รายงานการวิจัย

# การสร้างอนุพันธ์ที่สามารถฟลูออเรสซ์ได้ของคลาริโทรมัยซิน เพื่อใช้ในการตรวจวัดปริมาณ โดยวิธีไฮเปอร์ฟอร์แมนซ์ลิควิดโครมาโทกราฟี

จุติมา บุญเลี้ยง[1]

## Abstract

**Boonleang, J.[1]**

**Fluorescence derivatization of clarithromycin for high performance liquid chromatographic determination with fluorescence detection**

**Songklanakarin J. Sci. Technol., 2007, 29(2) : 427-440**

**Clarithromycin (CAM) is a semisynthetic macrolide antibiotic whose chemical structure has no suitable chromophore for highly sensitive and accurate direct determination. The aim of this study was to derivatize CAM with fluorescence-labeling compounds capable of enhancing the sensitivity of CAM determination. Two fluorescence-labeling compounds were used in this study, 9-fluorenylmethyloxycarbonyl chloride (FMOC-Cl) and 1-naphthylisocyanate (NIC), both of which gave the fluorescent derivatives of CAM with approximately the same fluorescence intensity. The derivatization reactions in the concentration range studied (0.1-2.4 μg/ml) were reproducible with coefficient of variation of less than 6.01% and the fluorescence responses were linearly proportional to CAM concentration with $r^2$ of greater than 0.99. The reaction of**

**[1]Department of Pharmaceutical Chemistry, Faculty of Pharmaceutical Sciences, Prince of Songkla University, Hat Yai, Songkhla, 90112 Thailand.**

[1]Ph.D. (Pharmaceutical Chemistry), ภาควิชาเภสัชเคมี คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ อำเภอหาดใหญ่ จังหวัดสงขลา 90112

Corresponding e-mail: jutima@pharmacy.psu.ac.th

รับต้นฉบับ 30 พฤษภาคม 2549 รับลงพิมพ์ 7 กันยายน 2549

**CAM with FMOC-Cl optimally occurred in a solvent mixture of acetonitrile and phosphate buffer pH 7.5 (4:1 volume ratio) at 40°C for 40 min. The optimum derivatization reaction of CAM with NIC took place in acetonitrile with triethylamine as catalyst at 30°C for 60 min. It was mild and quantitative giving CAM-NIC fluorescent derivative, which is more stable at room temperature than CAM-FMOC derivative. This derivatization should, therefore, be more applicable for highly sensitive CAM determination especially for the study involving the analysis of several samples.**

**Key words :** clarithromycin, fluorescence derivatization, 9-fluorenylmethyloxycarbonyl chloride, 1-naphthylisocyanate

## บทคัดย่อ

**จุติมา บุญเลี้ยง**

**การสร้างอนุพันธ์ที่สามารถฟลูออเรสซ์ได้ของคลาริโทรมัยซินเพื่อใช้ในการตรวจวัดปริมาณโดยวิธีไฮเปอร์ฟอร์แมนซ์ลิควิดโครมาโทกราฟี**

**ว. สงขลานครินทร์ วทท. 2550 29(2) : 427-440**

**คลาริโทรมัยซินเป็นยาปฏิชีวนะกึ่งสังเคราะห์ในกลุ่มแมคโครไลด์ ซึ่งโครงสร้างโมเลกุลไม่มีโครโมฟอร์ที่เหมาะสม ทำให้การตรวจวิเคราะห์ปริมาณในตัวอย่างที่มีความเข้มข้นของคลาริโทรมัยซินต่ำ ๆ ไม่สามารถทำได้อย่างถูกต้องแม่นยำ การศึกษานี้จึงได้ทำการดัดแปลงโครงสร้างทางเคมี โดยการทำปฏิกิริยากับ 9-fluorenylmethyloxycarbonyl chloride (FMOC-Cl) และ 1-naphthylisocyanate (NIC) ได้อนุพันธ์ที่สามารถฟลูออเรสซ์ได้ โดยอนุพันธ์ที่ได้จากปฏิกิริยาทั้งสองมีความสามารถในการฟลูออเรสซ์ใกล้เคียงกัน ปฏิกิริยาในช่วงความเข้มข้นที่ทำการศึกษา (0.1-2.4 ไมโครกรัม/มล.) มีความคงที่ แม่นยำ โดยมีค่าสัมประสิทธิ์ของความเบี่ยงเบนน้อยกว่า 6.01% และมีความสัมพันธ์เป็นเส้นตรงกับความเข้มข้นของคลาริโทรมัยซิน โดยมีค่า $r^2$ สูงกว่า 0.99 สภาวะที่เหมาะสมในการทำปฏิกิริยาระหว่างคลาริโทรมัยซินกับ FMOC-Cl เกิดในสารละลายผสมของ acetonitrile และฟอสเฟสบัฟเฟอร์ pH 7.5 ในอัตราส่วน 4:1 (โดยปริมาตร) ที่อุณหภูมิ 40°C นาน 40 นาที และสภาวะที่เหมาะสมในการทำปฏิกิริยากับ NIC เกิดใน acetonitrile โดยมี triethylamine เป็นตัวเร่งปฏิกิริยาที่อุณหภูมิ 30°C นาน 60 นาที ซึ่งการเกิดปฏิกิริยากับ NIC สามารถเกิดได้ง่ายกว่า และให้อนุพันธ์ที่มีความคงตัวที่อุณหภูมิห้องนานกว่าอนุพันธ์ของคลาริโทรมัยซินกับ FMOC-Cl จึงเป็นปฏิกิริยาที่มีความเหมาะสมในการนำไปใช้ในการตรวจวิเคราะห์ปริมาณคลาริโทรมัยซิน โดยเฉพาะในการศึกษาที่ต้องตรวจวิเคราะห์ตัวอย่างเป็นจำนวนมาก**

คลาริโทรมัยซิน (clarithromycin, CAM) เป็นยาปฏิชีวนะกึ่งสังเคราะห์ตัวใหม่ในกลุ่มแมคโครไลด์ (macrolide) โดยมีโครงสร้างหลักเป็นวงแลคโตนที่มีขนาด 14 อะตอม (14-membered lactone ring) ต่ออยู่กับน้ำตาล cladinose และน้ำตาล desosamine ด้วยพันธะไกลโคซิดิก (glycosidic bond) ที่ตำแหน่ง C-3 และ C-5 ตามลำดับ (Figure 1; Merck Index, 1996) CAM ได้จากการดัดแปลงโครงสร้างของอิริโทรมัยซิน (erythromycin) ที่ตำแหน่ง C-6 โดยการแทนที่หมู่ไฮดรอกซิลในอิริโทรมัยซินด้วยหมู่เมธอกซิล (methoxyl group) ทำให้ CAM มีความคงตัวในสภาวะกรดเพิ่มขึ้น ส่งผลให้ชีวประโยชน์ของยาเมื่อให้โดยวิธีรับประทาน (oral bioavailability) รวมทั้งคุณสมบัติอื่น ๆ ทางเภสัชจลนศาสตร์ดีกว่าอิริโทรมัยซิน คุณสมบัติพิเศษได้แก่ ความสามารถในการกระจายตัวเข้าสู่เซลล์และเนื้อเยื่อได้ดี และสามารถกระจายตัวอยู่ในเนื้อเยื่อได้เป็นเวลานาน ทำให้มีประสิทธิภาพสูงในการฆ่าเชื้อที่อยู่ในเนื้อเยื่อต่าง ๆ โดยไม่จำเป็นต้องบริหารยาบ่อยครั้ง (Gerald *et al.*, 2002; Markham *et al.*, 1996)

CAM มีฤทธิ์ฆ่าเชื้อแบคทีเรียได้อย่างกว้างขวางทั้งชนิด gram-positive และ gram-negative สามารถใช้ใน

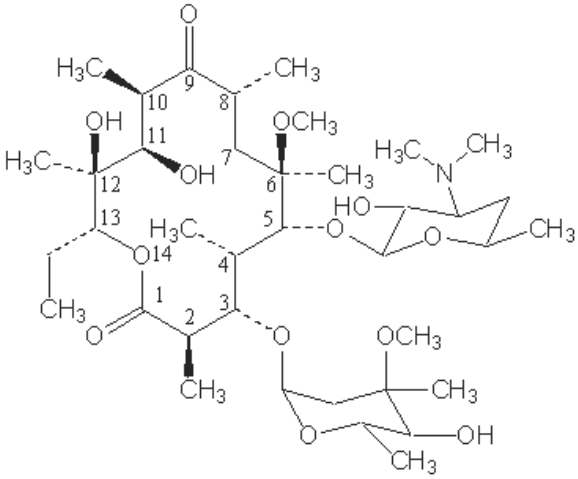

**Figure 1. Chemical structure of clarithromycin**

การรักษาการติดเชื้อในระบบทางเดินหายใจส่วนบนและส่วนล่าง การติดเชื้อในระบบสืบพันธุ์ การติดเชื้อของผิวหนังและโครงสร้างของผิวหนัง ใช้ในการรักษาและป้องกันการติดเชื้อแบบกระจัดกระจายจาก *Mycobacterium avium* complex (MAC) ในผู้ป่วยที่มีการติดเชื้อ HIV (Human Immunodeficiency Virus) นอกจากนี้ยังใช้ร่วมกับยาฆ่าเชื้อตัวอื่น ๆ ในการรักษาการติดเชื้อฉวยโอกาสนอกเหนือจาก MAC ในผู้ป่วยโรคเอดส์หรือผู้ป่วยที่ได้รับยากดระบบภูมิคุ้มกัน CAM ถูกนำมาใช้ร่วมกับ amoxycillin หรือยาปฏิชีวนะตัวอื่น และยาที่ยับยั้งการหลั่งกรด ($H_2$-receptor antagonist) เช่น lansoprazole หรือ omeprazole ในแผนการรักษามาตรฐานของการรักษาโรคแผลในกระเพาะอาหารและลำไส้ที่มีความสัมพันธ์กับการติดเชื้อ *Helicobacter pylori* (Gerald *et al.*, 2002; Markham *et al.*, 1996)

เนื่องจากโครงสร้างโมเลกุลของ CAM ไม่มีโครโมฟอร์ (chromophore) ที่เหมาะสม การดูดกลืนแสงสามารถเกิดขึ้นได้เฉพาะที่ความยาวคลื่นต่ำ ๆ (< 210 nm) โดยมีค่าความสามารถในการดูดกลืนแสงน้อยมาก การตรวจวัดโดยวิธีนี้จึงมีความไวในการตรวจวัดต่ำมาก (Morgan *et al.*, 1990; Gorski *et al.*, 1991; Morgan *et al.*, 1991; Erah *et al.*, 1996) ไม่สามารถใช้ในการตรวจวัดปริมาณ CAM ในตัวอย่างของเหลวชีวภาพที่มีปริมาณยาต่ำมาก ๆ ได้ การตรวจวัดทางเคมีไฟฟ้าเป็นวิธีที่ให้ความไวในการตรวจวัดสูง สามารถใช้ในการวิเคราะห์ปริมาณ CAM ในตัวอย่างของเหลวชีวภาพ (Chu *et al.*, 1991; Hedenmo *et al.*, 1995; Kees *et al.*, 1998; Taninaka *et al.*, 2000; Choi *et al.*, 2001; Niopas *et al.*, 2001; Pappa-Louisi *et al.*, 2001; Wibawa *et al.*, 2003) แต่มีข้อเสียคือ ให้ผลการวิเคราะห์ไม่สม่ำเสมอ (low reproducibility) เนื่องจากความไวในการตรวจวัดของอิเลกโทรดลดลงเรื่อย ๆ เมื่อทำการตรวจวัดตัวอย่างเป็นจำนวนมาก เนื่องจากการสะสมของตัวอย่างที่อิเลกโทรด การตรวจวัดโดยวิธี LC-MS มีความจำเพาะเจาะจง รวมทั้งความไวในการตรวจวัดสูง และสามารถวิเคราะห์ตัวอย่างได้อย่างรวดเร็ว (Rooyen *et al.*, 2002; Lerner *et al.*, 2000) อย่างไรก็ตามเครื่อง LC-MS เป็นเครื่องมือที่มีราคาแพงมาก ห้องปฏิบัติการส่วนใหญ่จึงไม่มีเครื่องมือนี้สำหรับงานวิเคราะห์ นอกจากนี้ค่าใช้จ่ายในการวิเคราะห์โดยวิธี LC-MS มีราคาสูงมาก

การตรวจวัดปริมาณโดยวิธีฟลูออเรสเซนซ์เป็นอีกวิธีหนึ่งที่มีความจำเพาะเจาะจง ความแม่นยำในการวิเคราะห์และความไวในการตรวจวัดสูงมาก จึงเป็นวิธีที่เหมาะสมสำหรับการตรวจวัดปริมาณ CAM ในการศึกษาที่ต้องการความไวในการตรวจวัดสูง โดยต้องทำการดัดแปลงโครงสร้างของ CAM ให้มีส่วนที่สามารถฟลูออเรสซ์ได้ การตรวจวัดปริมาณยาปฏิชีวนะในกลุ่มแมคโครไลด์โดยวิธีฟลูออเรสเซนซ์ที่มีรายงานในวารสาร (Torano *et al.*, 1998) เป็นการสร้างอนุพันธ์โดยใช้ 9-fluorenylmethyloxycarbonyl chloride เป็นสารติดฉลากฟลูออเรสเซนซ์ และใช้อิริโทรมัยซิน และ

รอกซิโทรมัยซิน (roxithromycin) เป็นยาต้นแบบ ได้อนุพันธ์คาร์บอเนตเอสเทอร์ที่ไม่ค่อยคงตัว โดยสามารถเก็บที่อุณหภูมิห้องได้นานเพียง 4 ชั่วโมง (ปริมาณยาคงเหลือประมาณ 95%) ทำให้ไม่สามารถทำการตรวจวิเคราะห์ตัวอย่างจำนวนมาก ๆ ได้อย่างถูกต้องแม่นยำ การวิจัยนี้จึงได้ประยุกต์ปฏิกิริยาดังกล่าว รวมทั้งศึกษาการสร้างอนุพันธ์คาร์บาเมต-เอสเทอร์ของ CAM ซึ่งน่าจะมีความคงตัวดีกว่าอนุพันธ์คาร์บอเนตเอสเทอร์ โดยใช้ 1-naphthylisocyanate เป็นสารติดฉลากฟลูออเรสเซนซ์ โดยทำการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการสร้างอนุพันธ์ดังกล่าว เพื่อให้ได้อนุพันธ์ที่มีความสามารถในการฟลูออเรสซ์สูง และมีความคงตัวดี สามารถนำไปใช้ในการตรวจวิเคราะห์ตัวอย่างที่มีความเข้มข้นของ CAM ต่ำ ๆ ได้อย่างถูกต้องแม่นยำ โดยเฉพาะอย่างยิ่งในการศึกษาที่ต้องทำการตรวจวิเคราะห์ตัวอย่างเป็นจำนวนมาก เช่น ในการศึกษาเภสัชจลนศาสตร์ของยาในประชากรไทย รวมทั้งการตรวจติดตามระดับความเข้มข้นของยาในผู้ป่วย โดยเฉพาะผู้ป่วยโรคเอดส์ ผู้ป่วยที่รับประทานยากดระบบภูมิคุ้มกันของร่างกาย ผู้ป่วยที่การทำงานของตับและไตผิดปกติ เพื่อปรับระดับยาให้เหมาะสม

## วัสดุอุปกรณ์และวิธีการทดลอง

### 1. สารเคมี

Acetonitrile (HPLC grade) และ methanol (HPLC grade) จาก Lab-Scan Co. Ltd., Thailand, clarithromycin (CAM) ได้รับจาก Unison Laboratories, Co. Ltd., Thailand, 1-naphthylisocyanate (NIC), 9-fluorenylmethyloxycarbonyl chloride (FMOC-Cl) และ glycine จาก Sigma-Aldrich, Singapore หรือ USA, 1-hexanesulfonic acid sodium salt และ triethylamine (TEA) จาก Fluka, USA, potassium dihydrogen phosphate ($KH_2PO_4$) จาก Riedel-deHaen, Germany และ potassium hydroxide จาก Merck, Germany สารเคมีที่ใช้เป็น analytical หรือ HPLC grade สั่งซื้อและนำมาใช้โดยตรง โดยไม่มีการทำให้บริสุทธิ์เพิ่มเติม

### 2. สารละลายมาตรฐาน

2.1 สารละลายสต็อก CAM ใน acetonitrile ความเข้มข้น 1000 ไมโครกรัม/มล. เตรียมโดยชั่งสารมาตรฐาน CAM จำนวน 25 มก. ละลายและปรับปริมาตรด้วย acetonitrile ให้ครบ 25 มล.ในขวดปรับปริมาตร

2.2 สารละลาย CAM ใน acetonitrile ความเข้มข้น 10 ไมโครกรัม/มล. : เจือจางจากสารละลายสต็อก CAM

2.3 สารละลาย CAM ใน acetonitrile ความเข้มข้น 0.1, 0.4, 1.0, 1.6 และ 2.4 ไมโครกรัม/มล. : เจือจางจากสารละลาย CAM ใน acetonitrile ความเข้มข้น 10 ไมโครกรัม/มล.

### 3. เครื่องมือและสภาวะการทดลองทางโครมาโทกราฟี

เครื่อง High Performance Liquid Chromatography (HPLC, Agilent 1100 Series, Agilent Technologies, USA) ประกอบด้วยปั๊มดูดตัวทำละลายความดันสูง เครื่องฉีดสารอัตโนมัติ เครื่องควบคุมอุณหภูมิของคอลัมน์ เครื่องตรวจวัดชนิดฟลูออเรสเซนซ์ ที่ความยาวคลื่นกระตุ้น ($\lambda$ex) 275 nm และวัดการปล่อยแสงที่ความยาวคลื่น ($\lambda$em) 318 nm เมื่อใช้ FMOC-Cl ในการสร้างอนุพันธ์ และใช้ $\lambda$ex ที่ 225 nm $\lambda$em ที่ 362 nm เมื่อใช้ NIC ในการสร้างอนุพันธ์ เครื่องคอมพิวเตอร์พร้อมโปรแกรม Chemstation สำหรับควบคุมการทำงานและประมวลผล คอลัมน์ที่ใช้ในการติดตามปฏิกิริยาเป็นชนิด $C_{18}$ (Hypersil BDS $C_{18}$ 150 x 4.6 มม. ขนาดอนุภาค 5 ไมครอน Thermo Electron Corporation, USA) โมบายเฟสที่ใช้ในการศึกษามี 2 ชนิด คือ

1. สารผสมของ acetonitrile และ 0.1% w/v hexanesulfonic acid sodium salt

2. สารผสมของ acetonitrile และ 0.05 M $KH_2PO_4$ 0.1% v/v TEA ผสมอยู่ด้วย pH 7.5 ในอัตราการไหลที่เหมาะสม โดยทำการกรองผ่านแผ่นกรองเมมเบรนขนาด 0.22 ไมครอน และทำการไล่อากาศออกโดยวิธีเขย่าด้วยคลื่นเสียงความถี่สูง (ultra sonication) ก่อนนำมาใช้

### 4. วิธีการทดลอง

การศึกษานี้ได้ทดลองศึกษาปฏิกิริยาที่ใช้ในการสร้างอนุพันธ์ที่ฟลูออเรสซ์ได้ของ CAM โดยใช้สารติดฉลากฟลูออเรสเซนซ์ (fluorescence-labeling compounds) 2

ชนิด คือ FMOC-Cl ซึ่งจัดอยู่ในกลุ่ม carbonyl chloride และ NIC ซึ่งจัดอยู่ในกลุ่ม isocyanate โดยมีขั้นตอนการศึกษาดังนี้

4.1 การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการเกิดปฏิกิริยาระหว่าง CAM กับ FMOC-Cl

4.1.1 ศึกษาผลของตัวกลางที่ใช้ในการทำปฏิกิริยา ได้แก่ acetonitrile สารผสมของ acetonitrile และ 0.1M $KH_2PO_4$ pH 6.5, pH 7.5 และ pH 8.5 และผลของอัตราส่วนโดยปริมาตรของ acetonitrile ต่อ 0.1M $KH_2PO_4$

4.1.2 ศึกษาอัตราเร็วในการเกิดปฏิกิริยา โดยทำการติดตามการเกิดอนุพันธ์ CAM-FMOC ที่เวลาต่างๆ โดยวิธี HPLC โดยใช้สภาวะการทดลองที่เหมาะสม

4.1.3 ศึกษาความคงตัวของอนุพันธ์ CAM-FMOC เมื่อตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง โดยทำการติดตามการเปลี่ยนแปลงของปริมาณอนุพันธ์ CAM-FMOC ที่เวลาต่างๆ หลังจากปฏิกิริยาสิ้นสุดโดยวิธี HPLC

4.1.4 ศึกษา linearity และ reproducibility ของปฏิกิริยา ทำการทดลองโดยใช้ความเข้มข้นของ CAM ต่างๆ กัน จำนวน 5 ความเข้มข้น ในช่วง 0.1-2.4 ไมโครกรัม/มล. โดยแต่ละความเข้มข้นทำการทดลองซ้ำเป็นจำนวน 5 ครั้ง เปรียบเทียบขนาดพื้นที่พีค (peak area) ของอนุพันธ์ CAM-FMOC ที่ได้จากการทดลองซ้ำในแต่ละความเข้มข้น

4.2 การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการเกิดปฏิกิริยาระหว่าง CAM กับ NIC ทำการศึกษาในทำนองเดียวกับข้อ 4.1

4.3 ประเมินความเหมาะสมของปฏิกิริยาที่จะใช้ในการสร้างอนุพันธ์ที่ฟลูออเรสซ์ได้ของ CAM ในเรื่องต่อไปนี้

4.3.1 อัตราเร็วในการเกิดปฏิกิริยา

4.3.2 สภาวะที่ใช้ในการทำปฏิกิริยา

4.3.3 ความคงตัวของอนุพันธ์ที่ได้ที่อุณหภูมิห้อง

4.3.4 Fluorescence intensity, linearity และ reproducibility ของปฏิกิริยา

ปฏิกิริยาที่เลือกใช้ในการสร้างอนุพันธ์ที่ฟลูออเรสซ์ได้ของ CAM จะต้องสามารถเกิดได้ง่าย ในสภาวะที่ไม่รุนแรง (mild condition) ปฏิกิริยาเกิดได้ค่อนข้างสมบูรณ์ (quantitative) หรือให้ผลคงที่ไม่เปลี่ยนแปลง (reproducible) อนุพันธ์ที่ได้มีความคงตัวดีที่อุณหภูมิห้อง มีความสามารถในการฟลูออเรสซ์ได้ดี และเกิดขึ้นในปริมาณที่สัมพันธ์โดยตรงกับปริมาณ CAM ในปฏิกิริยา

## ผลการทดลองและวิจารณ์

### 1. สภาวะที่เหมาะสมในการเกิดปฏิกิริยาระหว่าง CAM กับ FMOC-Cl และสภาวะทาง HPLC ที่เหมาะสมในการติดตามปฏิกิริยา

สภาวะในการทำปฏิกิริยาระหว่าง CAM และ FMOC-Cl ที่ทำการศึกษา ได้แก่

1.1 สภาวะที่ปราศจากน้ำ

a) ทำปฏิกิริยาโดยใช้ acetonitrile เป็นตัวกลางในการทำปฏิกิริยาในสภาวะที่มี TEA โดยใช้จำนวนสมมูลของ CAM : FMOC-Cl : TEA ในอัตราส่วน 1:3:3 ที่อุณหภูมิ 45°C

b) ทำปฏิกิริยาโดยใช้ acetonitrile เป็นตัวกลางในการทำปฏิกิริยาในสภาวะที่มี TEA โดยใช้จำนวนสมมูลของ CAM : FMOC-Cl : TEA ในอัตราส่วน 1:200:500 ที่อุณหภูมิ 45°C

1.2 สภาวะที่มีน้ำ

ทำปฏิกิริยาโดยใช้สารผสมของ acetonitrile และ 0.1M $KH_2PO_4$ pH 7.5 เป็นตัวกลางในการทำปฏิกิริยาโดยใช้จำนวนสมมูลของ CAM : FMOC-Cl ในอัตราส่วน 1:200 ที่อุณหภูมิ 40°C

การเปลี่ยนแปลงที่เกิดขึ้นในปฏิกิริยาได้ถูกติดตามโดย HPLC โดยสภาวะการทดลองเริ่มต้นได้เลือกใช้วิธี ion-paired reversed-phase HPLC โดยใช้โมบายเฟสเป็นสารละลายผสมของ acetonitrile กับ 0.1% w/v sodium hexanesulfonate pH 3.8 เป็น pairing agent และทำการตรวจวัดโดยเครื่องตรวจวัดชนิดฟลูออเรสเซนซ์ที่ λex 275 nm และ λem 318 nm จากการทดลองพบว่าโครมาโทแกรมของ reaction mixture และ blank mixture (สารผสมที่มีส่วนประกอบเหมือน reaction mixture ยกเว้นไม่มี CAM) ในทุกปฏิกิริยามีลักษณะการเปลี่ยนแปลงที่เหมือนกัน ดังแสดงใน Figure 2a, 2b, 3a และ 3b แสดงว่าการเปลี่ยนแปลงที่เกิดขึ้นไม่ได้เกิดจากปฏิกิริยาของ CAM กับ FMOC-Cl แต่เกิดจากการเปลี่ยนแปลงของตัว FMOC-

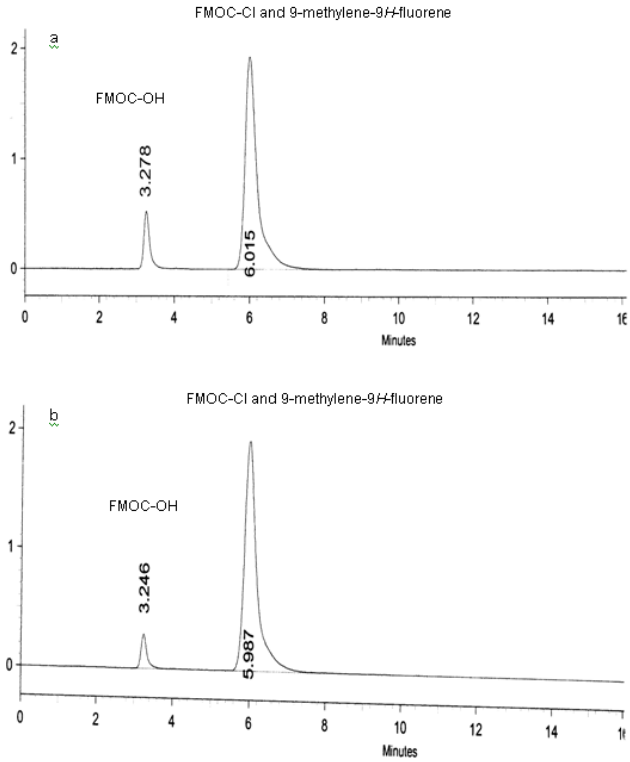


**Figure 2. Chromatogram of blank mixture (a) and reaction mixture (b) of CAM, FMOC-Cl and TEA with the molar ratio of 1:200:500. HPLC conditions: Column $C_{18}$ at room temperature with mobile phase of acetonitrile - 0.1% w/v sodium hexane sulfonate pH 3.8 (50:50 v/v) at 1 ml/min.**

Cl เอง

เนื่องจาก FMOC-Cl เป็นสารที่สามารถเกิดปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสได้ง่าย ดังนั้นในการศึกษาเริ่มต้นจึงได้ใช้สภาวะที่ปราศจากน้ำเป็นสภาวะในการทำปฏิกิริยา โดยใช้ TEA เป็นตัวเร่งปฏิกิริยา จากการศึกษาพบว่าที่สภาวะดังกล่าวไม่มีอนุพันธ์ CAM-FMOC เกิดขึ้น ซึ่งสาเหตุอาจเกิดจากการเสื่อมสลายของ FMOC-Cl ในสภาวะด่างโดยการเกิดปฏิกิริยา β-elimination ได้เป็น 9-methylene-9*H*-fluorene ซึ่งมีค่า retention time ใกล้เคียงกับ FMOC-Cl

เมื่อใช้ตัวกลางที่มีน้ำเป็นส่วนประกอบตามสภาวะการทดลองในข้อ 1.2 พบว่า FMOC-Cl เกิดการไฮโดรไลซิสได้อย่างรวดเร็ว โดยมีการลดลงของพีค FMOC-Cl และมีการเพิ่มขึ้นของพีคของ 9-fluorenemethanol (FMOC-OH) ซึ่งเป็นผลิตภัณฑ์ที่เกิดจากการไฮโดรไลซิสของ FMOC-Cl อย่างชัดเจน ทั้งใน reaction mixture และใน blank mixture ดังโครมาโทแกรมที่แสดงใน Figure 3a และ 3b อย่างไรก็ตามมีรายงานการเกิดอนุพันธ์ CAM-FMOC จากสภาวะการทดลองดังกล่าว (Torano *et al.*, 1998)

เมื่อพิจารณาถึงความคงตัวของอนุพันธ์ CAM-FMOC ที่เกิดขึ้นจากปฏิกิริยา สารนี้ไม่น่าจะคงตัวในสภาวะด่าง โดยจะเกิดการเปลี่ยนแปลงในทำนองเดียวกับการเปลี่ยนแปลงของ FMOC-Cl ในสภาวะด่าง ดังนั้นจึงไม่ได้ทำการศึกษาปฏิกิริยาในสภาวะด่างต่อ ในสภาวะกรดที่ pH 3.8 CAM-FMOC เกิดการไฮโดรไลซิสได้เป็น FMOC-OH, $CO_2$ และ CAM (Hermanson, 1996) ดังนั้นแม้จะเกิด CAM-FMOC ขึ้นในปฏิกิริยา แต่เนื่องจากสภาวะที่เป็นกรดค่อนข้างสูงของโมบายเฟส อาจทำให้ CAM-FMOC เกิดการเสื่อมสลายได้ จึงได้ทำการทดลองเปลี่ยน pH ของโมบาย

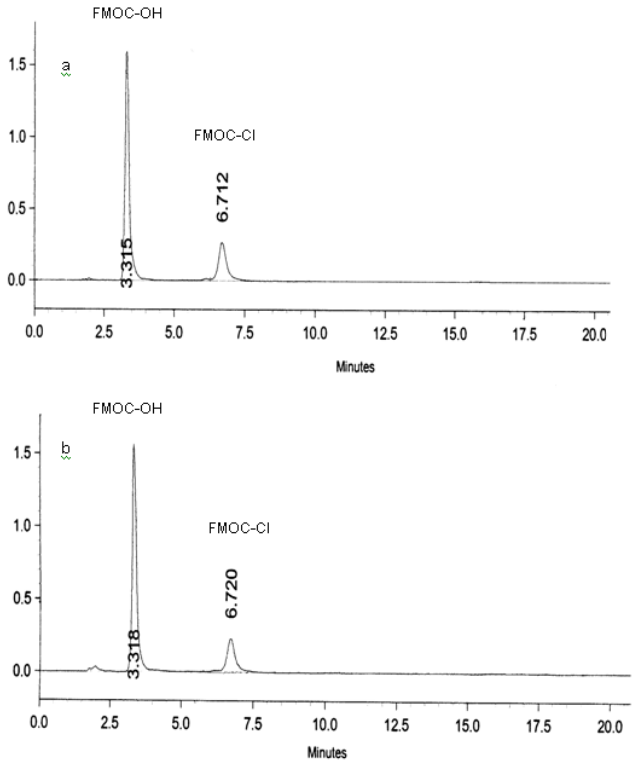


**Figure 3. Chromatogram of blank mixture (a) and reaction mixture (b) of CAM, FMOC-Cl and 0.1M $KH_2PO_4$ pH 7.5 with the molar ratio of 1:200:500. HPLC conditions: Column $C_{18}$ at room temperature with mobile phase of acetonitrile - 0.1% w/v sodium hexane sulfonate pH 3.8 (50:50 v/v) at 1 ml/min.**

เฟสเป็น pH 6.5 โดยใช้สภาวะในการทำปฏิกิริยาตามข้อ 1.2 พบว่าโครมาโทแกรมของ reaction mixture มีพีคที่เพิ่มขึ้นจากโครมาโทแกรมของ blank mixture ซึ่งน่าจะสัมพันธ์กับพีคของ CAM-FMOC ที่เกิดขึ้นในปฏิกิริยา ดังแสดงใน Figure 4a และ 4b นอกจากนี้ได้ทำการทดลองปรับสภาวะการทดลองของ HPLC เพื่อให้ได้สภาวะการทดลองที่ดีที่สุดเพื่อใช้ในการติดตามปฏิกิริยา พบว่าเมื่อใช้ระบบ ionic suppression reversed-phase HPLC โดยใช้โมบายเฟสเป็นสารผสมของ acetonitrile และ 0.05 M $KH_2PO_4$ ที่มี 0.1% v/v TEA pH 7.5 ในอัตราส่วน 60:40 ที่อัตราการไหล 2 มล./นาที และอุณหภูมิของคอลัมน์เป็น 50°C จะให้ลักษณะโครมาโทแกรมที่ดีที่สุดดังแสดงใน Figure 5 จึงใช้สภาวะการทดลองดังกล่าวในการติดตามปฏิกิริยาเพื่อศึกษาสภาวะที่ดีที่สุดในการทำปฏิกิริยาระหว่าง CAM และสารติดฉลากฟลูออเรสเซนซ์

1.3 ผลของ pH ต่อปฏิกิริยาระหว่าง CAM กับ FMOC-Cl

ทำการศึกษาผลของ pH ต่อการเกิดปฏิกิริยาระหว่าง CAM กับ FMOC-Cl โดยใช้สภาวะในการทำปฏิกิริยาตามข้อ 1.2 และใช้สารละลายบัฟเฟอร์ 0.1M $KH_2PO_4$ ที่ pH 6.5, 7.5 และ 8.5 ผลการทดลองแสดงใน Figure 6 พบว่าที่ pH 7.5 ปฏิกิริยาเกิดขึ้นได้ดีที่สุด โดยปฏิกิริยาเกิดขึ้นสมบูรณ์ภายในเวลาประมาณ 40 นาที

1.4 ผลของอัตราส่วน (โดยปริมาตร) ระหว่าง acetonitrile และ 0.1M $KH_2PO_4$ pH 7.5 ต่อปฏิกิริยาระหว่าง CAM กับ FMOC-Cl

ทำการศึกษาปฏิกิริยาระหว่าง CAM กับ FMOC-Cl เมื่อใช้อัตราส่วน (โดยปริมาตร) ระหว่าง aceto-

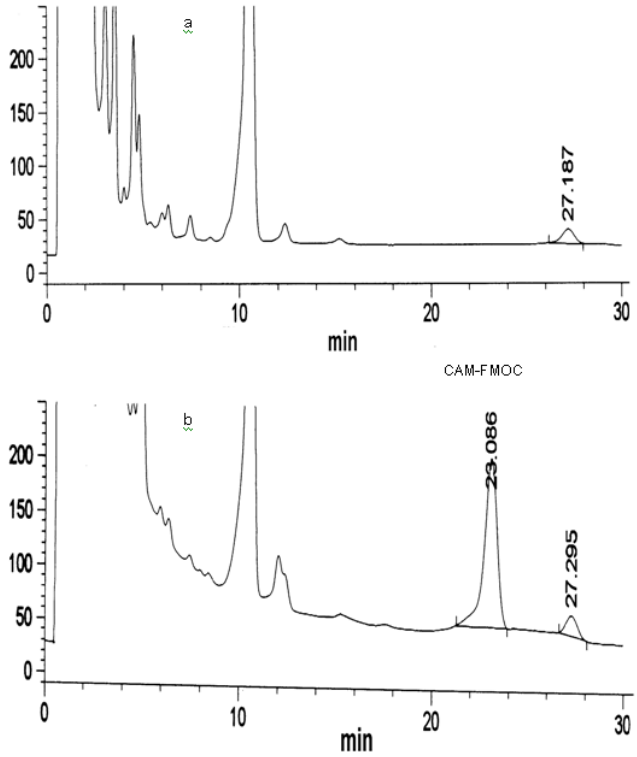


**Figure 4. Chromatogram of blank mixture (a) and reaction mixture (b) of CAM, FMOC-Cl and 0.1M $KH_2PO_4$ pH 7.5 with the molar ratio of 1:200:500. HPLC conditions: Column $C_{18}$ at room temperature with mobile phase of acetonitrile - 0.1% w/v sodium hexane sulfonate pH 6.5 (50:50 v/v) at 1 ml/min.**

nitrile และ 0.1M $KH_2PO_4$ pH 7.5 เป็น 4:1, 6:1, 8:1 และ 10:1 พบว่าการเกิดปฏิกิริยาระหว่าง CAM และ FMOC-Cl เมื่อใช้อัตราส่วนต่างๆ ดังกล่าว ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ แต่เนื่องจากที่อัตราส่วน 4:1 ให้ลักษณะโครมาโทแกรมที่ดีที่สุด โดยพีคที่ได้มีลักษณะแคบและสมมาตร ซึ่งจะทำให้การตรวจวัดปริมาณทำได้อย่างถูกต้องแม่นยำ อัตราส่วนนี้จึงถูกเลือกใช้ในการสร้างอนุพันธ์ CAM-FMOC

จากผลการศึกษาปัจจัยต่างๆ ต่อปฏิกิริยาระหว่าง CAM กับ FMOC-Cl พบว่าปฏิกิริยาเกิดได้ดีที่สุดในสารละลายผสมของ acetonitrile กับ 0.1M $KH_2PO_4$ pH 7.5 ในอัตราส่วน 4:1 โดยปริมาตร ที่อุณหภูมิ 40°C เป็นเวลา 40 นาที นอกจากนี้ FMOC-Cl ที่เหลือในปฏิกิริยาถูกกำจัดโดยการเติม glycine (Bahrami *et al.*, 2005) ซึ่งทำให้ได้โครมาโทแกรมที่สะอาดขึ้น และสัญญาณการตอบสนองสูงขึ้น โดย glycine สามารถทำปฏิกิริยากับ FMOC-Cl ได้อย่างรวดเร็วที่อุณหภูมิห้อง (ประมาณ 1 นาที)

**2. สภาวะที่เหมาะสมในการเกิดปฏิกิริยาระหว่าง CAM กับ NIC**

เนื่องจากสารจำพวก isocyanate มีความว่องไวในการเกิดไฮโดรไลซิสสูงมาก การทำปฏิกิริยาจึงไม่ควรใช้ตัวกลางที่มีน้ำเป็นส่วนประกอบ สภาวะในการทำปฏิกิริยาระหว่าง CAM กับ NIC ที่ทำการศึกษาได้แก่

2.1 สภาวะที่ไม่มี TEA เป็นตัวเร่งปฏิกิริยา

ทำปฏิกิริยาโดยใช้ acetonitrile เป็นตัวกลางในการทำปฏิกิริยา โดยใช้จำนวนสมมูลของ CAM : NIC ในอัตราส่วน 1:100 ที่อุณหภูมิ 30, 40, 50 และ 60°C

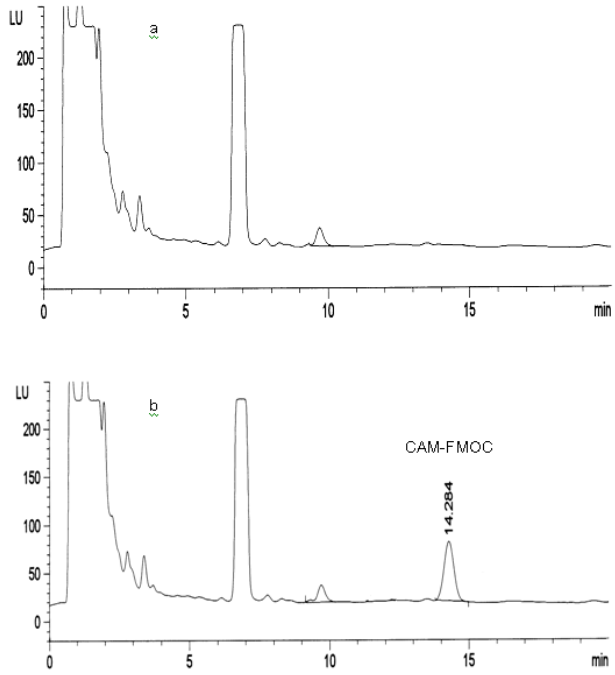


**Figure 5. Chromatogram of blank mixture (a) and reaction mixture (b) of CAM, FMOC-Cl and 0.1M $KH_2PO_4$ pH 7.5 with the molar ratio of 1:200:500. HPLC conditions: Column $C_{18}$ at 50°C with mobile phase of acetonitrile - 0.05 M $KH_2PO_4$ containing 0.1%v/v TEA pH 7.5 (60:40 v/v) at 2 ml/min and fluorescence detection with λex 275 nm and λem 318 nm.**

2.2 สภาวะที่มี TEA เป็นตัวเร่งปฏิกิริยา

ทำปฏิกิริยาโดยใช้ acetonitrile เป็นตัวกลางในการทำปฏิกิริยา ในสภาวะที่มี TEA โดยใช้จำนวนสมมูลของ CAM : NIC : TEA ในอัตราส่วน 1 : 100 : 20 ที่อุณหภูมิ 30, 40, และ 50°C

ลักษณะโครมาโทแกรมจากการติดตามปฏิกิริยาระหว่าง CAM กับ NIC โดยวิธี HPLC โดยตรวจวัดที่ λex 225 nm และ λem 362 nm แสดงใน Figure 7a และ 7b จะเห็นว่าโครมาโทแกรมของ reaction mixture มีพีคเพิ่มขึ้นจากโครมาโทแกรมของ blank mixture ที่เวลาประมาณ 5.4 นาที ซึ่งน่าจะสัมพันธ์กับพีคของอนุพันธ์ CAM-NIC ที่เกิดขึ้นจากปฏิกิริยา

การเกิดปฏิกิริยาที่อุณหภูมิต่าง ๆ ในสภาวะที่ไม่มี และมี TEA เป็นตัวเร่งปฏิกิริยา แสดงใน Figure 8 และ Figure 9 ตามลำดับ จะเห็นว่าในสภาวะที่ไม่มี TEA ปฏิกิริยาเกิดช้าและอัตราเร็วในการเกิดปฏิกิริยาเพิ่มขึ้นเมื่ออุณหภูมิสูงขึ้น อย่างไรก็ตามอนุพันธ์ CAM-NIC ที่ได้ไม่คงตัวที่อุณหภูมิสูง ซึ่งสังเกตได้จากการลดลงของค่าพื้นที่ใต้พีคของอนุพันธ์ CAM-NIC เมื่อทำปฏิกิริยาที่อุณหภูมิ 60°C ดังนั้นจึงไม่ควรใช้อุณหภูมิสูง ๆ ในการทำปฏิกิริยา ในสภาวะที่มี TEA ปฏิกิริยาดำเนินไปอย่างรวดเร็วและสมบูรณ์ โดยที่อุณหภูมิ 30°C ปฏิกิริยาเกิดขึ้นสมบูรณ์ภายใน 1 ชั่วโมง และอนุพันธ์ CAM-NIC มีความคงตัวดี จึงใช้สภาวะนี้ในการสร้างอนุพันธ์ CAM-NIC ในการศึกษาต่อมา

**3. ผลิตภัณฑ์ของปฏิกิริยาระหว่าง CAM กับ FMOC-Cl และกับ NIC**

จากลักษณะโครมาโทแกรมของ reaction mixture ของ CAM กับ FMOC-Cl และ CAM กับ NIC ที่แสดงใน Figure 5 และ Figure 7 ตามลำดับ จะเห็นว่ามีพีค

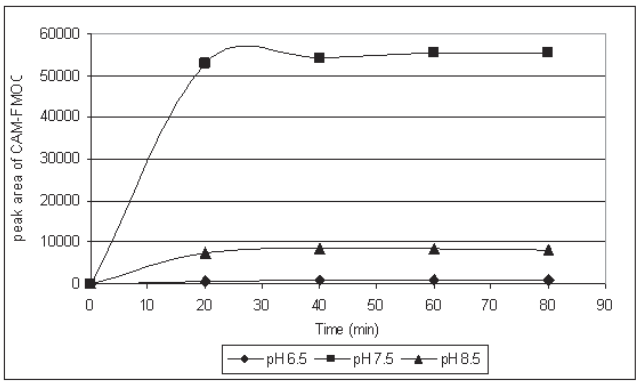


**Figure 6. Effect of pH on the reaction between CAM and FMOC-Cl (reaction medium: mixture of acetonitrile and 0.1M $KH_2PO_4$ buffer with varying pH at 40°C).**

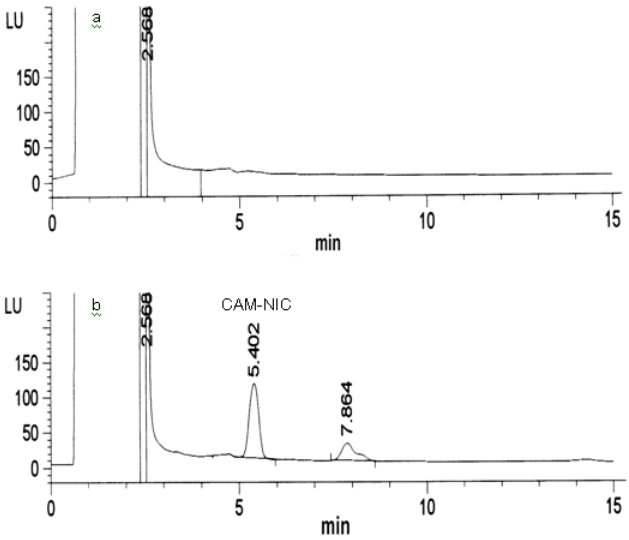


**Figure 7. Chromatogram of blank mixture (a) and reaction mixture (b) of CAM and NIC in acetonitrile. HPLC conditions: Column $C_{18}$ at 50°C with mobile phase of acetonitrile - 0.05 M $KH_2PO_4$ containing 0.1%v/v TEA pH 7.5 (60:40 v/v) at 2 ml/min and fluorescence detection with λex 225 nm and λem 362 nm.**

หลักของผลิตภัณฑ์เกิดขึ้นเพียงพีคเดียว แสดงว่าผลิตภัณฑ์ที่เกิดจากปฏิกิริยาจะมีเพียงผลิตภัณฑ์เดียว ไม่ใช่สารผสมของ *โมโน-*, *ได-* และ *ไตร-*เอสเทอร์ ที่เกิดจากการทำปฏิกิริยาของหมู่ไฮดรอกซิลทุติยภูมิ ที่มีอยู่ 3 หมู่ในโมเลกุลของ CAM นอกจากนี้จากรายงานการศึกษาความว่องไวของหมู่ไฮดรอกซิลในโมเลกุลของอิริโทรมัยซิน (Flynn *et al.*, 1954) ซึ่งเป็นยาต้นแบบของ CAM พบว่าหมู่ไฮดรอกซิลที่อยู่บนน้ำตาล desosamine เป็นหมู่ที่มีความว่องไวสูงสุด และปฏิกิริยาการเกิดเอสเทอร์จะเกิดที่ตำแหน่งนี้เกือบ 100% ดังนั้นผลิตภัณฑ์ที่เกิดจากปฏิกิริยาของ CAM กับ FMOC-Cl และกับ NIC จึงควรเป็นชนิด*โมโน*-เอสเทอร์ ซึ่งสัมพันธ์กับค่า retention time ของผลิตภัณฑ์ที่มีค่าไม่สูงนัก ซึ่งถ้าเป็น *ได*-เอสเทอร์ หรือ *ไตร*-เอสเทอร์ ที่มีความเป็นขั้วต่ำกว่า โมโน-เอสเทอร์ ค่า retention time ในระบบ

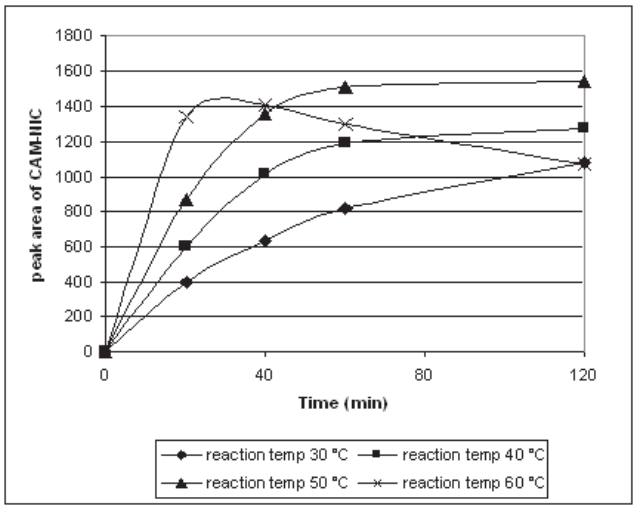


**Figure 8. Effect of temperature on the reaction of CAM with NIC. The reaction was performed in acetonitrile without TEA.**

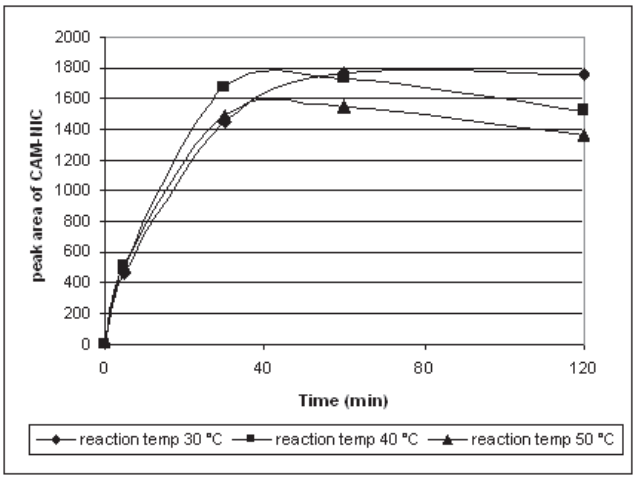


**Figure 9 Effect of temperature on the reaction of CAM with NIC. The reaction was performed in acetonitrile with TEA as catalyst.**

reversed-phase HPLC จะมีค่าสูงกว่านี้มาก (Snyder *et al.*, 1979)

**4. ความคงตัวของอนุพันธ์ CAM-FMOC และ CAM-NIC ที่อุณหภูมิห้อง**

จากการศึกษาโดยตั้ง reaction mixture หลังจากที่ได้ทำปฏิกิริยาเสร็จสิ้นแล้วไว้ที่อุณหภูมิห้อง และทำการตรวจติดตามการเปลี่ยนแปลงที่ระยะเวลาต่างๆ โดยวิธี HPLC เป็นเวลามากกว่า 10 ชั่วโมง พบว่าอนุพันธ์ CAM-FMOC มีเสถียรภาพที่อุณหภูมิห้องได้นานประมาณ 4 ชั่วโมง โดยมีปริมาณ CAM-FMOC เหลืออยู่ 96% ส่วนอนุพันธ์ CAM-NIC สามารถคงตัวที่อุณหภูมิห้องได้นานประมาณ 16 ชั่วโมง โดยมีปริมาณ CAM-NIC เหลืออยู่ 96%

**Table 1. Fluorescence intensity and coefficient of variation (CV) of the reaction of CAM with FMOC-Cl and CAM with NIC (n = 5)**

| CAM Concentration (μg/ml) | Fluorescence intensity (mean±SD, n= 5) | | CV (%) | |
|---|---|---|---|---|
| | CAM-FMOC (λex 275, λem 318) | CAM-NIC (λex 225, λem 362) | CAM-FMOC | CAM-NIC |
| 0.1 | 192.29±11.44 | 182.29±6.38 | 5.95 | 3.32 |
| 0.4 | 761.13±45.74 | 731.13±36.23 | 6.01 | 4.76 |
| 1.0 | 2029.73±78.14 | 2140.73±80.78 | 3.85 | 3.98 |
| 1.6 | 3254.70±113.91 | 3105.60±90.16 | 3.50 | 2.77 |
| 2.4 | 4891.22±102.23 | 4791.22±138.91 | 2.09 | 2.84 |

**5. Fluorescence intensity, reproducibility และ linearity ของปฏิกิริยาระหว่าง CAM กับ FMOC-Cl และ CAM กับ NIC**

จากการศึกษาการเกิดปฏิกิริยาของ CAM กับ FMOC-Cl และ CAM กับ NIC ในช่วงความเข้มข้น 0.1-2.4 ไมโครกรัม/มล. จำนวน 5 ความเข้มข้น โดยแต่ละความเข้มข้นทำการทดลองซ้ำ 5 ครั้ง ค่า reproducibility ซึ่งพิจารณาจากค่าสัมประสิทธ์ของความแปรปรวน (coefficient of variation, % CV) ของค่า fluorescence intensity พบว่ามีค่าอยู่ระหว่าง 2.09-6.01 และ 2.77-4.76 สำหรับปฏิกิริยาระหว่าง CAM กับ FMOC-Cl และ CAM กับ NIC ตามลำดับ ดังแสดงใน Table 1 และในช่วงความเข้มข้นดังกล่าวค่าพื้นที่ใต้พีคของอนุพันธ์ที่ได้มีความสัมพันธ์เป็นเส้นตรงกับความเข้มข้นของ CAM โดยมีค่าสัมประสิทธิ์การตัดสินใจ (coefficient of determination, $r^2$) เป็น 0.9991 และ 0.9981 สำหรับปฏิกิริยาระหว่าง CAM กับ FMOC-Cl และ CAM กับ NIC ตามลำดับ โดยที่อนุพันธ์ CAM-FMOC และ CAM-NIC มีความสามารถในการฟลูออเรสซ์ใกล้เคียงกัน

## สรุปผลการทดลอง

การสร้างอนุพันธ์ที่ฟลูออเรสซ์ได้ของ CAM โดยการทำปฏิกิริยากับ NIC สามารถเกิดได้ง่ายกว่าการทำปฏิกิริยากับ FMOC-Cl โดยการเกิดปฏิกิริยากับ NIC ต้องทำในตัวกลางที่ปราศจากน้ำ โดยมี TEA เป็นตัวเร่งปฏิกิริยา ปฏิกิริยาสามารถเกิดได้อย่างรวดเร็ว และสมบูรณ์ที่อุณหภูมิห้อง ส่วนการเกิดปฏิกิริยากับ FMOC-Cl ต้องทำที่อุณหภูมิ 40°C ในตัวกลางที่เป็นสารผสมของ acetonitrile และ 0.1M $KH_2PO_4$ pH 7.5 ในอัตราส่วน 4:1 (โดยปริมาตร) แม้ว่าทั้ง NIC และ FMOC-Cl สามารถเกิดปฏิกิริยากับ CAM ได้อย่างคงที่ แม่นยำ (reproducible) ให้อนุพันธ์ที่มีความสามารถในการฟลูออเรสซ์ใกล้เคียงกัน และการเกิดปฏิกิริยามีความสัมพันธ์เป็นเส้นตรงกับปริมาณ CAM แต่อนุพันธ์ CAM-NIC มีความคงตัวที่อุณหภูมิห้องนานกว่าอนุพันธ์ CAM-FMOC ดังนั้นปฏิกิริยาในการสร้างอนุพันธ์ CAM-NIC จึงมีความเหมาะสมในการนำไปใช้ในการวิเคราะห์ปริมาณ CAM มากกว่าอนุพันธ์ CAM-FMOC โดยเฉพาะในการศึกษาที่ต้องวิเคราะห์ตัวอย่างเป็นจำนวนมาก ๆ เช่น ในการศึกษาทางเภสัชจลนศาสตร์ และการศึกษาชีวสมมูลของยา นอกจากนี้ยังสามารถประยุกต์ปฏิกิริยาดังกล่าวในการวิเคราะห์ปริมาณยาในกลุ่มแมคโครไลด์ตัวอื่นได้อีกด้วย

## References

Bahrami, G., Mirzaeei, S., and Kiani, A. 2005. High performance liquid chromatographic determination of azithromycin in serum using fluorescence detection and it's application in human pharmacokinetic study, J. Chromatogr. B, 820 : 277-281.

Chu, S.Y., Sennello, L.T. and Sonders, R.C. 1991. Simultaneous determination of clarithromycin and 14(*R*)-hydroxyclarithromycin in plasma and urine using high-performance liquid chromatography with electrochemical detection, J.

Chromatogr. B, 571 : 199-208.

Choi, S.J., Kim, S.B., Lee, H.Y., Na, D.H., Yoon, Y.S., Lee, S.S., Kim, J.H., Lee, K.C. and Lee, H.Y. 2001. Column-switching high performance liquid chromatographic determination of clarithromycin in human plasma with electrochemical detection, Talanta, 54 : 377-382.

Erah, P.O., Barrett, D.A. and Shaw, P.N. 1996. Ion-pair high-performance liquid chromatographic assay method for the assessment of clarithromycin stability in aqueous solution and in gastric juice, J. Chromatogr. B, 682 : 73-78.

Flynn, E.H., Sigal, M.V., Wiley, P.F. and Gerzon, K. 1954. Erythromycin I. Properties and degradation studies, J. Am. Chem. Soc., 76 : 3121-3131.

Gerald K. McEvoy *et al.* (eds). 2002. AHFS Drug Information 2002, American Society of Health System Pharmacists, MD, USA, 305-318.

Gorski, R.J., Morgan, D.K., Sarocka, C. and Plasz, A.C. 1991. Estimation and identification of non-polar compounds in clarithromycin bulk drug by high-performance liquid chromatography, J. Chromatogr., 540 : 422-429.

Hedenmo, M. and Eriksson, B.M. 1995. Liquid chromatographic determination of the macrolide antibiotics roxithromycin and clarithromycin in plasma by automated solid-phase extraction and electrochemical detection, J. Chromatogr. A, 692 : 161-166.

Hermanson, G.T. 1996. Bioconjugate Techniques, Academic Press Inc., New York.

Kees, F., Spangler, S. and Wellenhofer, M. 1998. Determination of macrolides in biological matrices by high-performance liquid chromatography with electrochemical detection, J. Chromatogr. A, 812 : 287-293.

Lerner, F.E., Caliendo, G., Santagada, V., Santana, G.S.M., Moraes, M.E.A. and De Nucci, G. 2000. Clarithromycin bioequivalence study of two oral formulations in healthy human volunteers, Int. J. Clin. Pharmacol. Ther., 38 : 345-354.

Markham, A. and McTavish, D. 1996. Clarithromycin and omeprazole as helicobater pylori eradication therapy in patients with H. pylori-assisted gastric disorders, Drugs, 51 : 161-178.

Merck Index, 1996. The Merck and Co., Inc. Rahway New Jersey.

Morgan, D., Cugier, P., Marello, B., Sarocka, C., Stroz, D. and Plasz, A. 1990. Impurity profiling of clarithromycin using high-performance liquid chromatography with ultraviolet detection, J. Chromatogr., 502 : 351-358.

Morgan, D.K., Brown, D.M., Rotsch, T.D. and Plasz, A.C. 1991. A reversed-phase high-performance liquid chromatographic method for the determination and identification of clarithromycin as the drug substance and in various dosage forms, J. Pharm. Biomed. Anal., 9 : 261-267.

Niopas, I. and Daftsios, A.C. 2001. Determination of clarithromycin in human plasma by HPLC with electrochemical detection: validation and application in pharmacokinetic study, Biomed. Chromatogr., 15 : 507-508.

Pappa-Louisi, A., Papageorgiou, A., Zitron, A., Sotiropoulos, S., Georgarakis, E. and Zougrou, F. 2001. Study on the electrochemical detection of the macrolide antibiotics clarithromycin and roxithromycin in reversed-phase high-performance liquid chromatography, J. Chromatogr. B, 755 : 57-64.

Rooyen, G.F., Smit, M.J., Jager, A.D., Hundt, H.K.L., Swart, K.J. and Hundt, A.F. 2002. Sensitive liquid chromatography-tandem mass spectrometry method for the determination of clarithromycin in human plasma, J. Chromatogr. B, 768 : 223-229.

Snyder, L.R. and Kirkland, J.J. 1979. Introduction to Modern Liquid Chromatography, John Wiley & Sons, Inc., New York.

Taninaka, C., Ohtani, H., Hanada, E., Kotaki, H., Sato, H. and Iga, T. 2000. Determination of erythromycin, clarithromycin, roxithromycin, and azithromycin in plasma by high-performance liquid chromatography with amperometric detection, J. Chromatogr. B, 738 : 405-411.

Torano, J. S. and Guchelaar, H.J. 1998, Quantitative determination of the macrolide antibiotics erythromycin, roxithromycin, azithromycin and clarithromycin in human serum by high-performance liquid chromatography using pre-

column derivatization with 9-fluorenylmethyl-oxycarbonyl chloride and fluorescence detection, J. Chromatogr. B, 720 : 89-97.

Wibawa, J.I.D., Shaw, P.N. and Barrett, D.A. 2003. Quantification of clarithromycin, its 14-hydroxy and decladinose metabolites in rat plasma, gastric juice and gastric tissue using high-performance liquid chromatography with electrochemical detection, J. Chromatogr. B, 783 : 359-366.