CHEMOMETRIC TOOLS FOR CHROMATOGRAPHIC METHOD DEVELOPMENT AND DATA HANDLING OF CHROMATOGRAPHIC FINGERPRINTS

SUMATE THIANGTHUM 5137401 PYPP/D

Ph.D. (PHARMACEUTICAL CHEMISTRY AND PHYTOCHEMISTRY)

THESIS ADVISORY COMMITTEE: LEENA SUNTORNSUK, Ph.D., YVAN VANDER HEYDEN, Ph.D., CHUTIMA PHECHKRAJANG, Ph.D., LAWAN SRATTHAPHUT, Ph.D.

ABSTRACT

Nowadays, chemometrics has been introduced as a tool in analytical chemistry. Many analytical chemists apply chemometrics in several domains such as optimization of analytical methods and interpretation of chemical data. This work aimed to use chemometric methods in method development and data analysis of high performance liquid chromatographic (HPLC) fingerprint data.

Firstly, an anion exchang liquid chromatographic method for the separation and determination of heparin and its impurities was developed with the aid of a chemometric approach, including multivariate experimental design and response surface methodology. The separation of heparin and two impurities (i.e. dematan sulfate (DS) and oversulfated chondroitin sulfate (OSCS)) was achieved on an Ion PAC AS22 column with the gradient elution of 10% to 70% of 2.5 M sodium chloride and 20 mM Tris buffer (pH 2.1) at a flow rate of 0.6 mL/min. The detection was performed with a UV detector at 215 nm. The resolutions between DS/heparin and heparin/OSCS were on average, $R_s > 1.8$. Method validation parameters indicate good linearity for heparin (3 – 20 mg/mL), DS (200-400 µg/mL) and OSCS (90-160 µg/mL). The limits of detection were 800, 10.5 and 7.2 µg/mL whereas limits of quantitation were 2,500, 31.5 and 22.0 µg/mL (%RSD 3.22-10.12) for heparin, DS and OSCS, respectively. Moreover, the validated method was applied for the determination of heparin and its impurities in pharmaceutical formulations. They all complied with the USP limit (90.0-110.0% labeled amount for heparin). The % label amounts of heparin in the investigated raw material and products were between 90.3 – 97.8%. DS and OSCS were not detected in all samples.

Secondly, HPLC fingerprints of *Mallotus* and *Phyllanthus* samples were combined with data-handing techniques to model the antioxidant activity and indicate peaks possibly responsible for this activity. In the first step, exploratory analyses, using Principle Component Analysis (PCA) and Hierarchical Cluster Analysis (HCA) were performed to verify whether the antioxidant samples could be distinguished from the less or non-active samples. The score plot in PCA showed significantly diverging clustering tendencies better than the dendrogram in HCA. Moreover, PCA could distinguish some species of *Mallotus* and *Phyllanthus* samples. Then, the antioxidant activities of the samples were modeled as a function of the fingerprints using Partial Least Squares (PLS) and Orthogonal Projections to Latent Structure (O-PLS). The peaks potentially responsible for the antioxidant activity of the samples were indicated studying the regression coefficients of the models. In this study, comparing the regression coefficients plot of both models, not only showed similar coefficient profiles but also the peaks probably responsible for the antioxidant activity could be indicated at the same positions from both models.

KEY WORDS: CHEMOMETRICS/ HEPARIN/ OVERSULFATED CHONDROITIN SULFATE/ ION EXCHANGE CHROMATOGRAPHY/HPLC FINGERPRINT

117 pages

การประยุกต์ใช้คีโมเมตริกซ์ในงานด้านการพัฒนาวิธีวิเคราะห์ทางโครมาโทกราฟีและการประมวลผลข้อมูลจากลายพิมพ์ทางโครมาโท-กราฟี

CHEMOMETRIC TOOLS FOR CHROMATOGRAPHIC METHOD DEVELOPMENT AND DATA HANDLING OF CHROMATOGRAPHIC FINGERPRINTS

สุเมธ เที่ยงธรรม 5137401 PYPP/ D

ปร.ค. (เภสัชเคมีและพฤกษเคมี)

คณะกรรมการที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ : ลีณา สุนทรสุข, Ph.D., YVAN VANDER HEYDEN, Ph.D., ชุติมา เพชรกระจ่าง, Ph.D., ลาวัลย์ ศรัทธาพุทธ, Ph.D.

บทคัดย่อ

ปัจจุบันศาสตร์ทางคีโมเมตริกซ์ถูกนำมาใช้ในงานด้านเคมีวิเคราะห์มากขึ้น นักวิเคราะห์นำคีโมเมตริกซ์มาประยุกต์ใช้ในงานหลายแขนง อาทิ การหาสภาวะที่เหมาะสมของวิธีวิเคราะห์ การประมวลผลและการแปรความหมายของข้อมูลทางเคมีที่ซับซ้อน การศึกษานี้มีวัตถุประสงค์เพื่อนำคีโมเมตริกซ์มาประยุกต์ใช้ในงานการพัฒนาวิธีวิเคราะห์และการประมวลผลข้อมูลจากลายพิมพ์ทางโครมาโทกราฟี

งานวิทยานิพนธ์ส่วนที่ หนึ่งได้นำคีโมเมตริกซ์มาประยุกต์ใช้ในการพัฒนาวิธีวิเคราะห์ปริมาณเฮพารินและสารเจือปนในผลิตภัณฑ์ยาในประเทศไทย โดยการวางแผนการทดลองแบบพหุตัวแปรและวิธีของพื้นที่ผิวผลตอบ จนได้สภาวะที่เหมาะสม ดังนี้ คอลัมน์ชนิด ไอออนแพค เอเอส 22 ด้วยการชะตัวทำละลายเคลื่อนที่แบบขั้นบันไดจากร้อยละ 10 - 70 ของ โซเดียมคลอไรด์ความเข้มข้น 2.5 โมลาร์ และ ทริส บัฟเฟอร์ ความเข้มข้น 20 มิลลิโมลาร์ ที่ พีเอช 2.1 อัตรการไหล 0.6 มิลลิลิตรต่อนาทีตรวจวัดที่ความยาวคลื่น 215 นาโนเมตรด้วยแสงอัลตราไวโอเลต สภาวะดังกล่าวสามารถแยก เดอมาแทน ซัลเฟต และ เฮพาริน รวมทั้ง เฮพารินและสารเจือปนโอเอชซีเอส ด้วยค่าการแยกมากกว่า 1.8 วิธีวิเคราะห์ดังกล่าวได้ผ่านการตรวจสอบความถูกต้องของวิธีตามตัวแปรต่างๆดังนี้ ช่วงความเข้มข้นของการตรวจวิเคราะห์ที่มีความเป็นเส้นตรง คือ 3 - 20 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรสำหรับเฮพาริน 200 - 400 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร สำหรับเดอมาแทน ซัลเฟต และ 90 – 160 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร สำหรับโอเอชซีเอส ขีดจำกัดการตรวจวัดอยู่ที่ 800 10.5 และ 7.2 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และขีดจำกัดของการตรวจวัดเชิงปริมาณอยู่ที่ 2,500, 31.5 และ 22.0 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร สำหรับเฮพาริน, เดอมาแทน ซัลเฟต และโอเอชซีเอส ตามลำดับ วิธีวิเคราะห์ที่ผ่านการตรวจสอบความถูกต้องได้ถูกนำมาใช้ในการหาปริมาณเฮพารินและสารเจือปนในผลิตภัณฑ์ยา พบว่า ปริมาณของเฮพารินที่ตรวจพบทั้งในวัตถุดิบและผลิตภัณฑ์ยาอยู่ในช่วงร้อยละ 90.3 - 97.8 และตรวจไม่พบสารเจือปนทั้งสองชนิดในทุกตัวอย่าง ซึ่งเป็นไปตามข้อกำหนดของตำรายา

งานในส่วนที่สองได้นำคีโมเมตริกซ์ไปใช้ในการประมวลผลข้อมูลจากลายพิมพ์ทางโครมาโทกราฟีของพืชสกุล *Mallotus* และ *Phyllanthus* เพื่อทำนายพีคบนโครมาโทแกรมที่แสดงฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ โดยมีขั้นตอนดังนี้ นำข้อมูลที่ได้จากลายพิมพ์ทางโครมาโทกราฟีของพืชทั้งสองสกุลมาทำการจำแนกตามฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยเทคนิคการวิเคราะห์องค์ประกอบหลักและเทคนิคการวิเคราะห์องค์ประกอบแบบแผนภูมิ พบว่า เทคนิคการวิเคราะห์องค์ประกอบหลัก ให้ผลการจำแนกที่ดีกว่าเทคนิคการวิเคราะห์องค์ประกอบแบบแผนภูมิ และเทคนิคเทคนิคการวิเคราะห์องค์ประกอบหลัก ยังสามารถจำแนกสายพันธุ์ของพืชสกุล *Mallotus* และ *Phyllanthus* บางสายพันธุ์ ได้อีกด้วย จากนั้น สร้างสมการเพื่อศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างข้อมูลจากลายพิมพ์ทางโครมาโทรกราฟีและข้อมูลของฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธีการถดถอยแบบกำลังสองน้อยที่สุดบางส่วนและวิธีการถดถอยแบบกำลังสองน้อยที่สุดบางส่วนเชิงตั้งฉาก เพื่อทำนายพีคบนโครมาโทแกรมที่มีความสัมพันธ์กับฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ด้วยค่าสัมประสิทธิ์ความถดถอย ซึ่งพบว่า ทั้งสองวิธีสามารถแสดงพีคที่มีความสัมพันธ์ที่สามารถบ่งชี้ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระได้

117 หน้า