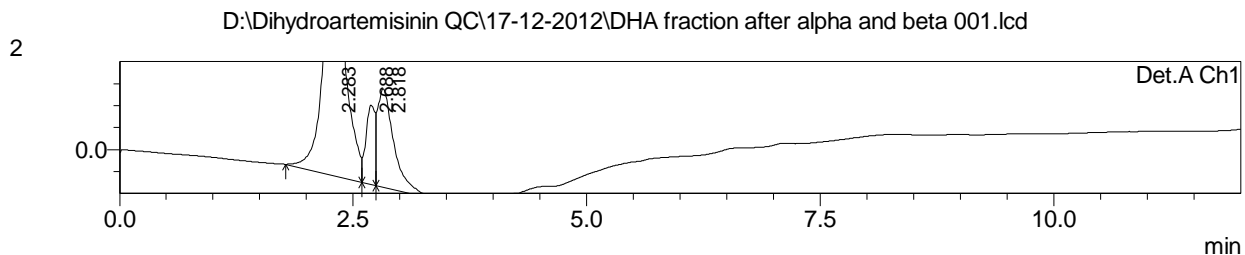
PeakTable

Detector A Ch1 216nm

Peak#	Ret. Time	Area	Area %	Resolution	Tailing Factor	k'
1	2.210	10535	10.556	0.000	0.000	0.000
2	2.558	3681	3.689	0.000	0.000	0.158
3	3.799	4110	4.119	0.000	0.000	0.720
4	4.453	1002	1.004	1.432	0.000	1.015
5	5.813	2224	2.228	3.294	0.882	1.631
6	6.520	4134	4.143	1.800	0.952	1.951
7	7.060	53300	53.408	1.427	1.242	2.195
8	8.177	4716	4.726	1.619	0.000	2.701
9	8.901	1426	1.429	0.917	0.000	3.028
10	9.583	14671	14.700	1.413	1.132	3.337
Total		99799	100.000			

==== Shimadzu LCsolution Analysis Report ====

Sample Name : D:\Dihydroartemisinin QC\17-12-2012\DHA fraction after alpha and beta 001.lcd
 Vial # : 54
 Injection Volume : 60 uL
 Data File Name : DHA fraction after alpha and beta 001.lcd
 Method File Name : ACN-H2O 60-40 (12min).lcm
 Batch File Name : Collect fraction Batch.lcb
 Report File Name : Default.lcr
 Data Acquired : 17/12/2555 22:21:19
 Data Processed : 17/12/2555 22:33:19



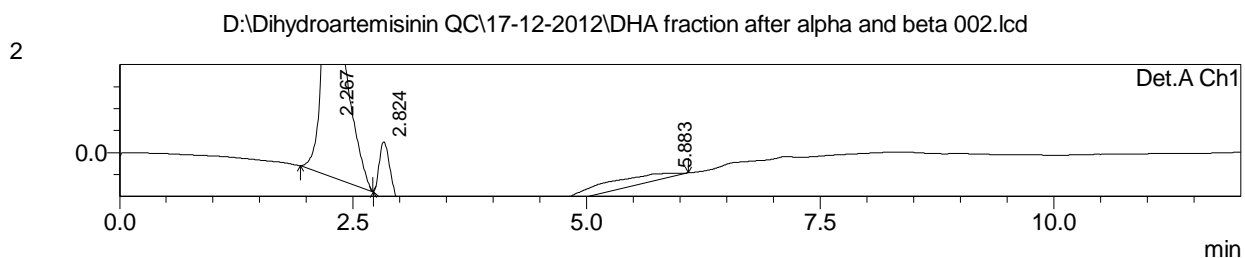
PeakTable

Detector A Ch1 216nm

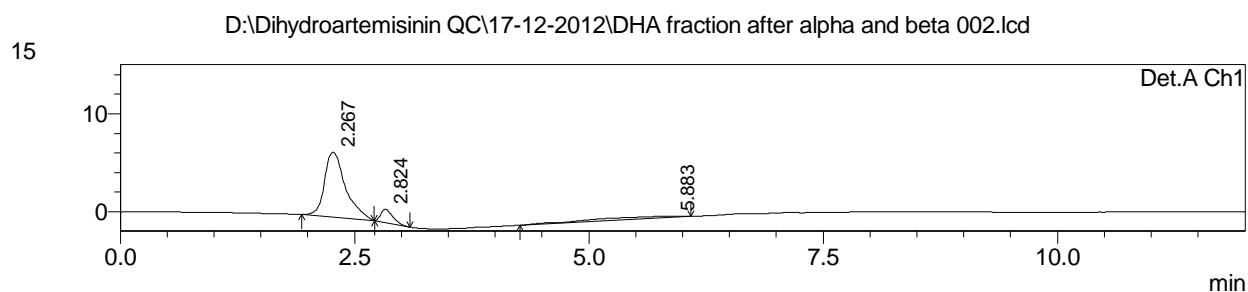
Peak#	Ret. Time	Area	Area %	Resolution	Tailing Factor	k'
1	2.283	93313	69.967	0.000	0.000	0.000
2	2.688	12453	9.338	0.810	0.000	0.178
3	2.818	27601	20.695	0.237	0.000	0.235
Total		133368	100.000			

==== Shimadzu LCsolution Analysis Report ====

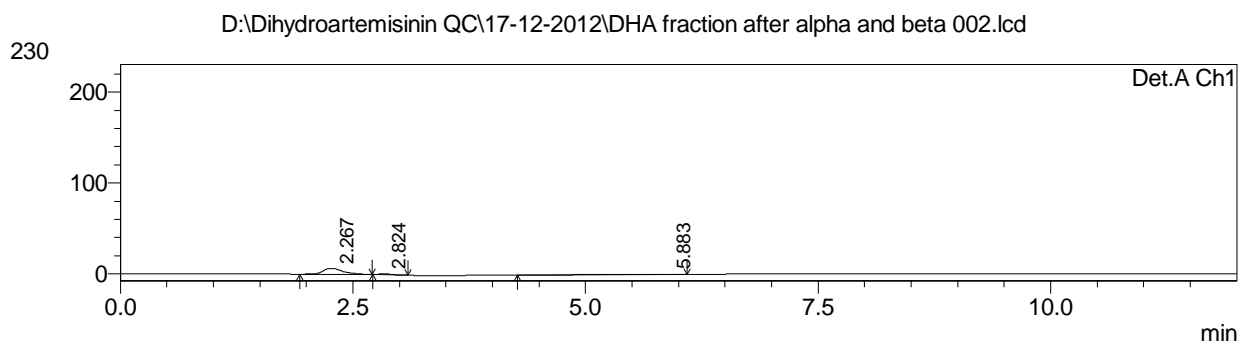
Sample Name : D:\Dihydroartemisinin QC\17-12-2012\DHA fraction after alpha and beta 002.lcd
 Vial # : 54
 Injection Volume : 60 uL
 Data File Name : DHA fraction after alpha and beta 002.lcd
 Method File Name : ACN-H2O 60-40 (12min).lcm
 Batch File Name : Collect fraction Batch.lcb
 Report File Name : Default.lcr
 Data Acquired : 17/12/2555 22:33:43
 Data Processed : 17/12/2555 22:45:45



1 Det.A Ch1/216nm



1 Det.A Ch1/216nm



1 Det.A Ch1/216nm

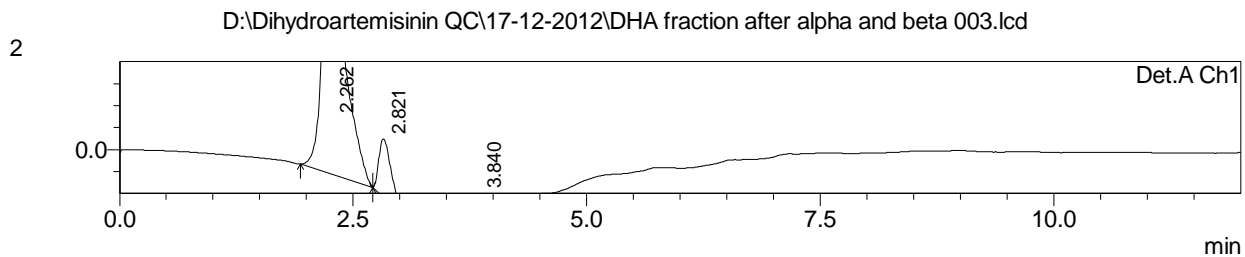
PeakTable

Detector A Ch1 216nm

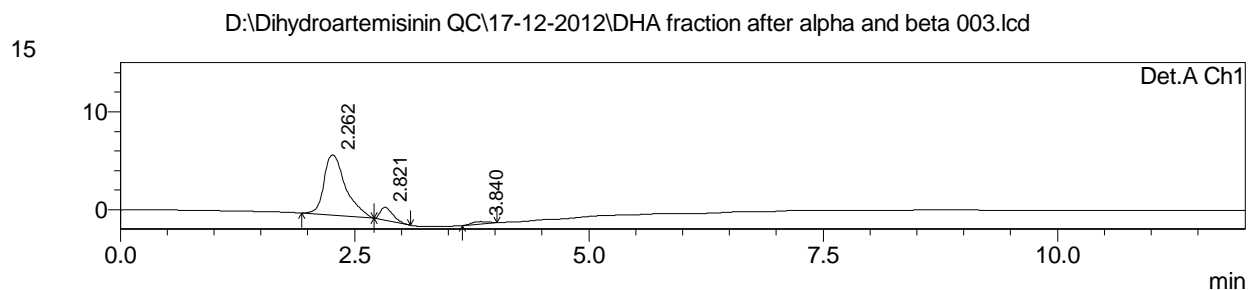
Peak#	Ret. Time	Area	Area %	Resolution	Tailing Factor	k'
1	2.267	103340	79.710	0.000	1.375	0.000
2	2.824	11811	9.110	1.807	1.555	0.246
3	5.883	14494	11.180	3.673	0.561	1.595
Total		129645	100.000			

==== Shimadzu LCsolution Analysis Report ====

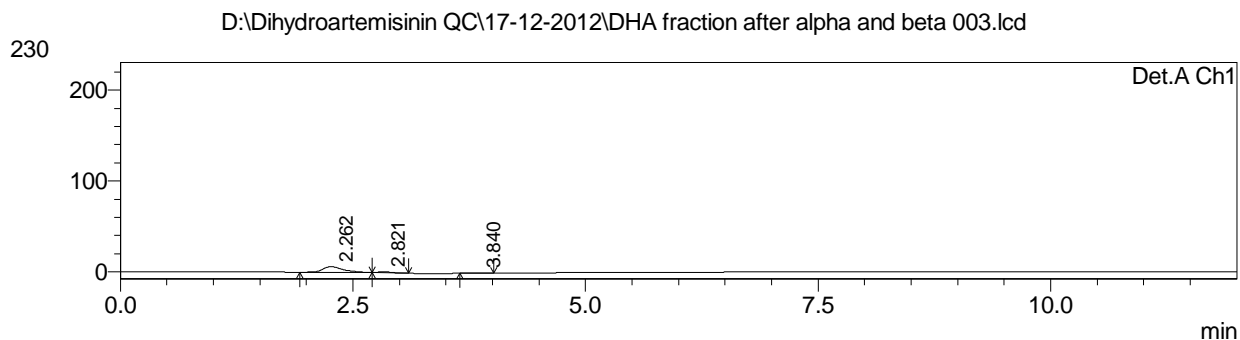
Sample Name : D:\Dihydroartemisinin QC\17-12-2012\DHA fraction after alpha and beta 003.lcd
 Vial # : 54
 Injection Volume : 60 uL
 Data File Name : DHA fraction after alpha and beta 003.lcd
 Method File Name : ACN-H2O 60-40 (12min).lcm
 Batch File Name : Collect fraction Batch.lcb
 Report File Name : Default.lcr
 Data Acquired : 17/12/2555 22:46:08
 Data Processed : 17/12/2555 22:58:09



1 Det.A Ch1/216nm



1 Det.A Ch1/216nm



1 Det.A Ch1/216nm

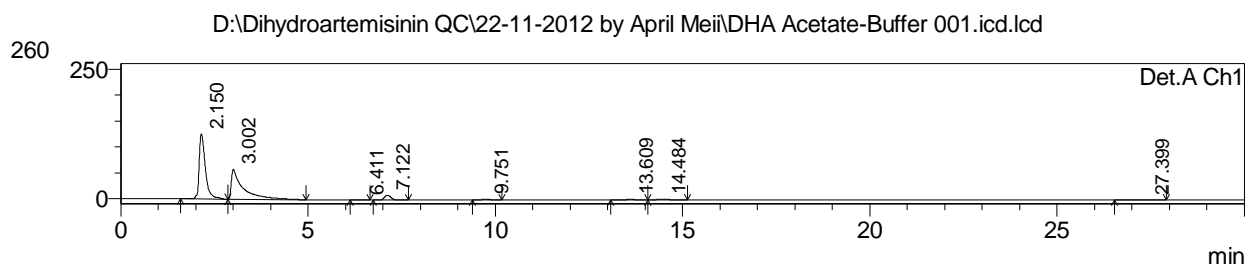
PeakTable

Detector A Ch1 216nm

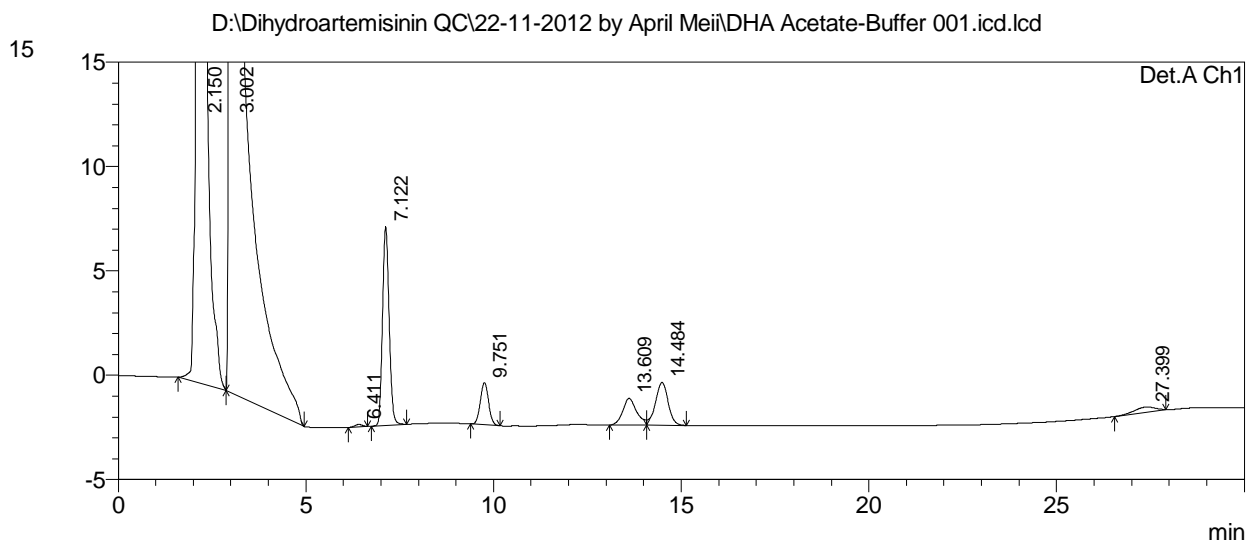
Peak#	Ret. Time	Area	Area %	Resolution	Tailing Factor	k'
1	2.262	98724	86.678	0.000	1.407	0.000
2	2.821	12268	10.771	1.743	1.576	0.247
3	3.840	2905	2.551	3.518	1.013	0.697
Total		113897	100.000			

==== Shimadzu LCsolution Analysis Report ====

Sample Name : DHA 1 mg/ml in ACN:Ammonium Acetate-Acetic acid Buffer (60:40) 001
 Vial # : 4
 Injection Volume : 20 uL
 Data File Name : DHA Acetate-Buffer 001.icd.lcd
 Method File Name : ACN-H2O 60-40.lcm
 Batch File Name : Test Buffer Effect.lcb
 Data Acquired : 23/11/2555 3:51:46
 Data Processed : 29/11/2555 15:26:53



1 Det.A Ch1/216nm



1 Det.A Ch1/216nm

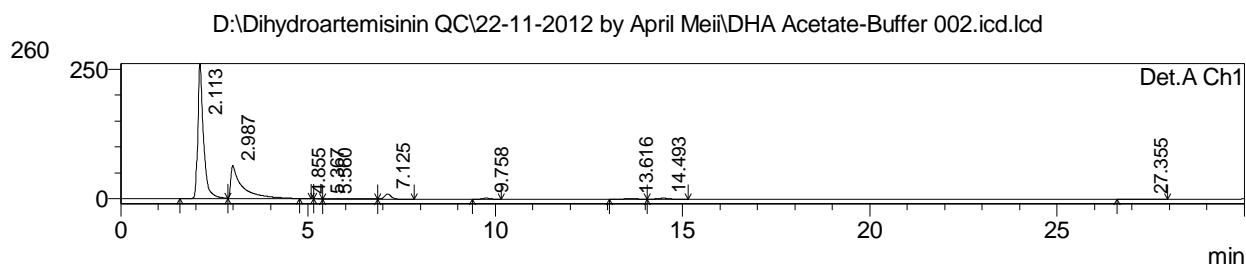
PeakTable

Detector A Ch1 216nm

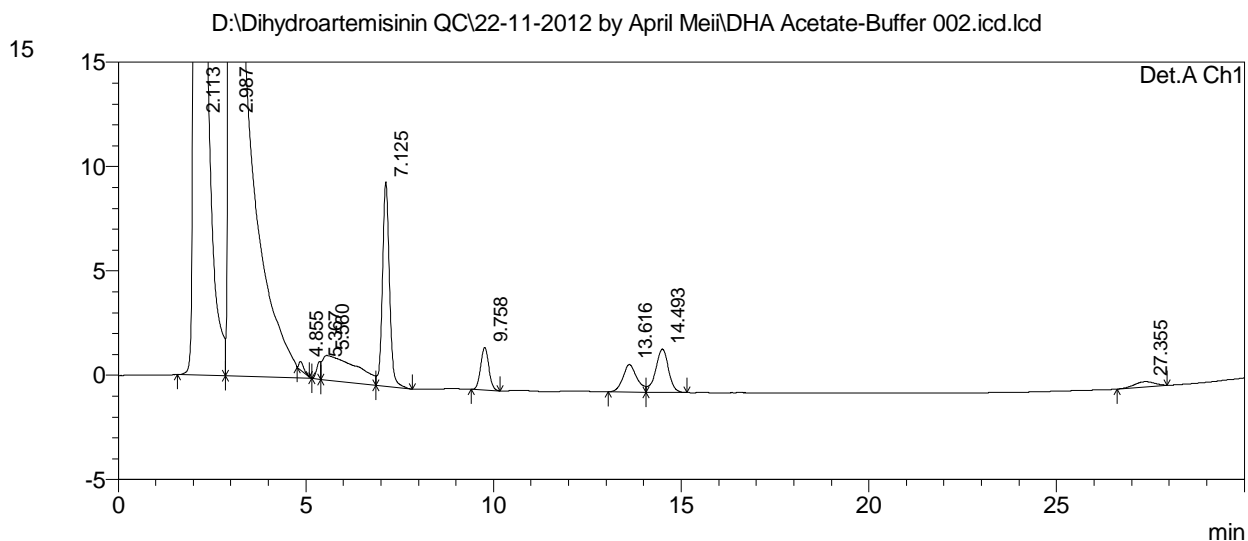
Peak#	Ret. Time	Area	Area %	Resolution	Tailing Factor	k'
1	2.150	1435652	47.859	0.000	1.657	0.000
2	3.002	1325890	44.200	2.557	6.488	0.396
3	6.411	1551	0.052	9.061	0.960	1.982
4	7.122	114631	3.821	2.066	1.159	2.313
5	9.751	30830	1.028	7.240	1.082	3.536
6	13.609	33059	1.102	7.266	0.000	5.330
7	14.484	48275	1.609	1.380	0.000	5.737
8	27.399	9853	0.328	15.808	0.836	11.744
Total		2999742	100.000			

==== Shimadzu LCsolution Analysis Report ====

D:\Dihydroartemisinin QC\22-11-2012 by April Mei\DHA Acetate-Buffer 002.icd.lcd
 Sample Name : DHA 1 mg/ml in ACN:Ammonium Acetate-Acetic acid Buffer (60:40) 002
 Vial # : 4
 Injection Volume : 20 uL
 Data File Name : DHA Acetate-Buffer 002.icd.lcd
 Method File Name : ACN-H2O 60-40.lcm
 Batch File Name : Test Buffer Effect.lcb
 Data Acquired : 23/11/2555 4:22:11
 Data Processed : 29/11/2555 15:26:21



1 Det.A Ch1/216nm



1 Det.A Ch1/216nm

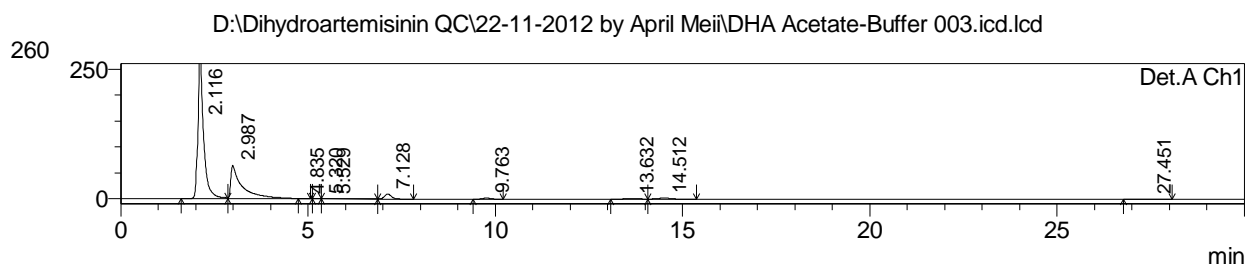
PeakTable

Detector A Ch1 216nm

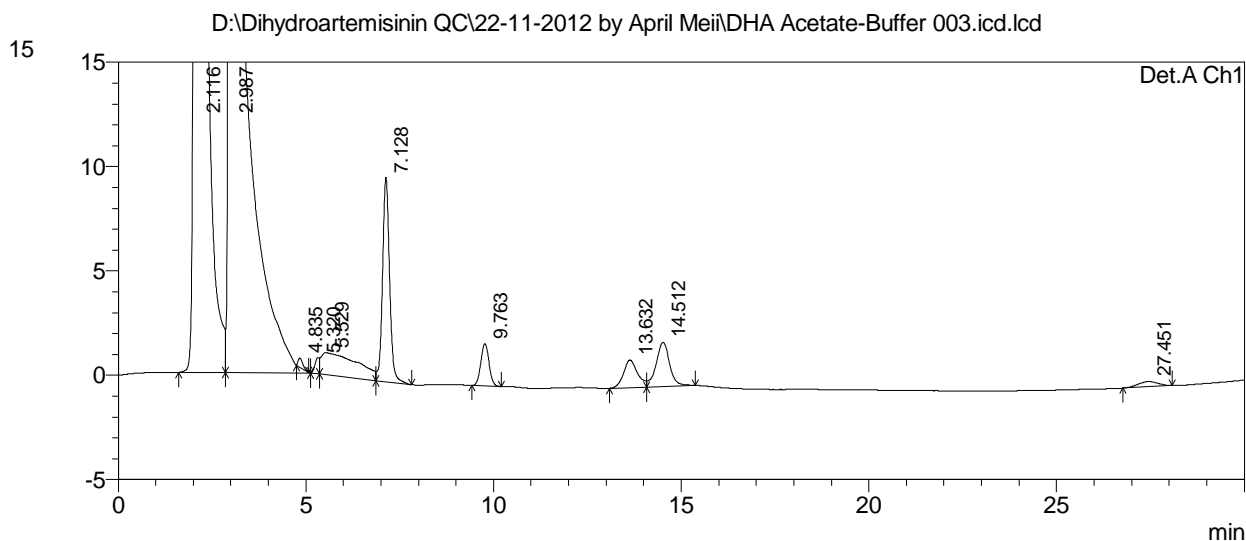
Peak#	Ret. Time	Area	Area %	Resolution	Tailing Factor	k'
1	2.113	2737470	60.719	0.000	1.611	0.000
2	2.987	1436105	31.854	2.797	6.042	0.414
3	4.855	3277	0.073	6.163	1.850	1.298
4	5.367	6346	0.141	0.143	0.000	1.540
5	5.560	75997	1.686	0.043	0.000	1.631
6	7.125	125050	2.774	1.356	1.078	2.372
7	9.758	30913	0.686	7.178	1.077	3.619
8	13.616	34380	0.763	7.226	0.000	5.445
9	14.493	49454	1.097	1.373	0.000	5.860
10	27.355	9433	0.209	15.808	0.932	11.948
Total		4508426	100.000			

==== Shimadzu LCsolution Analysis Report ====

Sample Name : D:\Dihydroartemisinin QC\22-11-2012 by April Mei\DHA Acetate-Buffer 003.icd.lcd
 Vial # : 4
 Injection Volume : 20 uL
 Data File Name : DHA Acetate-Buffer 003.icd.lcd
 Method File Name : ACN-H2O 60-40.lcm
 Batch File Name : Test Buffer Effect.lcb
 Data Acquired : 23/11/2555 4:52:38
 Data Processed : 29/11/2555 15:26:08



1 Det.A Ch1/216nm



1 Det.A Ch1/216nm

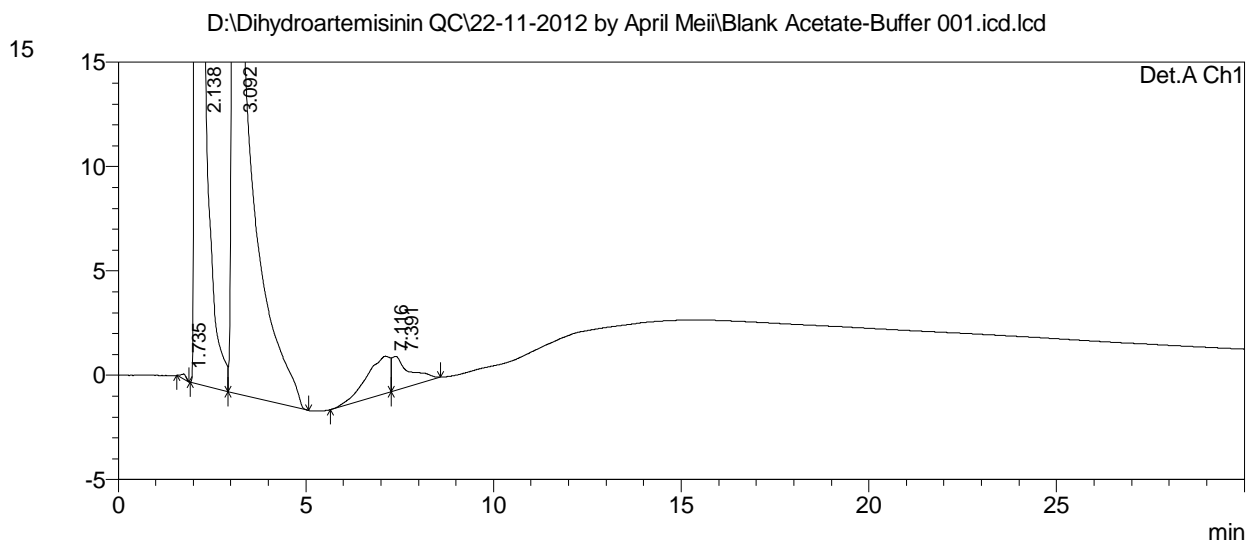
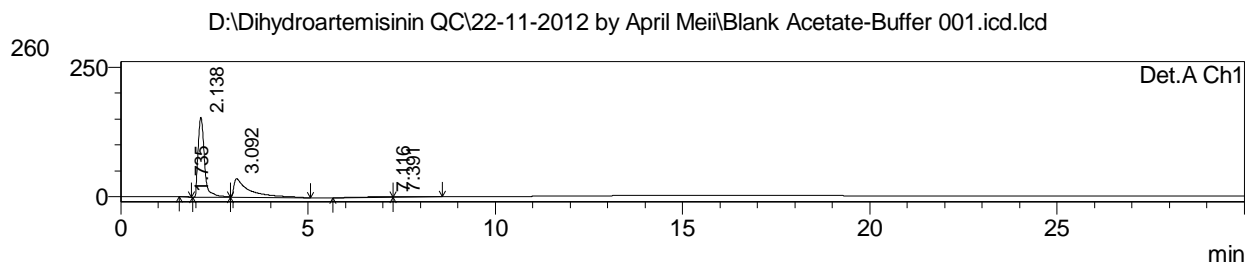
PeakTable

Detector A Ch1 216nm

Peak#	Ret. Time	Area	Area %	Resolution	Tailing Factor	k'
1	2.116	2879541	62.247	0.000	1.651	0.000
2	2.987	1410102	30.482	2.824	5.788	0.411
3	4.835	3857	0.083	6.041	1.646	1.285
4	5.320	6296	0.136	0.421	0.000	1.514
5	5.529	73776	1.595	0.101	0.000	1.612
6	7.128	125713	2.718	1.340	1.081	2.368
7	9.763	30510	0.660	7.174	1.076	3.613
8	13.632	34348	0.742	7.243	0.000	5.441
9	14.512	52614	1.137	1.360	0.000	5.857
10	27.451	9235	0.200	15.796	0.974	11.971
Total		4625992	100.000			

==== Shimadzu LCsolution Analysis Report ====

D:\Dihydroartemisinin QC\22-11-2012 by April Mei\Blank Acetate-Buffer 001.icd.lcd
 Sample Name : ACN:Ammonium Acetate-Acetic acid Buffer (60:40) 001
 Vial # : 3
 Injection Volume : 20 uL
 Data File Name : Blank Acetate-Buffer 001.icd.lcd
 Method File Name : ACN-H2O 60-40.lcm
 Batch File Name : Test Buffer Effect.lcb
 Data Acquired : 23/11/2555 2:20:28
 Data Processed : 29/11/2555 15:31:34



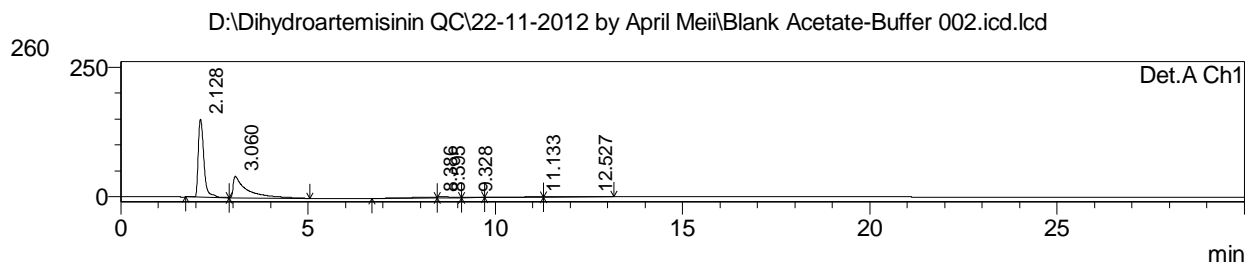
PeakTable

Detector A Ch1 216nm

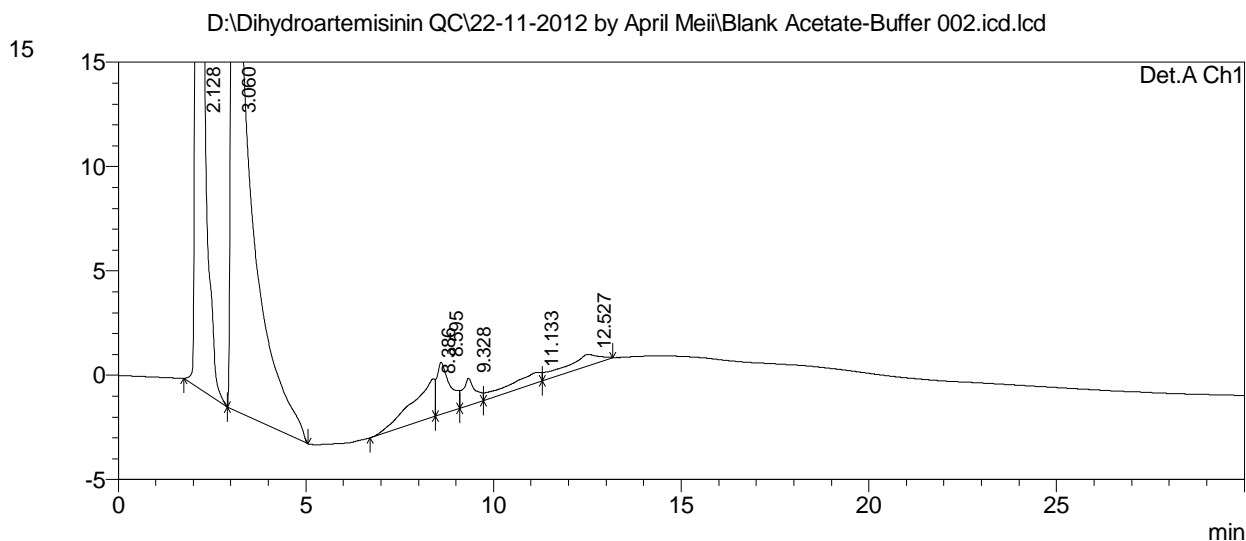
Peak#	Ret. Time	Area	Area %	Resolution	Tailing Factor	k'
1	1.735	2183	0.073	0.000	0.937	0.000
2	2.138	1808002	60.616	1.406	1.647	0.232
3	3.092	1037291	34.777	2.379	5.985	0.783
4	7.116	81398	2.729	2.861	0.000	3.103
5	7.391	53822	1.804	0.054	0.000	3.261
Total		2982695	100.000			

==== Shimadzu LCsolution Analysis Report ====

D:\Dihydroartemisinin QC\22-11-2012 by April Mei\Blank Acetate-Buffer 002.icd.lcd
 Sample Name : ACN:Ammonium Acetate-Acetic acid Buffer (60:40) 002
 Vial # : 3
 Injection Volume : 20 uL
 Data File Name : Blank Acetate-Buffer 002.icd.lcd
 Method File Name : ACN-H2O 60-40.lcm
 Batch File Name : Test Buffer Effect.lcb
 Data Acquired : 23/11/2555 2:50:54
 Data Processed : 29/11/2555 15:31:04



1 Det.A Ch1/216nm



1 Det.A Ch1/216nm

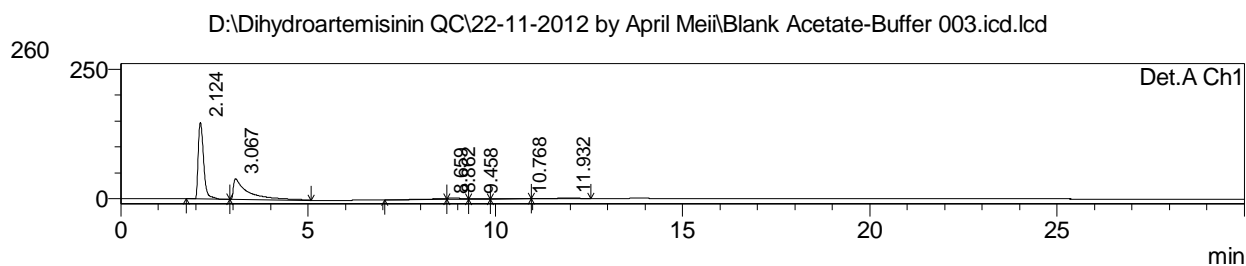
PeakTable

Detector A Ch1 216nm

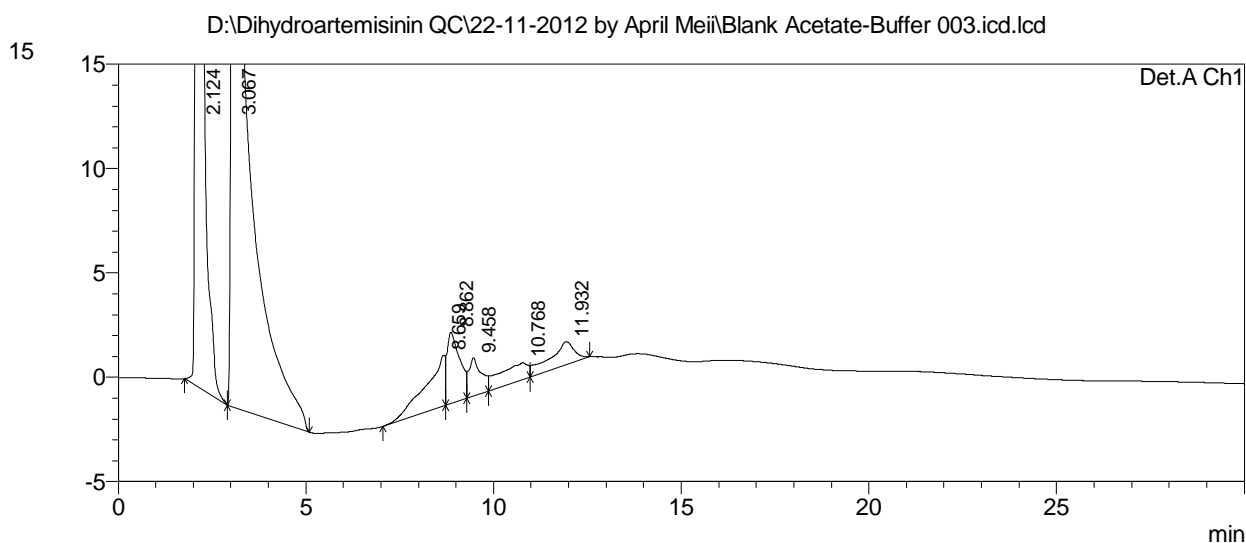
Peak#	Ret. Time	Area	Area %	Resolution	Tailing Factor	k'
1	2.128	1535683	53.755	0.000	1.652	0.000
2	3.060	1076738	37.690	2.646	6.619	0.438
3	8.386	81030	2.836	4.299	0.000	2.941
4	8.595	61075	2.138	0.151	0.000	3.040
5	9.328	29726	1.041	1.130	0.000	3.384
6	11.133	35096	1.228	0.800	0.000	4.232
7	12.527	37498	1.313	0.425	0.000	4.887
Total		2856846	100.000			

==== Shimadzu LCsolution Analysis Report ====

D:\Dihydroartemisinin QC\22-11-2012 by April Mei\Blank Acetate-Buffer 003.icd.lcd
 Sample Name : ACN:Ammonium Acetate-Acetic acid Buffer (60:40) 003
 Vial # : 3
 Injection Volume : 20 uL
 Data File Name : Blank Acetate-Buffer 003.icd.lcd
 Method File Name : ACN-H2O 60-40.lcm
 Batch File Name : Test Buffer Effect.lcb
 Data Acquired : 23/11/2555 3:21:20
 Data Processed : 29/11/2555 15:30:38



1 Det.A Ch1/216nm



1 Det.A Ch1/216nm

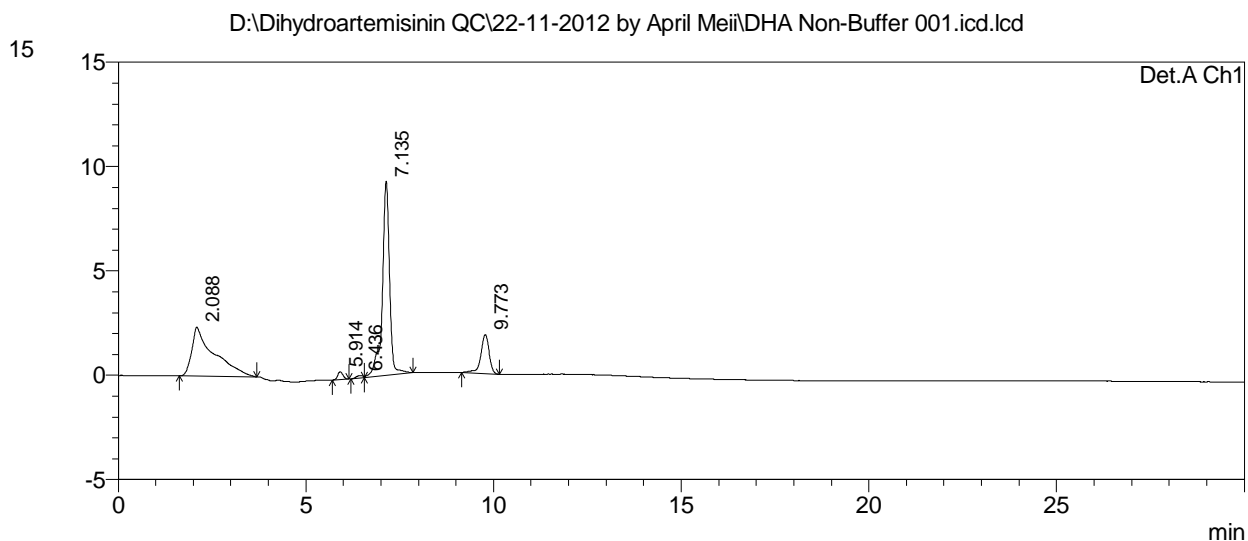
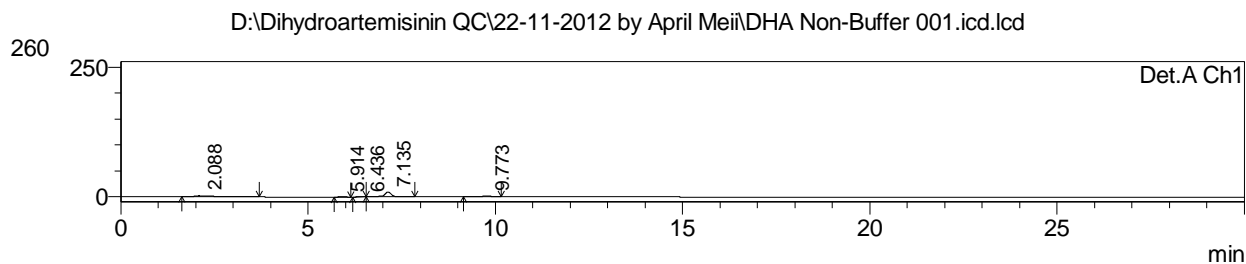
PeakTable

Detector A Ch1 216nm

Peak#	Ret. Time	Area	Area %	Resolution	Tailing Factor	k'
1	2.124	1470538	50.965	0.000	1.649	0.000
2	3.067	1101529	38.176	2.641	7.073	0.444
3	8.659	90062	3.121	3.393	0.000	3.076
4	8.862	81561	2.827	0.112	0.000	3.172
5	9.458	41839	1.450	0.836	0.000	3.452
6	10.768	46556	1.614	0.498	0.000	4.069
7	11.932	53286	1.847	0.425	0.000	4.617
Total		2885371	100.000			

==== Shimadzu LCsolution Analysis Report ====

Sample Name : DHA 1 mg/ml in ACN:Water (60:40) 001
 Vial # : 2
 Injection Volume : 20 uL
 Data File Name : DHA Non-Buffer 001.icd.lcd
 Method File Name : ACN-H2O 60-40.lcm
 Batch File Name : Test Buffer Effect.lcb
 Data Acquired : 23/11/2555 0:11:36
 Data Processed : 29/11/2555 15:22:20



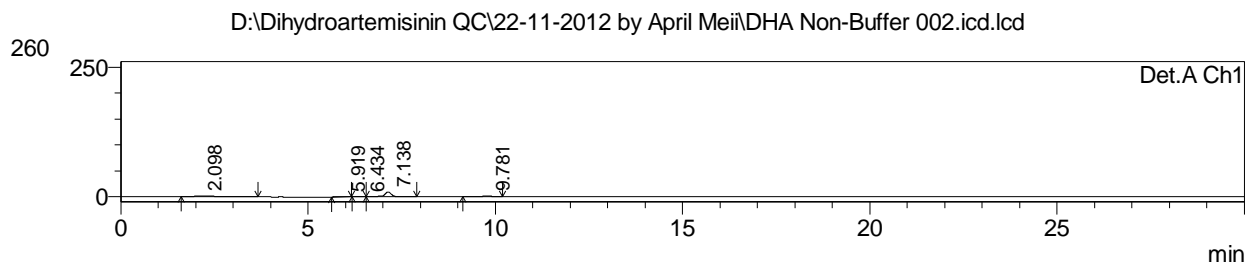
PeakTable

Detector A Ch1 216nm

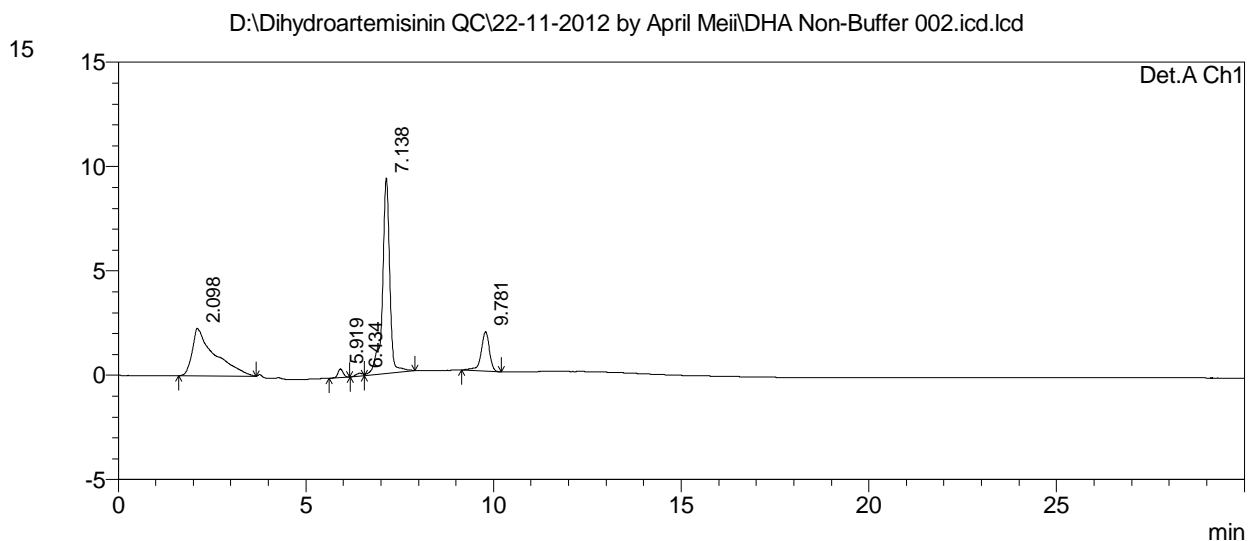
Peak#	Ret. Time	Area	Area %	Resolution	Tailing Factor	k'
1	2.088	96798	38.069	0.000	2.635	0.000
2	5.914	3659	1.439	7.261	1.098	1.833
3	6.436	1559	0.613	1.523	0.000	2.083
4	7.135	123449	48.551	1.912	0.822	2.417
5	9.773	28803	11.328	7.526	0.835	3.681
Total		254268	100.000			

==== Shimadzu LCsolution Analysis Report ====

Sample Name : DHA 1 mg/ml in ACN:Water (60:40) 002
 Vial # : 2
 Injection Volume : 20 uL
 Data File Name : DHA Non-Buffer 002.icd.icd
 Method File Name : ACN-H2O 60-40.lcm
 Batch File Name : Test Buffer Effect.lcb
 Data Acquired : 23/11/2555 0:42:01
 Data Processed : 29/11/2555 15:22:01



1 Det.A Ch1/216nm



1 Det.A Ch1/216nm

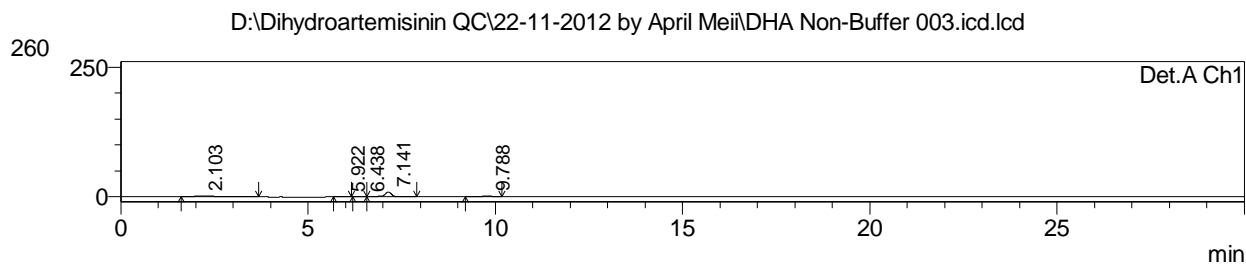
PeakTable

Detector A Ch1 216nm

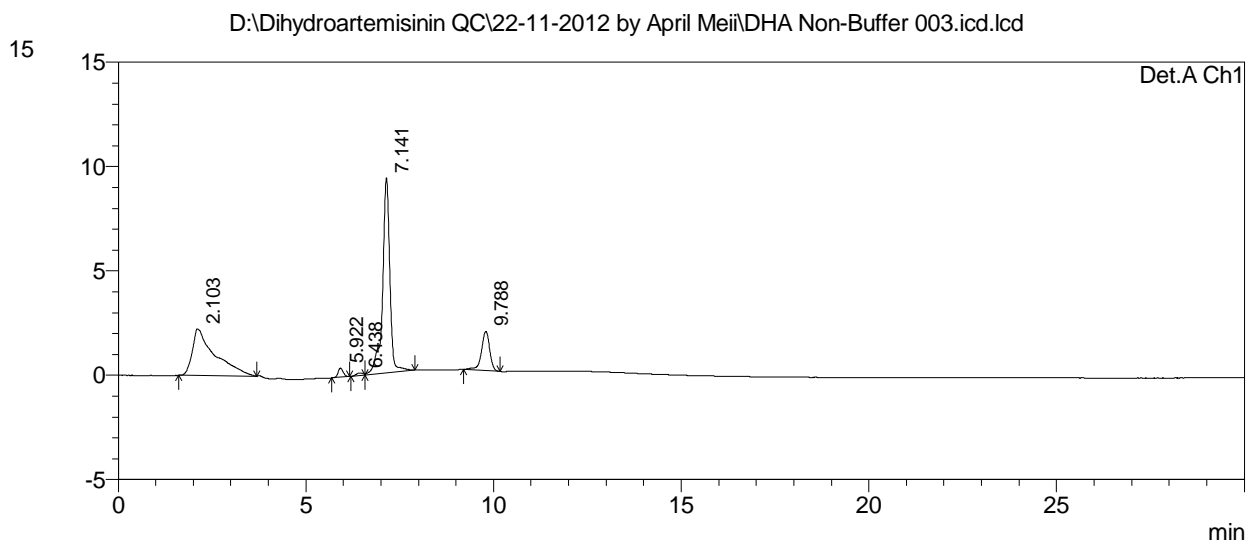
Peak#	Ret. Time	Area	Area %	Resolution	Tailing Factor	k'
1	2.098	93889	37.071	0.000	2.592	0.000
2	5.919	4071	1.607	7.461	1.078	1.820
3	6.434	1623	0.641	1.593	0.000	2.066
4	7.138	124484	49.151	2.031	0.826	2.402
5	9.781	29200	11.529	7.502	0.833	3.661
Total		253266	100.000			

==== Shimadzu LCsolution Analysis Report ====

Sample Name : DHA 1 mg/ml in ACN:Water (60:40) 003
 Vial # : 2
 Injection Volume : 20 uL
 Data File Name : DHA Non-Buffer 003.icd.lcd
 Method File Name : ACN-H2O 60-40.lcm
 Batch File Name : Test Buffer Effect.lcb
 Data Acquired : 23/11/2555 1:12:29
 Data Processed : 29/11/2555 15:21:47



1 Det.A Ch1/216nm



1 Det.A Ch1/216nm

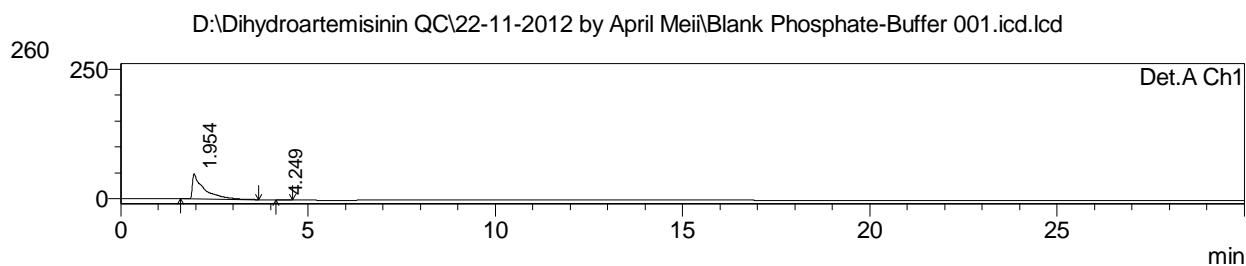
PeakTable

Detector A Ch1 216nm

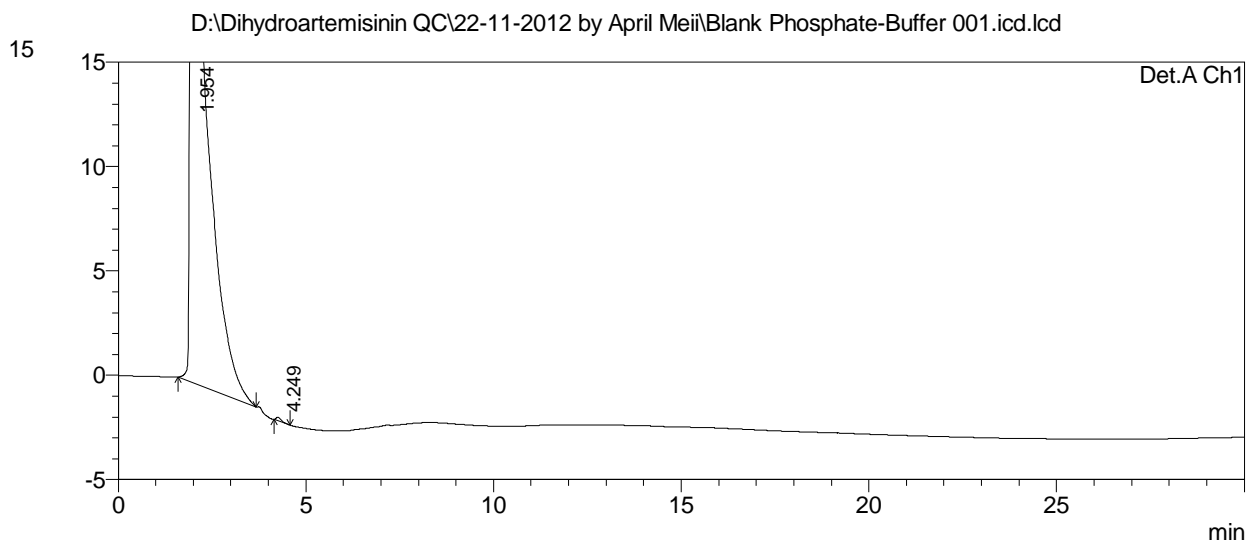
Peak#	Ret. Time	Area	Area %	Resolution	Tailing Factor	k'
1	2.103	93136	36.904	0.000	2.594	0.000
2	5.922	4204	1.666	5.675	1.099	1.816
3	6.438	1626	0.644	1.589	0.000	2.062
4	7.141	124494	49.329	2.016	0.828	2.396
5	9.788	28915	11.457	7.486	0.861	3.655
Total		252374	100.000			

==== Shimadzu LCsolution Analysis Report ====

D:\Dihydroartemisinin QC\22-11-2012 by April Mei\Blank Phosphate-Buffer 001.icd.lcd
 Sample Name : ACN:Sodium dihydrogen Phosphate-Phosphoric acid Buffer (60:40) 001
 Vial # : 5
 Injection Volume : 20 uL
 Data File Name : Blank Phosphate-Buffer 001.icd.lcd
 Method File Name : ACN-H2O 60-40.lcm
 Batch File Name : Test Buffer Effect.lcb
 Data Acquired : 23/11/2555 6:00:37
 Data Processed : 29/11/2555 15:27:50



1 Det.A Ch1/216nm



1 Det.A Ch1/216nm

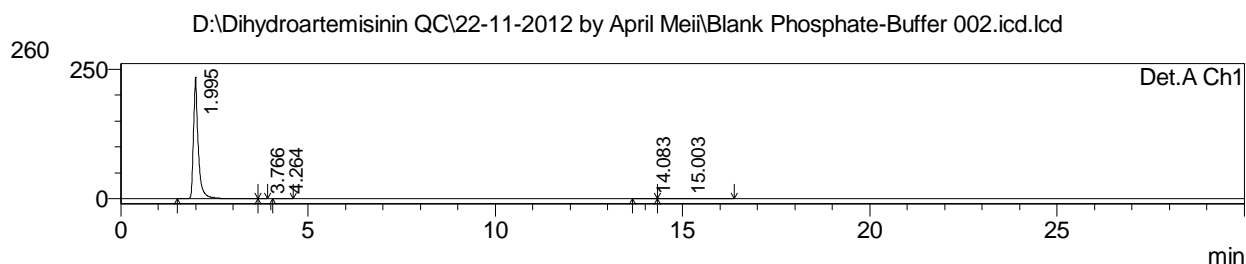
PeakTable

Detector A Ch1 216nm

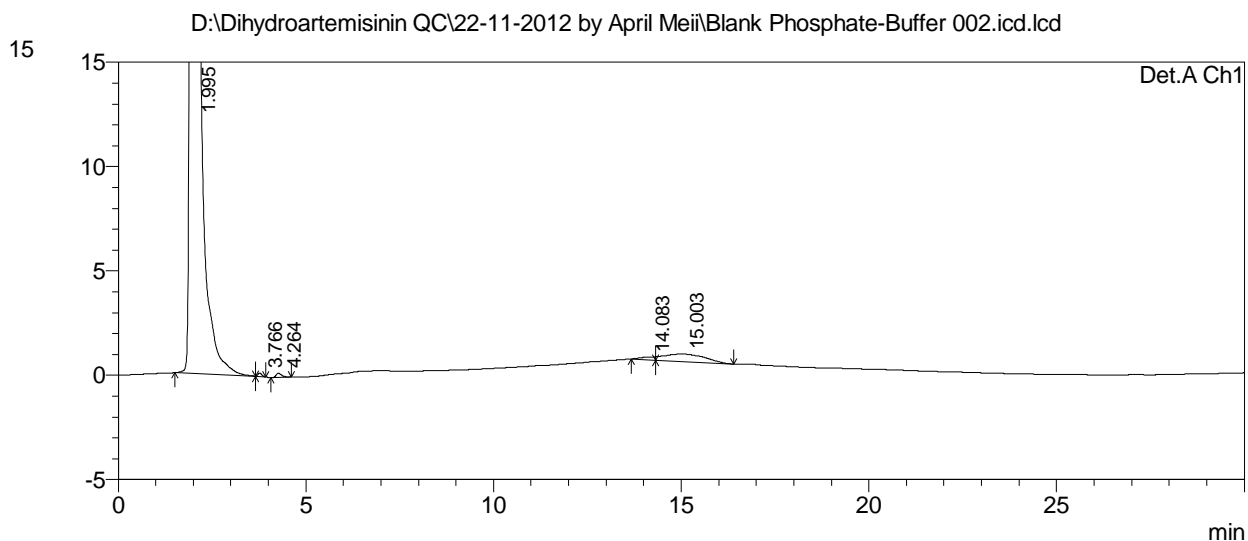
Peak#	Ret. Time	Area	Area %	Resolution	Tailing Factor	k'
1	1.954	1061584	99.847	0.000	6.562	0.000
2	4.249	1622	0.153	7.558	1.970	1.174
Total		1063205	100.000			

==== Shimadzu LCsolution Analysis Report ====

D:\Dihydroartemisinin QC\22-11-2012 by April Mei\Blank Phosphate-Buffer 002.icd.lcd
 Sample Name : ACN:Sodium dihydrogen Phosphate-Phosphoric acid Buffer (60:40) 002
 Vial # : 5
 Injection Volume : 20 uL
 Data File Name : Blank Phosphate-Buffer 002.icd.lcd
 Method File Name : ACN-H2O 60-40.lcm
 Batch File Name : Test Buffer Effect.lcb
 Data Acquired : 23/11/2555 6:31:02
 Data Processed : 29/11/2555 15:27:32



1 Det.A Ch1/216nm



1 Det.A Ch1/216nm

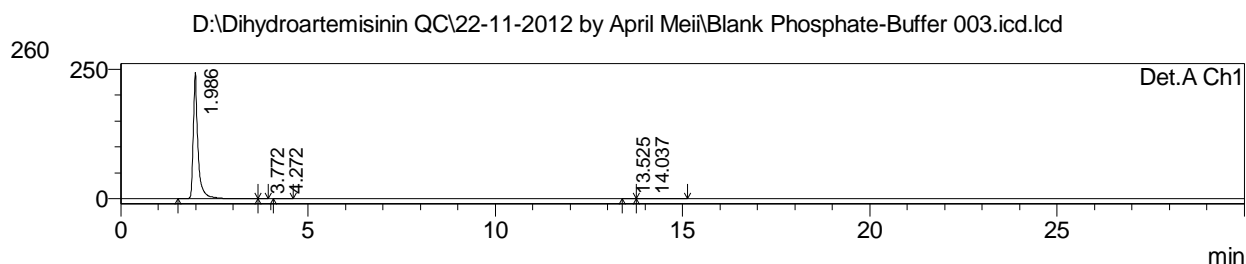
PeakTable

Detector A Ch1 216nm

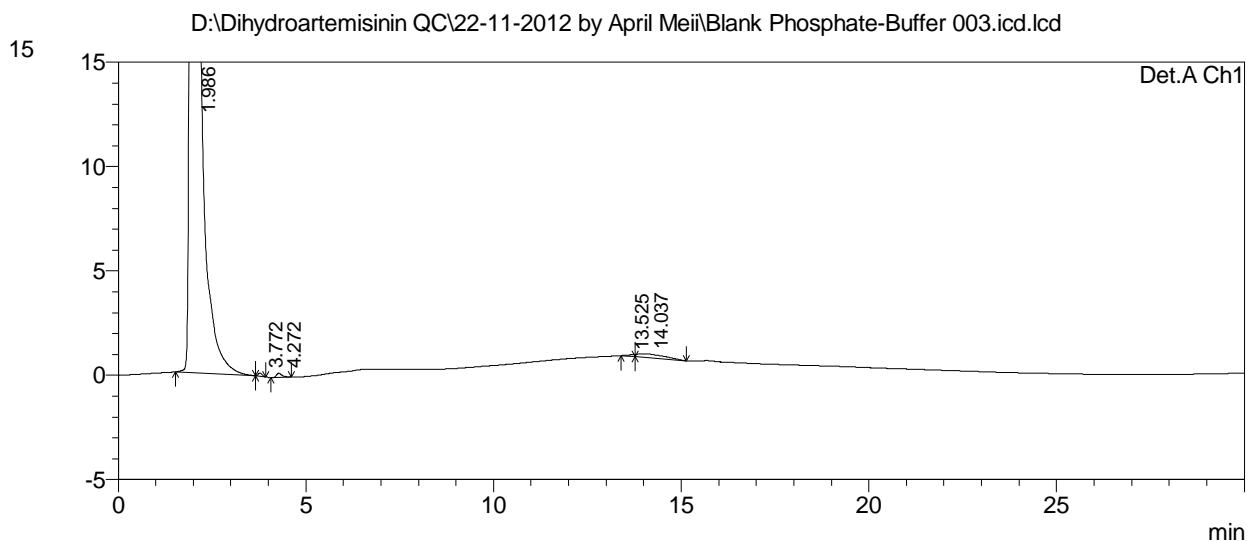
Peak#	Ret. Time	Area	Area %	Resolution	Tailing Factor	k'
1	1.995	2128401	98.431	0.000	1.547	0.000
2	3.766	1212	0.056	8.199	1.220	0.888
3	4.264	2306	0.107	2.104	1.499	1.137
4	14.083	3632	0.168	0.000	0.000	6.059
5	15.003	26788	1.239	0.000	0.000	6.519
Total		2162339	100.000			

==== Shimadzu LCsolution Analysis Report ====

D:\Dihydroartemisinin QC\22-11-2012 by April Mei\Blank Phosphate-Buffer 003.icd.lcd
 Sample Name : ACN:Sodium dihydrogen Phosphate-Phosphoric acid Buffer (60:40) 003
 Vial # : 5
 Injection Volume : 20 uL
 Data File Name : Blank Phosphate-Buffer 003.icd.lcd
 Method File Name : ACN-H2O 60-40.lcm
 Batch File Name : Test Buffer Effect.lcb
 Data Acquired : 23/11/2555 7:01:27
 Data Processed : 29/11/2555 15:27:17



1 Det.A Ch1/216nm



1 Det.A Ch1/216nm

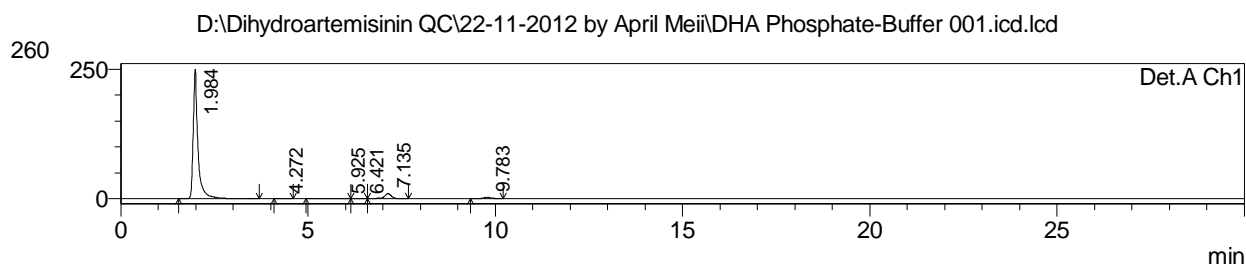
PeakTable

Detector A Ch1 216nm

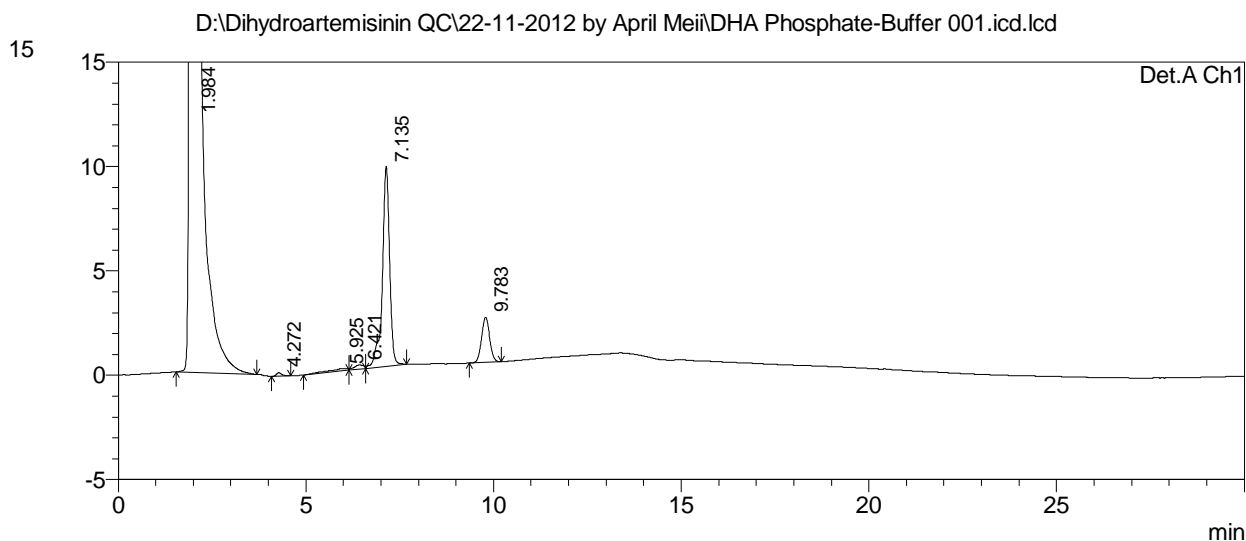
Peak#	Ret. Time	Area	Area %	Resolution	Tailing Factor	k'
1	1.986	2173673	99.362	0.000	1.673	0.000
2	3.772	1182	0.054	8.351	1.189	0.899
3	4.272	2240	0.102	2.097	1.601	1.151
4	13.525	1148	0.052	0.000	0.000	5.810
5	14.037	9383	0.429	0.000	0.000	6.068
Total		2187626	100.000			

==== Shimadzu LCsolution Analysis Report ====

D:\Dihydroartemisinin QC\22-11-2012 by April Mei\DHA Phosphate-Buffer 001.icd.lcd
 Sample Name : DHA 1 mg/ml in ACN:Sodium dihydrogen Phosphate-Phosphoric acid Buffer (60:40) 001
 Vial # : 6
 Injection Volume : 20 uL
 Data File Name : DHA Phosphate-Buffer 001.icd.lcd
 Method File Name : ACN-H2O 60-40.lcm
 Batch File Name : Test Buffer Effect.lcb
 Data Acquired : 23/11/2555 7:31:52
 Data Processed : 29/11/2555 15:21:25



1 Det.A Ch1/216nm



1 Det.A Ch1/216nm

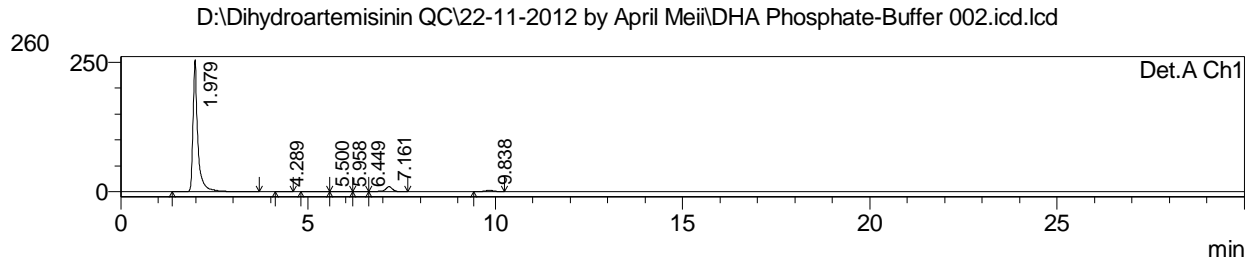
PeakTable

Detector A Ch1 216nm

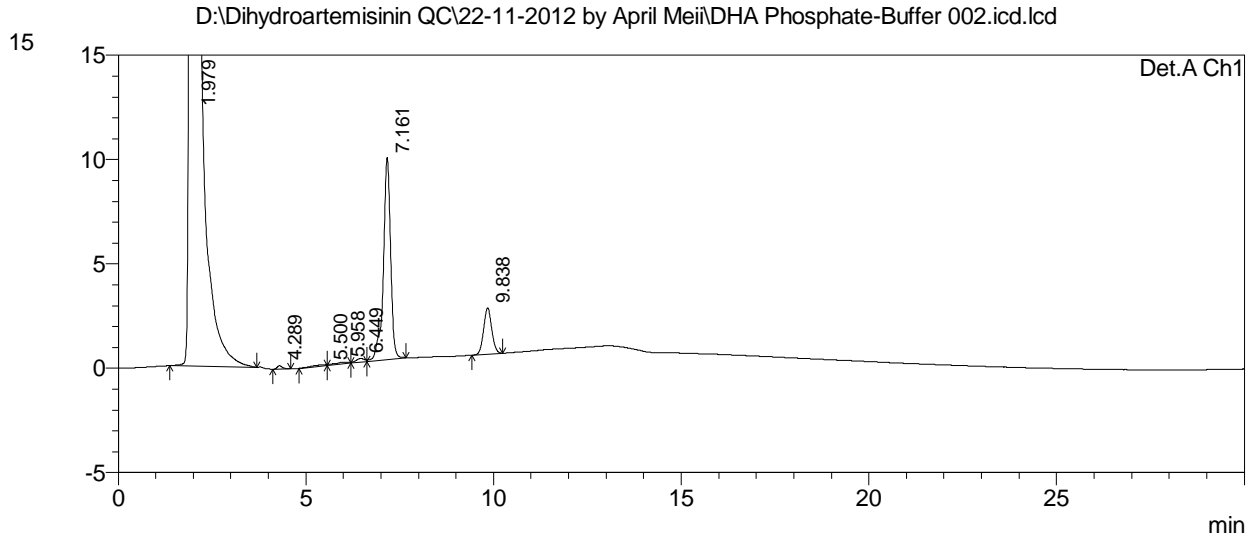
Peak#	Ret. Time	Area	Area %	Resolution	Tailing Factor	k'
1	1.984	2255103	92.984	0.000	1.737	0.000
2	4.272	1742	0.072	9.361	1.521	1.153
3	5.925	4427	0.183	1.874	0.000	1.987
4	6.421	3539	0.146	0.477	0.000	2.237
5	7.135	128003	5.278	1.581	0.847	2.597
6	9.783	32452	1.338	7.306	1.077	3.932
Total		2425266	100.000			

==== Shimadzu LCsolution Analysis Report ====

D:\Dihydroartemisinin QC\22-11-2012 by April Mei\DHA Phosphate-Buffer 002.icd.lcd
 Sample Name : DHA 1 mg/ml in ACN:Sodium dihydrogen Phosphate-Phosphoric acid Buffer (60:40) 002
 Vial # : 6
 Injection Volume : 20 uL
 Data File Name : DHA Phosphate-Buffer 002.icd.lcd
 Method File Name : ACN-H2O 60-40.lcm
 Batch File Name : Test Buffer Effect.lcb
 Data Acquired : 23/11/2555 8:02:18
 Data Processed : 29/11/2555 15:21:04



1 Det.A Ch1/216nm



1 Det.A Ch1/216nm

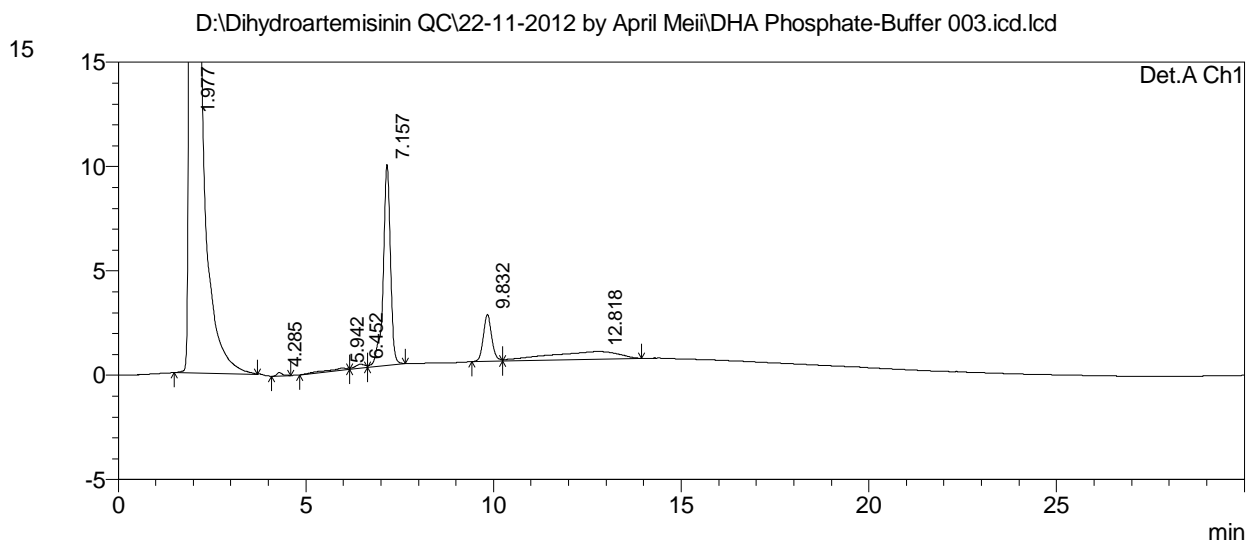
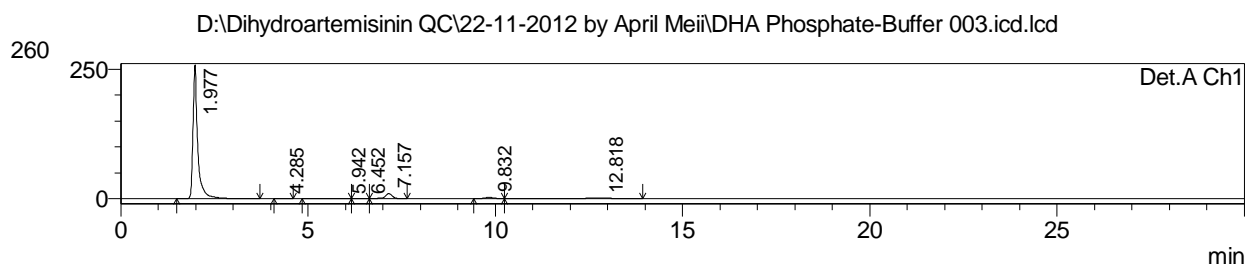
PeakTable

Detector A Ch1 216nm

Peak#	Ret. Time	Area	Area %	Resolution	Tailing Factor	k'
1	1.979	2330680	93.165	0.000	1.733	0.000
2	4.289	1666	0.067	9.468	1.549	1.168
3	5.500	1946	0.078	1.945	0.000	1.780
4	5.958	2216	0.089	0.434	0.000	2.012
5	6.449	2900	0.116	0.611	0.000	2.260
6	7.161	128676	5.144	1.776	0.863	2.619
7	9.838	33587	1.343	7.322	1.083	3.972
Total		2501672	100.000			

==== Shimadzu LCsolution Analysis Report ====

D:\Dihydroartemisinin QC\22-11-2012 by April Mei\DHA Phosphate-Buffer 003.icd.lcd
 Sample Name : DHA 1 mg/ml in ACN:Sodium dihydrogen Phosphate-Phosphoric acid Buffer (60:40) 003
 Vial # : 6
 Injection Volume : 20 uL
 Data File Name : DHA Phosphate-Buffer 003.icd.lcd
 Method File Name : ACN-H2O 60-40.lcm
 Batch File Name : Test Buffer Effect.lcb
 Data Acquired : 23/11/2555 8:32:43
 Data Processed : 29/11/2555 15:19:22



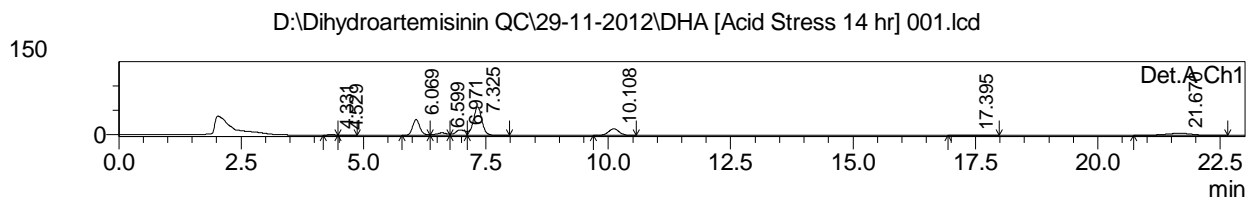
PeakTable

Detector A Ch1 216nm

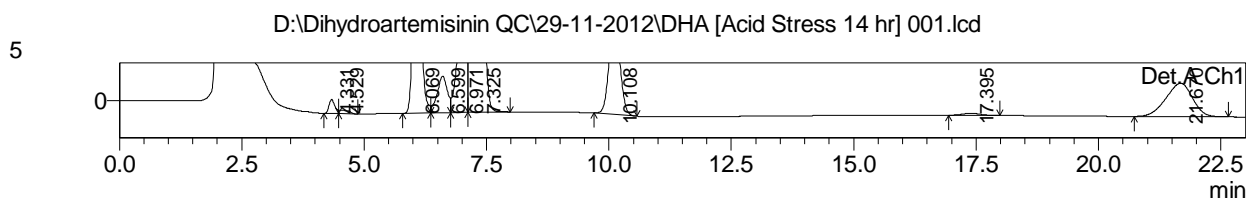
Peak#	Ret. Time	Area	Area %	Resolution	Tailing Factor	k'
1	1.977	2339031	91.320	0.000	1.768	0.000
2	4.285	1699	0.066	9.454	1.503	1.168
3	5.942	4857	0.190	1.333	0.000	2.005
4	6.452	3794	0.148	0.369	0.000	2.264
5	7.157	128750	5.027	1.608	0.858	2.620
6	9.832	35035	1.368	7.254	1.142	3.973
7	12.818	48184	1.881	1.302	0.000	5.484
Total		2561349	100.000			

==== Shimadzu LCsolution Analysis Report ====

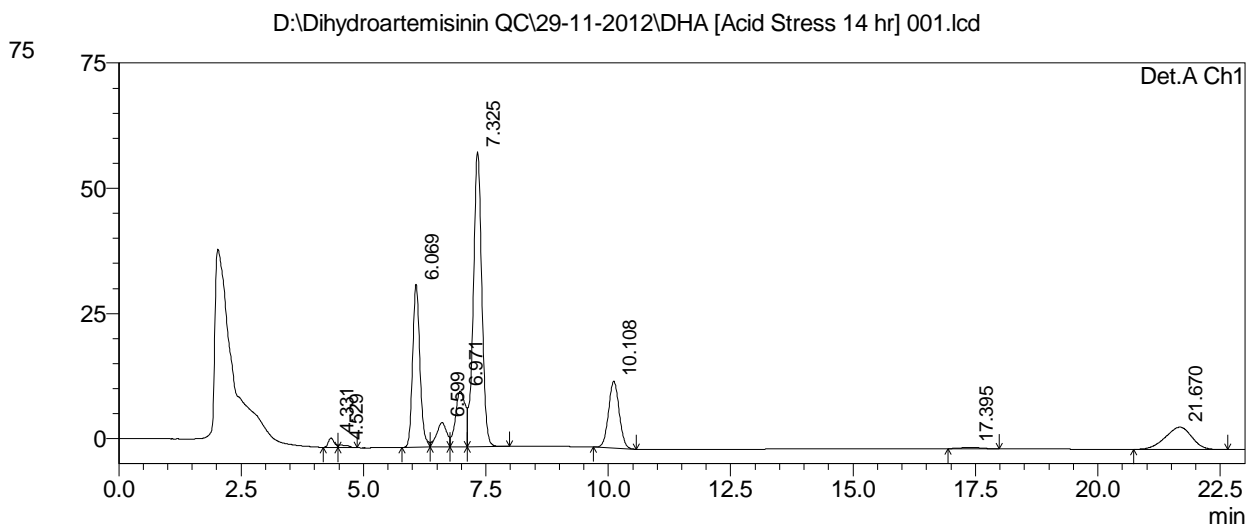
Sample Name : D:\Dihydroartemisinin QC\29-11-2012\DHA [Acid Stress 14 hr] 001.lcd
 Vial # : DHA 1 mg/ml in ACN:Water (60:40) stress with 0.2N HCl 14 hr 001
 Injection Volume : 26
 Data File Name : 20 uL
 Method File Name : DHA [Acid Stress 14 hr] 001.lcd
 Batch File Name : FR 0.6, 30 min.lcm
 Data Acquired : Stress Acid-Base-AcidHeat in Phosphate Buffer con.lcb
 Data Processed : 30/11/2555 12:12:53
 : 30/11/2555 14:05:53



1 Det.A Ch1/216nm



1 Det.A Ch1/216nm



1 Det.A Ch1/216nm

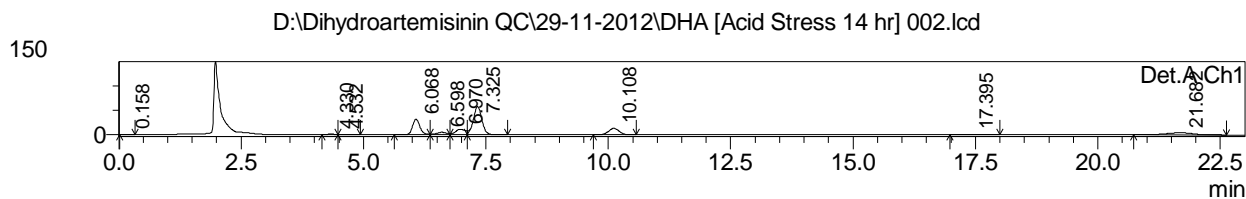
PeakTable

Detector A Ch1 216nm

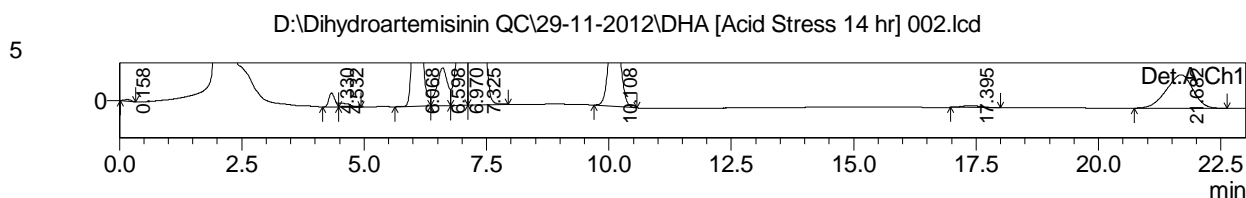
Peak#	Ret. Time	Area	Area %	Resolution	Tailing Factor	k'
1	4.331	15846	0.945	0.000	0.000	0.000
2	4.529	6916	0.412	0.419	0.000	0.046
3	6.069	337180	20.108	3.121	1.203	0.401
4	6.599	71366	4.256	1.541	0.000	0.524
5	6.971	159604	9.518	0.781	0.000	0.610
6	7.325	707217	42.175	0.823	0.000	0.691
7	10.108	202825	12.096	7.690	1.054	1.334
8	17.395	6887	0.411	13.414	1.069	3.016
9	21.670	169017	10.079	5.017	0.929	4.004
Total		1676858	100.000			

==== Shimadzu LCsolution Analysis Report ====

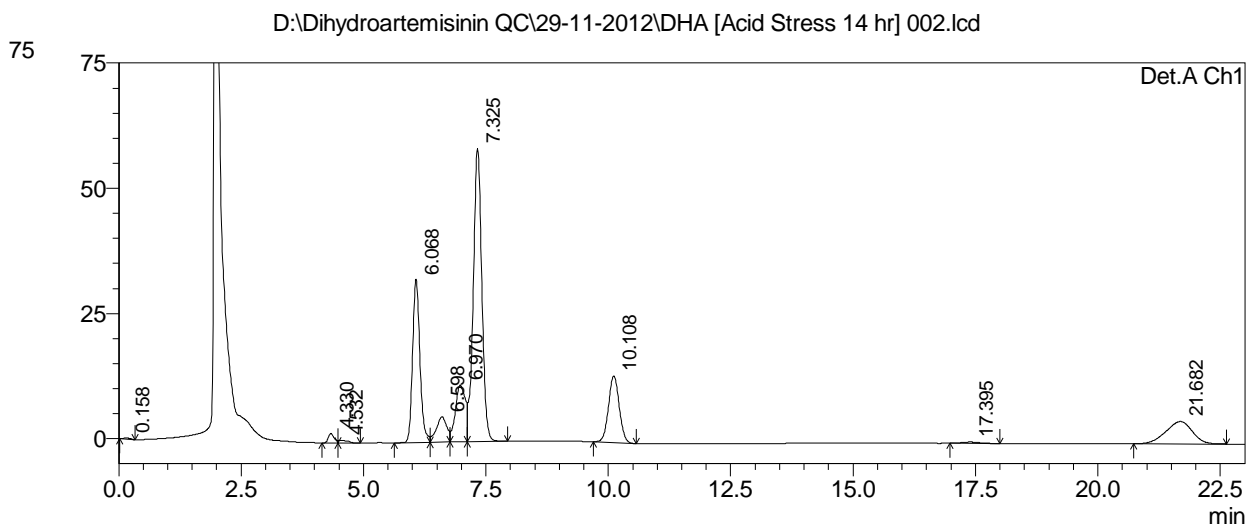
Sample Name : D:\Dihydroartemisinin QC\29-11-2012\DHA [Acid Stress 14 hr] 002.lcd
 : DHA 1 mg/ml in ACN:Water (60:40) stress with 0.2N HCl 14 hr 002
 Vial # : 26
 Injection Volume : 20 uL
 Data File Name : DHA [Acid Stress 14 hr] 002.lcd
 Method File Name : FR 0.6, 23 min.lcm
 Batch File Name : Stress Acid-Base-AcidHeat in Phosphate Buffer.lcb
 Data Acquired : 30/11/2555 12:37:18
 Data Processed : 30/11/2555 14:06:11



1 Det.A Ch1/216nm



1 Det.A Ch1/216nm



1 Det.A Ch1/216nm

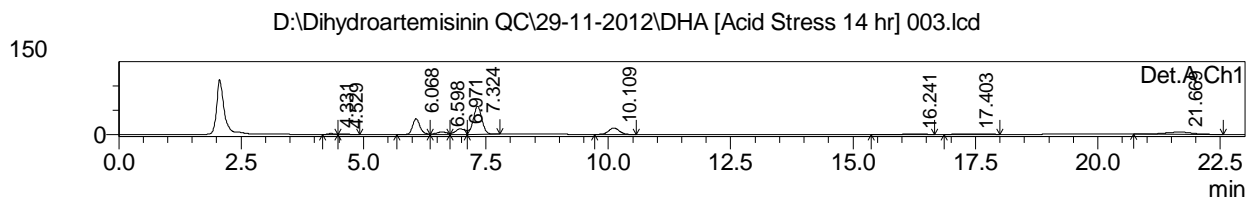
PeakTable

Detector A Ch1 216nm

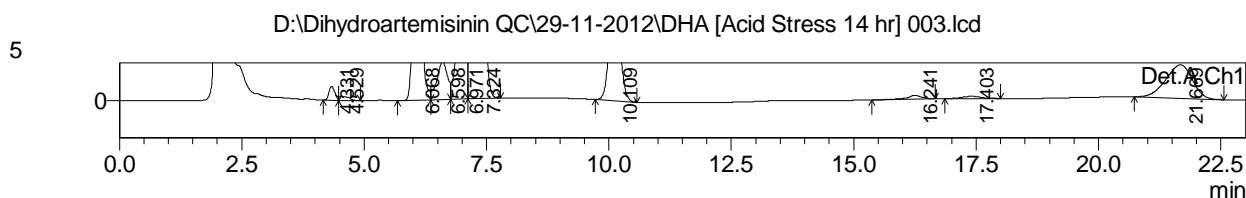
Peak#	Ret. Time	Area	Area %	Resolution	Tailing Factor	k'
1	0.158	2235	0.132	0.000	1.049	0.000
2	4.330	16152	0.951	16.308	0.000	26.479
3	4.532	7228	0.426	0.417	0.000	27.763
4	6.068	341815	20.135	3.035	1.240	37.512
5	6.598	76231	4.490	1.498	0.000	40.873
6	6.970	165097	9.725	0.760	0.000	43.236
7	7.325	710053	41.825	0.813	0.000	45.485
8	10.108	203364	11.979	7.640	1.059	63.151
9	17.395	6543	0.385	13.584	1.084	109.398
10	21.682	168939	9.951	5.084	0.925	136.604
Total		1697657	100.000			

==== Shimadzu LCsolution Analysis Report ====

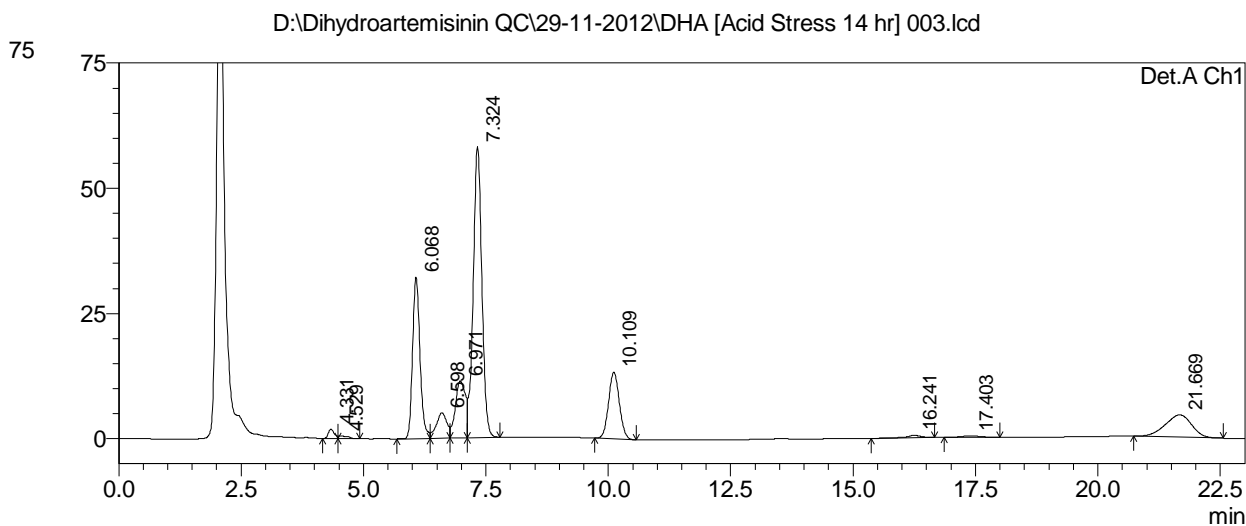
Sample Name : D:\Dihydroartemisinin QC\29-11-2012\DHA [Acid Stress 14 hr] 003.lcd
 Vial # : DHA 1 mg/ml in ACN:Water (60:40) stress with 0.2N HCl 14 hr 003
 Injection Volume : 26
 Data File Name : 20 uL
 Method File Name : DHA [Acid Stress 14 hr] 003.lcd
 Batch File Name : FR 0.6, 23 min.lcm
 Data Acquired : Stress Acid-Base-AcidHeat in Phosphate Buffer.lcb
 Data Processed : 30/11/2555 13:00:46
 : 30/11/2555 14:06:22



1 Det.A Ch1/216nm



1 Det.A Ch1/216nm



1 Det.A Ch1/216nm

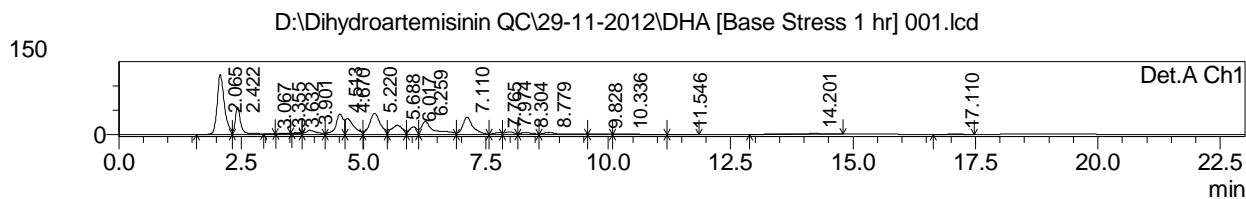
PeakTable

Detector A Ch1 216nm

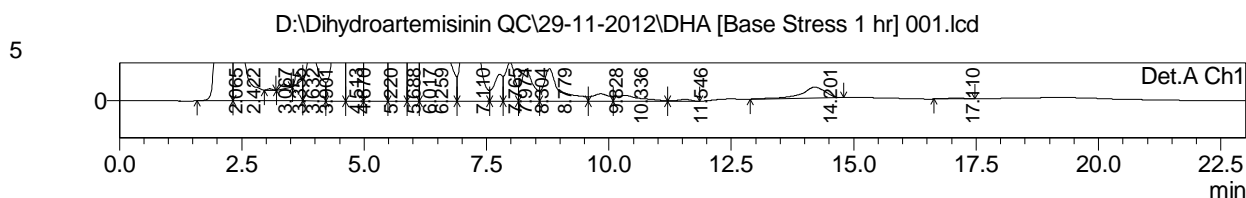
Peak#	Ret. Time	Area	Area %	Resolution	Tailing Factor	k'
1	4.331	16159	0.944	0.000	0.000	0.000
2	4.529	7494	0.438	0.345	0.000	0.046
3	6.068	340624	19.901	2.582	1.254	0.401
4	6.598	76419	4.465	1.481	0.000	0.523
5	6.971	166350	9.719	0.749	0.000	0.610
6	7.324	711891	41.593	0.795	0.000	0.691
7	10.109	204443	11.945	7.561	1.081	1.334
8	16.241	10786	0.630	13.899	0.803	2.750
9	17.403	8118	0.474	1.970	1.030	3.018
10	21.669	169273	9.890	4.939	0.908	4.003
Total		1711558	100.000			

==== Shimadzu LCsolution Analysis Report ====

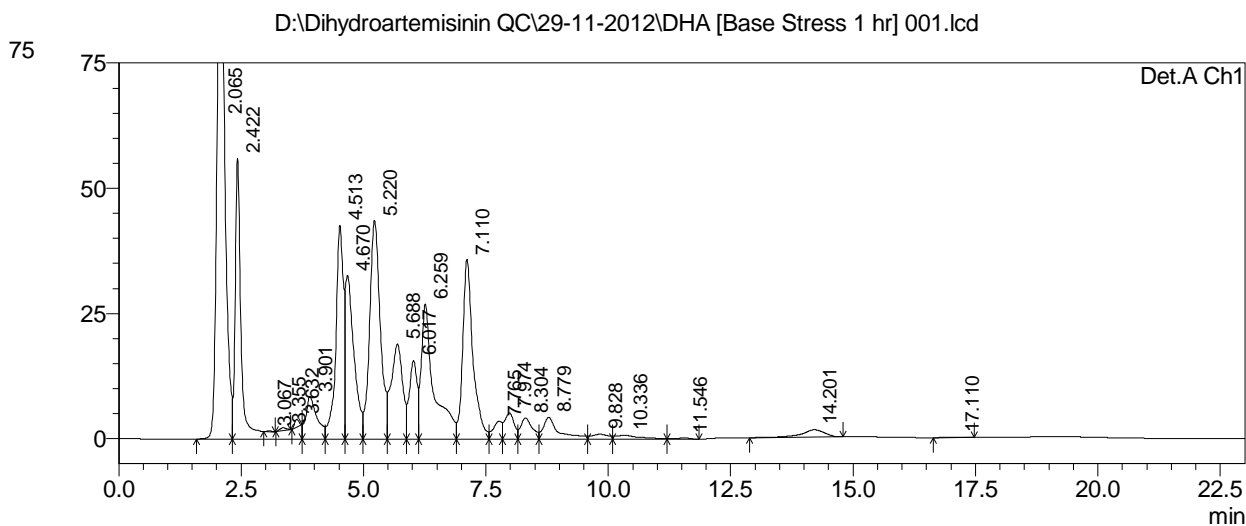
Sample Name : D:\Dihydroartemisinin QC\29-11-2012\DHA [Base Stress 1 hr] 001.lcd
 Vial # : DHA 1 mg/ml in ACN:Water (60:40) stress with 0.2N NaOH 1 hr 001 : 28
 Injection Volume : 20 uL
 Data File Name : DHA [Base Stress 1 hr] 001.lcd
 Method File Name : FR 0.6, 23 min.lcm
 Batch File Name : Stress Acid-Base-AcidHeat in Phosphate Buffer.lcb
 Data Acquired : 30/11/2555 16:08:59
 Data Processed : 30/11/2555 16:32:01



1 Det.A Ch1/216nm



1 Det.A Ch1/216nm



1 Det.A Ch1/216nm

PeakTable

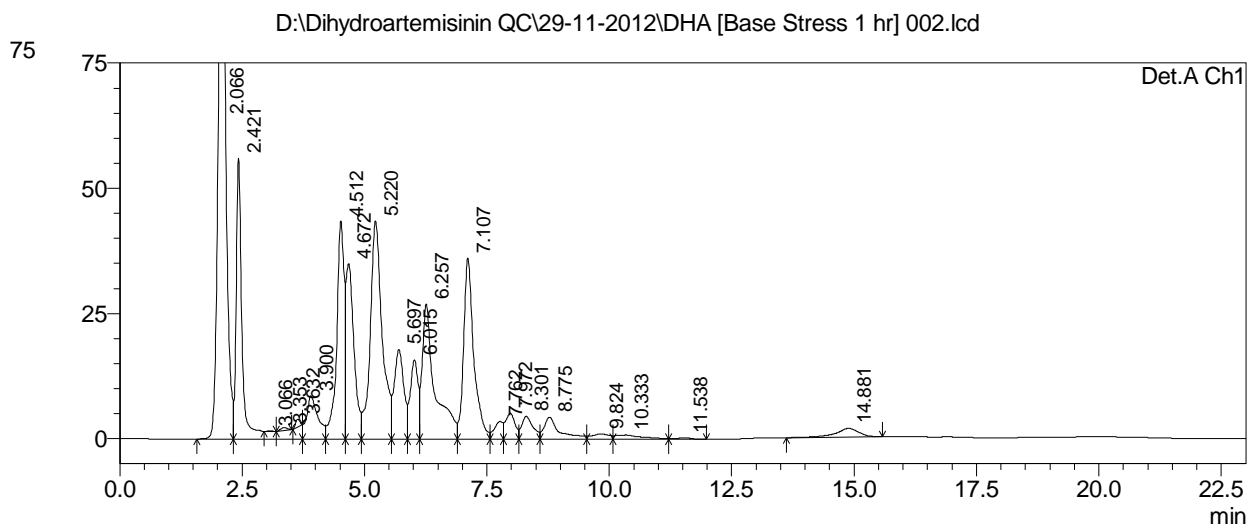
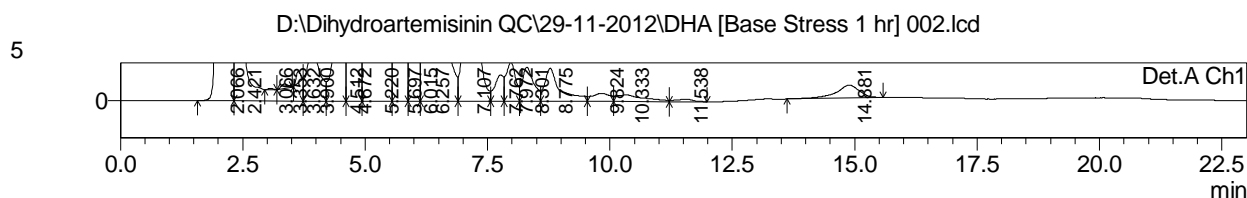
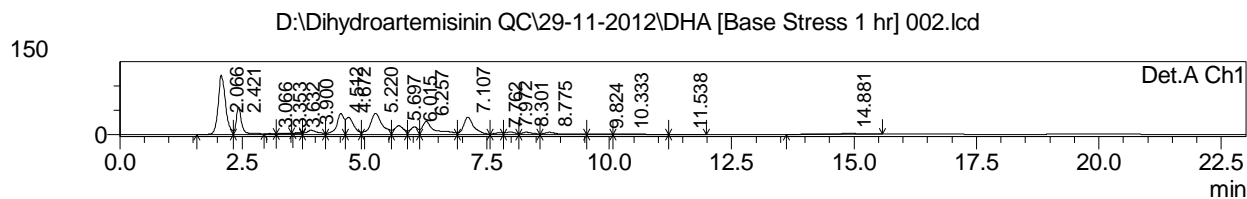
Detector A Ch1 216nm

Peak#	Ret. Time	Area	Area %	Resolution	Tailing Factor	k'
1	2.065	1277744	23.754	0.000	0.000	0.000
2	2.422	529195	9.838	1.551	0.000	0.173
3	3.067	1313	0.024	3.237	1.104	0.485
4	3.355	6081	0.113	1.201	1.077	0.625
5	3.632	9715	0.181	1.220	1.073	0.759
6	3.901	136708	2.541	0.902	0.000	0.889
7	4.513	467028	8.682	1.538	0.000	1.186
8	4.670	403831	7.507	0.269	0.000	1.262
9	5.220	664210	12.348	0.928	0.000	1.528
10	5.688	311293	5.787	1.064	0.000	1.755
11	6.017	172895	3.214	0.732	0.000	1.914
12	6.259	487636	9.065	0.627	0.000	2.031

Peak#	Ret. Time	Area	Area %	Resolution	Tailing Factor	k'
13	7.110	522680	9.717	2.412	0.000	2.443
14	7.765	45862	0.853	0.948	0.000	2.761
15	7.974	70543	1.311	0.277	0.000	2.862
16	8.304	70071	1.303	0.705	0.000	3.022
17	8.779	95567	1.777	1.066	0.000	3.251
18	9.828	23546	0.438	1.625	0.000	3.760
19	10.336	27093	0.504	0.395	0.000	4.006
20	11.546	4673	0.087	1.106	0.000	4.592
21	14.201	49174	0.914	4.294	0.761	5.878
22	17.110	2233	0.042	3.809	0.884	7.286
Total		5379090	100.000			

==== Shimadzu LCsolution Analysis Report ====

Sample Name : D:\Dihydroartemisinin QC\29-11-2012\DHA [Base Stress 1 hr] 002.lcd
 Vail # : DHA 1 mg/ml in ACN:Water (60:40) stress with 0.2N NaOH 1 hr 002
 : 28
 Injection Volume : 20 uL
 Data File Name : DHA [Base Stress 1 hr] 002.lcd
 Method File Name : FR 0.6, 23 min.lcm
 Batch File Name : Stress Acid-Base-AcidHeat in Phosphate Buffer.lcb
 Data Acquired : 30/11/2555 16:32:27
 Data Processed : 30/11/2555 16:55:27



PeakTable

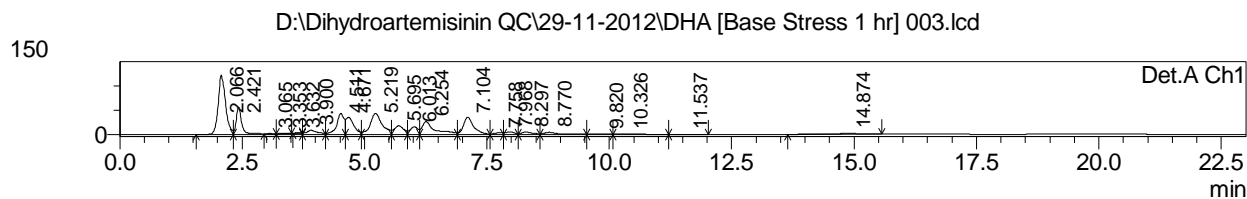
Detector A Ch1 216nm

Peak#	Ret. Time	Area	Area %	Resolution	Tailing Factor	k'
1	2.066	1287545	23.712	0.000	0.000	0.000
2	2.421	525030	9.669	1.524	0.000	0.172
3	3.066	1439	0.026	3.199	1.078	0.484
4	3.353	6250	0.115	1.189	1.084	0.622
5	3.632	9434	0.174	1.246	1.042	0.758
6	3.900	140504	2.588	0.902	0.000	0.887
7	4.512	470453	8.664	1.506	0.000	1.183
8	4.672	400086	7.368	0.284	0.000	1.261
9	5.220	736724	13.568	0.960	0.000	1.526
10	5.697	244326	4.500	1.148	0.000	1.757
11	6.015	178122	3.280	0.763	0.000	1.911
12	6.257	489995	9.024	0.629	0.000	2.028

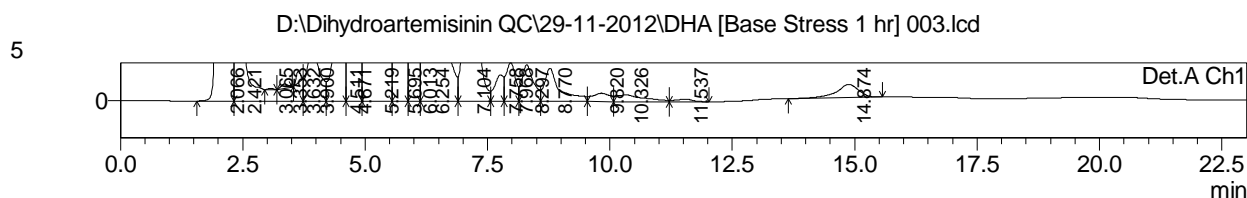
Peak#	Ret. Time	Area	Area %	Resolution	Tailing Factor	k'
13	7.107	523835	9.647	2.413	0.000	2.439
14	7.762	45266	0.834	0.975	0.000	2.756
15	7.972	69879	1.287	0.287	0.000	2.858
16	8.301	75263	1.386	0.714	0.000	3.017
17	8.775	97984	1.805	1.065	0.000	3.247
18	9.824	27874	0.513	1.528	0.000	3.754
19	10.333	35446	0.653	0.335	0.000	4.000
20	11.538	7937	0.146	0.890	0.000	4.583
21	14.881	56466	1.040	4.765	0.793	6.201
Total		5429859	100.000			

==== Shimadzu LCsolution Analysis Report ====

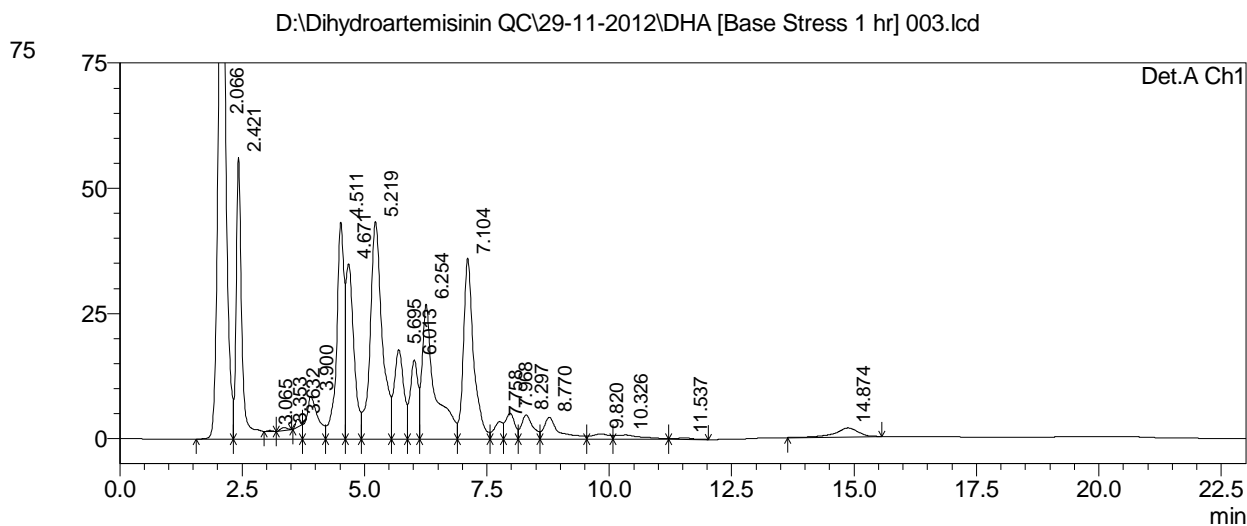
Sample Name : D:\Dihydroartemisinin QC\29-11-2012\DHA [Base Stress 1 hr] 003.lcd
 Vial # : DHA 1 mg/ml in ACN:Water (60:40) stress with 0.2N NaOH 1 hr 003
 : 28
 Injection Volume : 20 uL
 Data File Name : DHA [Base Stress 1 hr] 003.lcd
 Method File Name : FR 0.6, 23 min.lcm
 Batch File Name : Stress Acid-Base-AcidHeat in Phosphate Buffer.lcb
 Data Acquired : 30/11/2555 16:55:53
 Data Processed : 30/11/2555 17:18:55



1 Det.A Ch1/216nm



1 Det.A Ch1/216nm



1 Det.A Ch1/216nm

PeakTable

Detector A Ch1 216nm

Peak#	Ret. Time	Area	Area %	Resolution	Tailing Factor	k'
1	2.066	1287420	23.688	0.000	0.000	0.000
2	2.421	529632	9.745	1.515	0.000	0.172
3	3.065	1443	0.027	3.179	1.076	0.483
4	3.353	6212	0.114	1.186	1.082	0.623
5	3.632	9427	0.173	1.244	1.043	0.758
6	3.900	140104	2.578	0.899	0.000	0.887
7	4.511	470220	8.652	1.512	0.000	1.183
8	4.671	394378	7.257	0.298	0.000	1.261
9	5.219	738637	13.591	1.001	0.000	1.526
10	5.695	243241	4.476	1.152	0.000	1.757
11	6.013	178715	3.288	0.763	0.000	1.910
12	6.254	488647	8.991	0.628	0.000	2.027

Peak#	Ret. Time	Area	Area %	Resolution	Tailing Factor	k'
13	7.104	523286	9.628	2.412	0.000	2.438
14	7.758	44248	0.814	0.981	0.000	2.755
15	7.968	70531	1.298	0.288	0.000	2.856
16	8.297	80589	1.483	0.712	0.000	3.015
17	8.770	98366	1.810	1.063	0.000	3.245
18	9.820	28293	0.521	1.517	0.000	3.753
19	10.326	36021	0.663	0.384	0.000	3.997
20	11.537	8047	0.148	1.057	0.000	4.584
21	14.874	57352	1.055	4.845	0.796	6.199
Total		5434809	100.000			