

ยาที่มีหนึ่ง chiral center จะมีสอง enantiomer ยาที่มีจำหน่ายในท้องตลาดกว่า 80% ที่มีจำหน่ายในท้องตลาดอยู่ในรูปผสมของ enantiomer ทั้ง 2 (racemic) คุณสมบัติทางเภสัชวิทยา ความเป็นพิษ ขบวนการ metabolism ของ enantiomer มีความแตกต่างกันทำให้ประสิทธิผลทางการรักษา มีความแตกต่างกัน

การศึกษากครั้งนี้ได้มีการทบทวนวรรณกรรม การพัฒนาการผลิตเพอร์เกิลคอลัมน์ ที่เริ่มตั้งแต่ การค้นพบ nonequivalent NMR-signal โดยใช้ chiral solvent ในการละลาย จนกระทั่งการผลิต chiral column เพื่อจำหน่าย สำหรับการทดลองครั้งนี้ได้มีการผลิตเพอร์เกิลคอลัมน์ ชนิด (R)-N-3,5-dinitrobenzoyl-phenylglycine (DNBPG) โดยการสังเคราะห์ packing material จากการทำปฏิกิริยาระหว่าง silica กับ triethoxy-3-amino propylsilane ได้เป็น aminopropyl silica จากนั้นจึงเติม DNBPG เข้าที่ปลาย amino group (CSP-S) นำไปบรรจุใน HPLC column แล้วนำมาเปรียบเทียบกับประสิทธิภาพกับที่บรรจุด้วย packing material ที่เริ่มสังเคราะห์จาก aminopropyl silica ที่ซื้อ (CSP-P) และ column DNBPG ที่ซื้อสำเร็จรูป (ChiraSep<sup>®</sup>DNBPG)

ในการทดลองนี้มีการวัดขนาด particle ของ silica ที่ใช้ทั้งหมด มีการทดลองเปรียบเทียบวิธีการบรรจุ column โดยการใช้ methanol และ hexane เป็น solvent ในการกระจาย silica และการใช้แรงดันต่างๆในการบรรจุ ซึ่งก็พบว่า methanol เป็น solvent ที่ให้คอลัมน์ ที่มีประสิทธิภาพดีกว่า

สำหรับประสิทธิภาพในการแยก racemic bendroflumethiazide ของ CSP-S, CSP-P และ ChiraSep<sup>®</sup>DNBPG นั้น มีความแตกต่างกัน ซึ่งเชื่อว่าจะมาจากสูตรโครงสร้างของ chiral stationary phase ทั้ง 3 ชนิดที่ไม่เหมือนกัน และในการศึกษากครั้งนี้ได้เสนอกลไกการจับของ stationary phase และ analyte และขบวนการการแทนที่ของ mobile phase ต่อ analyte บน stationary phase ด้วย

mobile phase ที่ใช้คือ hexane และ dichloromethane (55:35) และมี 5% TFA เป็น modifier โดยมีสัดส่วนดังต่อไปนี้ 55:35:10 (MP1), 55:35:5.5 (MP2) และ 55:35:3.5 (MP3) จากการทดลองพบว่า CSP-S สามารถแยก bendroflumethiazide ได้ด้วย MP1 ส่วน CSP-P สามารถแยกได้ด้วย MP2 และ MP3 และ ChiraSep<sup>®</sup>DNBPG ไม่สามารถแยก racemic bendroflumethiazide ด้วย MP1 MP2 และ MP3

สำหรับ parameter ที่คำนวณได้จาก chromatogrammes มีดังนี้ CSP-S และ MP1 แยก bendroflumethiazide ได้ค่า retention times 14.09 และ 16.04 นาที ค่า  $k'$  7.94 และ 9.24 ค่า  $\alpha$  และ R 1.14 และ 1.27 ตามลำดับ CSP-P และ Chiral Sep<sup>®</sup>DNBPG ให้ค่า retention times 3.98 และ 6.89 นาที ค่า  $k'$  1.54 และ 1.19 ตามลำดับ จำนวน plate ต่อคอลัมน์ 1813 และ 8117 ความสูงของ theoretical plate 69 และ 30  $\mu\text{m}$  และไม่สามารถแยก enantiomer ได้

จากการศึกษา ได้เสนอ interaction ระหว่าง CSP-S กับ bendroflumethiazide และพบว่า chiral stationary phase มีความจำเพาะสูงมาก ส่วนที่มีบทบาทสำคัญในการแยกนี้ นอกจาก chiral part แล้วยังขึ้นอยู่กับจำนวน carbon ระหว่าง silicon กับส่วนที่เป็น chiral และ functional group อื่น ๆ บน silicon และ silanol group บน silica สำหรับ solventที่ใช้ จะต้องไม่ elute สารเร็วเกินไปจน ทำให้ คอลัมน์ไม่สามารถแยกความแตกต่างของ enantiomer ทั้ง 2 ได้

คอลัมน์ทั้ง 3 มีความแตกต่างกัน ของ CSP-S นั้น silanol group บน silica จับกับ silicon ในลักษณะ ether อีกพันธะของ silicon จับกับ ethoxy อีกแขนจับกับ chiral selector (aminopropyl (*R*)-phenylglycine-3,5-dinitrobenzoic acid amide linkage). สำหรับ CSP-P นั้น silicon จับกับ silanol group (ether-like) 1 พันธะ อีก 2 พันธะ เป็น methyl อีกพันธะเป็น chiral selector สำหรับ ChiralSep®DNBPG นั้น สูตรที่สมบูรณ์ยังไม่กระจ่าง แต่ส่วนที่เป็น chiral selector มีลักษณะเหมือน CSP-S และ CSP-P อย่างไรก็ดีตามเชื่อว่าหากปรับ mobile phase น่าจะแยกได้เช่นกัน

ปัญหาในการศึกษาครั้งนี้คือ การหาสารมาตรฐาน enantiomer สำหรับประโยชน์ที่ได้รับ ในครั้งนี้ได้ทำให้คณะผู้ศึกษามีประสบการณ์ในการสังเคราะห์ และการบรรจุอัดทั้งยังได้ทราบ ความจำเพาะเจาะจงของ column ชนิดนี้ รวมทั้งเป็นการเตรียมความพร้อมสำหรับโครงการในอนาคต ซึ่งถือว่าบรรลุเป้าหมาย

หลังการเสร็จสิ้นการศึกษาโครงการนี้ได้ทดลองเตรียมสาร chiral โดยการใช้ pure enantiomer เป็น mould ในการเตรียม natural polymer เพื่อใช้เป็น stationar phase ในการแยก racemic ของตัวมันเอง และ racemic อื่น ขณะนี้ยังอยู่ในระหว่างทำการทดลองอยู่ สำหรับ pure enantiomer ที่ใช้เป็น mould นั้นได้ ใช้ natural enantiomer ที่เป็นสารเคมีแทนที่จะเป็นยา เพื่อลด ปัญหาในการหา standard และ pure enantiomer

Drugs containing a chiral center are present in two enantiomers. Eighty percent of these drugs distributed in the market are in the combination of two enantiomers (racemic form). Pharmacodynamic, toxicity, distribution and metabolism rate of enantiomers are different. This resulted in the difference in therapeutic efficacy. An analytical method for determination of the two enantiomers is the only mean to study these effects.

In this study, Pirkle column development was reviewed. Pirkle's columns, (*R*)-*N*-3,5-dinitrobenzoyl-phenylglycine (DNBPG) were made. The packing material was derivatised from silica to aminopropyl silica and DNBPG was introduced at the amino part (CSP-S). This column was compared with the column packed with DNBPG synthesised from commercially available aminopropyl silica (CSP-P) and also the commercial DNBPG (ChiraSep<sup>®</sup>DNBPG) chiral column. Particle sizes of all kinds of silica were determined. Packing methods using methanol and hexane as the slurry solvent were compared at various pressures. Methanol was found to be a better solvent, giving a more efficient column. The efficiency in separation of racemic bendroflumethiazide by CSP-S, CSP-P and ChiraSep<sup>®</sup>DNBPG was compared. There was difference in the efficiency which is due to the difference in structures of the chiral stationary phases. The mechanism of the chiral stationary phase and analyte, the displacement of the mobile phase on the column were proposed.

Mixture of hexane and dichloromethane (55:35) was used as a normal mobile phase and 5% of TFA was used as a solvent modifier with the ratios of 55:35:10 (MP1), 55:35:5.5 (MP2) and 55:35:3.5 (MP3). Enantiomeric separation of bendroflumethiazide was obtained with the system of CSP-S and MP1 and the system of CSP-P and MP2 and MP3

The parameters obtained from the corresponding chromatogrammes are as follows:

CSP-S with MP1 gave retention times of 14.09 and 16.07 minutes, the  $k'$  were 7.94 and 9.24,  $\alpha$  and  $R$  were 1.14 and 1.27, respectively. CSP-P and ChiraSep<sup>®</sup> DNBPG with MP1 gave retention times of 3.98 and 6.89 minutes and  $k'$  were 1.54 and 1.19 respectively. Number of theoretical plates were 1813 and 8117 and the height equivalent of theoretical plate were 30 and 69  $\mu\text{m}$ , respectively. No enantiomeric separation was observed.

CSP-P with MP2 gave retention times of 7.64 and 8.05 minutes,  $k'$  were 3.87 and 4.11,  $\alpha$  and  $R$  were 1.05 and 0.44 respectively.

CSP-P with MP3 gave retention times of 17.53 and 18.75 minutes,  $k'$  were 10.16 and 10.94,  $\alpha$  and R were 1.07 and 0.81 respectively.

ChiraSeP<sup>®</sup>DNBPG with MP2 and MP3 did not resolved the racemic.

In this study the interaction of bendroflumethiazide with the chiral stationary phase was proposed. It was also found that the chiral material was very selective. The parts that played the crucial role in separation were not only the chiral part but also the spacer (number of carbon between silica and the chiral part), and the functional group on other bond of silicon and adjacent silanol group on silica. Modification of solvent was necessary for chiral recognition.

There were differences among 3 columns. For the CSP-S the 2 groups of silanol of silica bound covalently (ether like linkage) with the two bonds of silicon. The other two bonds of silicon is ethoxy and aminopropyl(*R*)-phenylglycine-3,5-dinitrobenzoic acid amide linkage. For CSP-P the silicon in the commercial aminopropyl silica was bonded with 1 silanol group. The other two bonds connected to methyl groups and the fourth was bonded with aminopropyl(*R*)-phenyl glycine-3,5-dinitrobenzoic acid amide linkage. For ChiraSeP<sup>®</sup>DNBPG, complete structure of the compound was still unclear; partial structure which show chiral part was the same as those synthesised. New composition of mobile phase should be tried.

The problem of the study of the enantiomeric separation of drugs is quite difficult in term of the seeking of authentic standard enantiomer.

From this work our team gained experience in synthesis and pack the column with the available packing machine. In wet packing the column, methanol is a better solvent for packing than hexane. It is also learned the selectiveness of the column which does not depend only on the chiral part. Functional groups in the surrounding also played a prominent role.

After this work, a chiral material by imprinting a pure enantiomer on a natural polymer will be used as a stationary phase to separate its own racemic and some other racemic. Simple enantiomers will be used as a mould to avoid the problem of seeking for pure enantiomeric standard.