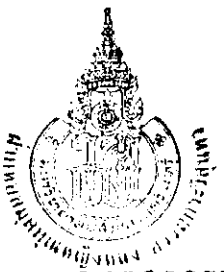
RM 03654



สงขลานครินทร์

รายงานการวิจัยฉบับสมบูรณ์

เรื่อง

การพัฒนาวิธีวิเคราะห์และการศึกษาเภสัชจลนศาสตร์ของมิทรากัยนีนในหนูขาว

โดย

ผศ.ดร.เบญจมาศ จันทร์ฉวี [1] (หัวหน้าโครงการ)

ผศ.ดร.นิวัติ แก้วประดับ [2]

ผศ.สมสมร ชิตตระการ [1]

ผศ.สุภาภรณ์ ประเศรษโฐ [1]

ดร.ภูชงค์ วรรัตนานุรักษ์ [3]

ผศ.ดร.กิจจา สว่างเจริญ [1]

[1] ภาควิชาเภสัชวิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

[2] ภาควิชาเภสัชเวทและเภสัชพฤกษศาสตร์ คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

[3] ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

โครงการนี้ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจากงบประมาณแผ่นดิน ประจำปี 2548-2549

รหัสโครงการ SCI 49117

พฤศจิกายน 2549

เลขหมู่.....

Bib Key.....

...../...../.....

รายงานการวิจัยฉบับสมบูรณ์

การพัฒนาวิธีวิเคราะห์และการศึกษาเภสัชจลนศาสตร์ของมิทรากัยนีนในหนูขาว

ผศ.ดร.เบญจมาศ จันทร์ฉวี และคณะ

พฤศจิกายน 2549

คำนำ

รายงานวิจัยฉบับนี้นำเสนอผลการวิจัยจากโครงการวิจัยเรื่อง ' การพัฒนาวิธีวิเคราะห์และการศึกษาเภสัชจลนศาสตร์ของมิทรากัยนีนในหนูขาว (Analytical method development and pharmacokinetic study of mitragynine in rats) ' ซึ่งเป็น 1 ใน 7 โครงการวิจัยในแผนงานวิจัยเรื่อง ' การศึกษาทางเภสัชวิทยาและพิษวิทยาของใบกระท่อม (The study of pharmacology and toxicology of *Mitragyna speciosa* Korth. leaves) ' ซึ่งได้รับทุนอุดหนุนวิจัยจากงบประมาณแผ่นดิน และมีระยะเวลาดำเนินการตั้งแต่ปี 2548-2551

รายงานนำเสนอเป็นภาษาอังกฤษในรูปแบบของต้นฉบับตีพิมพ์ (manuscript) ซึ่งได้รับการตอบรับตีพิมพ์จากวารสารชื่อ Biomedical Chromatography โดยใช้ชื่อเรื่อง ' A high performance liquid chromatographic method for determination of mitragynine in serum and its application to a pharmacokinetic study in rats. '

คณะผู้วิจัยหวังว่าผลการวิจัยเรื่องนี้คงจะเป็นประโยชน์ต่อผู้ที่สนใจ และเมื่อรวมกับผลจากการวิจัยของโครงการอื่นๆในแผนงานที่จะออกมาภายหลังจะทำให้ผู้ที่สนใจได้รับทราบข้อมูลเกี่ยวกับเภสัชวิทยาของพืชกระท่อมมากยิ่งขึ้น

เบญจมาศ จันทร์ฉวี และคณะ

กิตติกรรมประกาศ

โครงการวิจัยเรื่อง การพัฒนาวิธีวิเคราะห์และการศึกษาเภสัชจลนศาสตร์ของมิทรากัยนีนในหนูขาว สำเร็จลุล่วงได้ด้วยการสนับสนุนเงินทุนจากงบประมาณแผ่นดิน ปี 2548-2549

คณะผู้วิจัยขอขอบคุณ ดร.เอกสิทธิ์ กุมารสิทธิ์ ภาควิชาสรีรวิทยา คณะวิทยาศาสตร์ ที่มีส่วนช่วยในขั้นตอนการเตรียมสารมิทรากัยนีนจากใบกระท่อม

ขอขอบคุณนักวิจัยประจำโครงการ นางสาวปฤษณา เรืองรัตน์ ที่ได้ช่วยเหลือทางด้านเทคนิคตลอดการวิจัย

ขอขอบคุณบุคลากรทุกท่านจากศูนย์เครื่องมือวิทยาศาสตร์ ที่ให้การบริการเป็นอย่างดี โดยเฉพาะอย่างยิ่ง คุณวราภรณ์ รัศมีผะกาย นักวิจัยที่ให้ความช่วยเหลือและให้คำแนะนำเป็นอย่างดีในด้านการวิเคราะห์ด้วยเทคนิค LC-MS

ขอขอบคุณบุคลากรทุกท่านจากสถานสัตว์ทดลองภาคใต้ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ ที่ให้บริการเกี่ยวกับการจัดหาและเบิกจ่ายสัตว์ทดลองเพื่อใช้ในงานวิจัย

ขอขอบคุณ Dr.Brian Hodgson คณะวิทยาศาสตร์ ที่สละเวลาช่วยตรวจทานการใช้ภาษาอังกฤษในการเขียนต้นฉบับเพื่อตีพิมพ์

ท้ายนี้คณะผู้วิจัยขอขอบคุณภาควิชาเภสัชวิทยา คณะวิทยาศาสตร์ ที่ได้สนับสนุนและอนุญาตให้ใช้สถานที่และวัสดุครุภัณฑ์ที่จำเป็นในการทำวิจัย

เบญจมาศ จันทร์ฉวี และคณะ

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อ	
อังกฤษ	2
ไทย	3
บทนำและวัตถุประสงค์	4
วิธีทดลอง	5
ผลการทดลองและวิจารณ์	12
สรุป	18
บรรณานุกรม	18
ภาคผนวก	
ประวัติผู้วิจัย	32

TITLE PAGE

Full title

A high performance liquid chromatographic method for determination of mitragynine in serum and its application to a pharmacokinetic study in rats

Short title

HPLC method for determination of mitragynine

Benjamas Janchawee[1]*, Niwat Keawpradub[2], Somsmorn Chittrakarn[1], Supaporn Prasettho[1], Puchong Wararatananurak[3] and Kitja Sawangjareon[1]

[1] Department of Pharmacology, Faculty of Science, Prince of Songkla University, Songkhla 90112, Thailand

[2] Department of Pharmacognosy and Pharmaceutical Botany, Faculty of Pharmaceutical Sciences, Prince of Songkla University, Songkhla 90112, Thailand

[3] Department of Chemistry, Faculty of Science, Prince of Songkla University, Songkhla 90112, Thailand

*Correspondence to: B. Janchawee, Department of Pharmacology, Faculty of Science, Prince of Songkla University, Songkhla 90112, Thailand

Tel/Fax.: +66-74-446-678

E-mail: benjamas.j@psu.ac.th

Abstract

A simple HPLC technique for determining mitragynine levels in serum was developed. The separation system consisted of a C_{18} column heated to 35°C, a methanol-water (80:20, v/v) mobile phase, a flow rate of 0.8 mL/min and detection in the ultraviolet at 225 nm. Mitragynine with a retention time of 10.09 min, was well resolved from any interferences in human serum and the internal standard peak. The calibration curve was linear from 0.1 to 10 μg/mL (r = 0.9995). Extraction of mitragynine from alkalinized serum using diethyl ether gave a high recovery (≥85%). The intra- and inter-day precisions of the method were 4.29-5.88%RSD and 7.06-8.45%RSD, respectively. The accuracy ranged from –9.54 to +0.67%DEV. The limit of detection was 0.03 μg/mL and the lower limit of quantification was 0.1 μg/mL. Mitragynine in the stock solution was stable during 30 days of storage at 4°C. This method was successfully applied to determine the pharmacokinetic characteristics of mitragynine levels in the serum of rats after it was administered orally.

KEYWORDS: Mitragynine; *Mitragyna speciosa*; HPLC; Serum

บทคัดย่อ

เทคนิค HPLC อย่างง่ายได้ถูกพัฒนาเพื่อใช้ในการวัดระดับมิทรากัยนีนในซีรัม ระบบการแยกประกอบด้วยคอลัมน์ C_{18} ที่ถูกปรับอุณหภูมิให้คงที่ที่ 35 องศาเซลเซียส สารผสมระหว่างเมทานอลและน้ำในอัตราส่วน 80:20 โดยปริมาตร เป็นตัวเคลื่อนที่โดยมีอัตราการไหล 0.8 มิลลิลิตร/นาที ตรวจจับสารด้วยการดูดกลืนแสงเหนือม่วงที่ความยาวคลื่น 225 นาโนเมตร มิทรากัยนีนถูกแยกออกจากสารอื่นในซีรัมได้ดี โดยมีเวลาอยู่ในคอลัมน์นาน 10.09 นาที กราฟมาตรฐานมีความเป็นเส้นตรงในช่วงความเข้มข้น 0.1 ถึง 10 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร (ค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ r = 0.9995) มิทรากัยนีนในซีรัมถูกสกัดด้วยไดเอทิลอีเทอร์ได้ดีโดยสกัดออกมาได้มากกว่า 85% ค่าความแม่นยำของการวิเคราะห์ภายในวันเดียวกันและระหว่างวันเท่ากับ 4.29-5.88%RSD และ 7.06-8.45%RSD ตามลำดับ ค่าความถูกต้องอยู่ระหว่าง -9.54 ถึง +0.67%DEV ความเข้มข้นต่ำสุดที่ตรวจจับได้เท่ากับ 0.03 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร และความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถหาปริมาณได้เท่ากับ 0.1 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร มิทรากัยนีนในสารละลายเข้มข้นมีความเสถียรในช่วง 30 วันของการเก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เทคนิคนี้สามารถนำไปใช้เพื่อหาเภสัชจลนศาสตร์ของมิทรากัยนีนในหนูขาวที่ได้รับมิทรากัยนีนครั้งเดียวทางปากได้

คำสำคัญ: มิทรากัยนีน เภสัชจลนศาสตร์ กระท่อม

INTRODUCTION

Mitragynine (Fig. 1) is an indole alkaloid extracted from *Mitragyna speciosa* Korth. (Rubiaceae). This plant is indigenous to Thailand and other southeast countries and its Thai name is 'kratom' (Shellard, 1974; Ponglux *et al.*, 1994). In the past, the leaves of *M. speciosa* were used as an opium substitute by Thai and Malay natives or opium addicts, when opium itself was unavailable (Suwanlert, 1975; Jansen and Prast, 1988). In southern Thailand, the leaves have been widely used by villagers as a traditional medicine for common illnesses such as coughing, diarrhea, muscle pain, and hypertension. *M. speciosa* leaves are used extensively by farmers, rubber tree gardeners, and laborers to decrease the feeling of tiredness, increase tolerance to the heat while working in the sun, and increase their work efficiency.

The chemistry and pharmacology of mitragynine have been investigated continuously since the early twentieth century. In the 1920s, Hooper and Field reported the isolation of this compound from the leaves of *M. speciosa* (Tantivatana, 1976; Jansen and Prast, 1988). In the 1960s, the isolation of more than 22 alkaloids from *M. speciosa* leaves was described (Jansen and Prast, 1988; Takayama, 2004). Studies of the syntheses of mitragynine and its derivatives have also been carried out (Zarembo *et al.*, 1974; Takayama *et al.*, 1995). As it is the main alkaloid constituent of the leaf, the pharmacological effects of mitragynine have been extensively investigated in animals. The findings show that mitragynine has analgesic activity by acting on the opioid system (Matsumoto *et al.*, 1996a; Matsumoto *et al.*, 1996b; Tohda *et al.*, 1997; Thongpradichote *et al.*, 1998). Other activities including inhibition of the contraction of the ileum (Watanabe *et al.*, 1997) and vas deferens (Matsumoto *et al.*, 2005) and

inhibition of gastric acid secretion (Tsuchiya *et al.*, 2002) are also documented.

Since mitragynine possesses pharmacological activities, detection and determination methods for this compound in biological systems is required to facilitate further studies of its pharmacology. To date there is no established method to analyze mitragynine, especially in biological samples such as serum. Therefore, the aim of this work was to develop a simple high performance liquid chromatographic (HPLC) method for determination of mitragynine in serum using its known ultraviolet (UV) absorptive properties (Zarembo *et al.*, 1974), for its detection. In addition, to then apply this technique to characterize the pharmacokinetics of mitragynine administered to rats.

EXPERIMENTAL

Chemicals

Anhydrous di-sodium hydrogen orthophosphate was purchased from Fisher Scientific UK Limited (Leics, UK). Anhydrous sodium hydroxide was supplied by Carlo Erba Reagenti (Milan, Italy). Diethyl ether (AnalaR® BDH; purity 99.5%) was obtained from VWR International Ltd. (Poole, UK). Acenaphthene (purity 99%), an internal standard for HPLC, was supplied by Fluka Chemie GmBH (Buchs, Switzerland). Methanol (HPLC grade; J.T. Baker) was purchased from Mallinckrodt Baker, Inc. (Phillipsburg, NJ, USA). Propylene glycol puriss (Riedel de Haen®) was purchased from Sigma-Aldrich Laborchemikalien GmbH (Seelze, Germany).

Isolation of mitragynine

The leaves of *M. speciosa* were collected from natural sources in Songkhla and

Satun provinces, Thailand, during 2004-2005. Authentication of the plant material was carried out at the Department of Pharmacognosy and Pharmaceutical Botany, Faculty of Pharmaceutical Sciences, Prince of Songkla University, Thailand, where the herbarium voucher specimens (No. PCOG/MS001-002) have been kept. Extraction and isolation of the alkaloid were carried out as previously described by Houghton *et al.* (1991) and Ponglux *et al.* (1994) with some modifications.

In brief, the leaves were dried at 45-50°C, powdered and macerated with methanol (repeated 3 times). The methanol filtrates were combined and evaporated under reduced pressure. The crude methanol extract was dissolved in 10% acetic acid solution, well shaken and left to stand overnight. The acidic filtrate was washed with petroleum ether, then brought to pH 9 with 25% ammonia solution and extracted with chloroform. The chloroform extract was washed with distilled water, dried over anhydrous sodium sulfate and evaporated to yield a dry crude alkaloid extract (with an approximately 0.25% yield based on the fresh leaf weight). An aliquot (2.5 g) of alkaloid extract was subjected to silica gel column chromatography, eluted with 5% methanol in chloroform to obtain a major alkaloid (1.27 g), which appeared as a single spot on TLC analysis (4 solvent systems) and was found to be a pure compound upon spectroscopic analysis by MS (Thermofinnigan MAT 95 XL mass spectrometer: EIMS with direct insert probe), and ^{1}H-NMR and ^{13}C-NMR (Varian Unity Inova 500 NMR spectrometer) spectra. When the obtained spectral data was compared with the published assignments (Shellard *et al.*, 1978; Houghton *et al.*, 1991), it was identified as mitragynine.

The spectral data of mitragynine obtained from the present work are as follows:

EI-MS *m/z* (relative intensity, %): 398 (M^+, 41; $C_{23}H_{30}N_2O_4$), 397 (28), 214 (16), 208 (17), 178 (100), 147 (97.2), 132 (35.8). ^{1}H-NMR (500 MHz, $CDCl_3$): δ 7.73 (1H, br-s, NH), 7.43 (1H, s, H-17), 6.99 (1H, t, J = 8.0 Hz, H-11), 6.90 (1H, d, J = 8.0 Hz, H-12), 6.45 (1H, d, J = 8.0 Hz, H-10), 3.87 (3H, s, 9-OCH_3), 3.73 (3H, s, 17-OCH_3), 3.71 (3H, s, $COOCH_3$), 3.15 (1H, br-dd, J = 11.0, 2.0 Hz, H-3), 3.11 (1H, td, J = 12.0, 2.7 Hz), 3.03 (1H, dt, J = 12.0, 3.6 Hz), 2.99-2.93 (3H, m), 2.53 (2H, m), 2.45 (1H, dd, J = 11.0, 2.9 Hz), 1.79 (2H, m), 1.62 (1H, m), 1.20 (1H, m), 0.87 (3H, t, J = 7.3 Hz, 18-CH_3). ^{13}C- NMR (125 MHz, $CDCl_3$): δ 169.3 ($\underline{C}OOCH_3$), 160.5 (C-17), 154.5 (C-9), 137.2 (C-13), 133.7 (C-2), 121.8 (C-11), 117.6 (C-8), 111.5 (C-16), 107.8 (C-7), 104.2 (C-12), 99.7 (C-10), 61.5 (17-OCH_3), 61.3 (C-3), 57.7 (C-21), 55.3 (9-OCH_3), 53.8 (C-5), 51.4 ($COO\underline{C}H_3$), 40.7 (C-20), 39.9 (C-15), 29.9 (C-14), 23.9 (C-6), 19.1 (C-19), 12.9 (C-18).

Mitragynine obtained by this procedure was approximately 98% pure based on the average intensity ratio between the carbon signals of mitragynine and those of trace impurity observed at the baseline of the ^{13}C-NMR spectrum, and was used as the standard compound for development of the analytical method.

Chromatographic instruments and conditions

The HPLC system consisted of a Waters 2695 Separations Module and a Waters 2487 Dual λ Absorbance detector (Milford, MA, USA). Data were collected and processed using the Empower™ Software System.

The analytical method was optimized using a reversed-phase SunFire™ C_{18} column (250 x 4.6 mm i.d., 5 μm particle size) connected to a Sentry™ guard column (20 x 4.6 mm i.d., 5 μm particle size) from Waters (Milford, MA, USA). The

temperature of the column oven was set at 35 ± 1°C while that of the autosampler vials was at ambient temperature (25 ± 1°C). The mobile phase was a freshly prepared methanol-water mixture (80:20, v/v), filtered separately before mixing through a 0.22-μm nylon membrane filter and degassed ultrasonically for 20 min before use. The flow rate was 0.8 mL/min. A sample volume of 20 μL was injected and mitragynine was detected in the eluent at a wavelength of 225 nm.

Confirmation of mitragynine by LC-MS

A standard solution of mitragynine in methanol at a concentration of 25 μg/mL was prepared and run under the chromatographic condition described above. The presence of mitragynine in the fractions giving a high reading at 225 nm was confirmed by liquid chromatographic mass spectrometry (LC-MS) at the Scientific Equipment Center, Prince of Songkla University. The instrument was a Waters 2690 liquid chromatograph (Milford, MA, USA) coupled with a mass spectrometer LCT™ (Micromass, Manchester, UK) operating in the electrospray ionization positive mode. Mitragynine was simultaneously detected with a Waters 996 photodiode array detector (Milford, MA, USA) at wavelengths ranging from 200-250 nm.

Preparation of standard solutions

Stock solutions of 1 mg/mL of mitragynine and the internal standard acenapthene were prepared by dissolving standard compounds in 100% methanol. The stock solution was further diluted with the same solvent for preparation of working standard solutions with concentrations of 0.5-50 μg mitragynine /mL and 2 μg

acenapthene /mL. Calibration standards and quality control (QC) samples were prepared by adding an aliquot (20 μL) containing known amounts of standard mitragynine from the appropriate working solutions. An aliquot of 20 μL of the working solution of acenapthene (2 μg/mL or 40 ng) was also added to each sample. Sample volumes were made to 100 μL with blank serum to obtain the final concentrations of 0.1, 0.2, 0.5, 1, 2.5, 5 and 10 μg mitragynine /mL and 0.4 μg acenapthene /mL.

Sample extraction

Serum (100 μL), containing known amounts of mitragynine was placed in a 12 x 75 mm glass tube (Pyrex) and combined with 20 μL of acenapthene (2 μg/mL). The sample was treated by adding 50 μL of 0.5 M aqueous Na_2HPO_4, which was pre-adjusted to pH 11 with 25% aqueous NaOH, and then mixed by vortex for 30 sec. One mL of diethyl ether was added and the mixture was mixed thoroughly by vortex for 1 min before centrifugation at 2000 x g at 25°C for 15 min. The upper organic phase was transferred to a clean glass tube and evaporated to dryness under a stream of nitrogen at room temperature. This residue was reconstituted with 100 μL of methanol for HPLC analysis.

Method validation

Validation of the analytical method was performed in accordance with the ICH Harmonised Tripartite Guideline Topic Q2B (ICH Steering Committee, 1996). Human serum donated from the Blood Bank of Songklanagarin Hospital, Prince of Songkla

University, was used throughout the validation process.

Linearity was evaluated by preparing six standard concentrations of mitragynine in serum samples (0.1, 0.5, 1, 2.5, 5 and 10 μg/mL; 5 replicates each). The calibration curve was constructed by plotting the ratio of the peak height of mitragynine to that of the internal standard (y) versus the concentrations of mitragynine (x). Regression analysis was performed to obtain the calibration equation and correlation coefficient (r).

The precision of the method was evaluated using 3 QC samples of standard mitragynine in serum (0.2, 1, and 2.5 μg/mL). Intra-day precision was determined by assaying 5 samples of each concentration during the same day under the same experimental condition. Inter-day precision was determined by daily assay of the samples for 5 consecutive days. The relative standard deviation (RSD) was calculated according to the formula: RSD (%) = (standard deviation/mean value) x 100. The level of acceptance for precision is 15%RSD value.

The QC samples were also used to determine the accuracy of the assay with 5 replicates for each concentration. The deviation (DEV) was expressed using the formula: DEV (%) = [(measured concentration - nominal concentration)/nominal concentration] x 100. Accuracy is acceptable when the DEV is within ±15%.

The recovery of mitragynine by extraction from serum samples was determined by comparing responses obtained after extracting mitragynine from serum with those obtained after the direct injection of standard mitragynine prepared in methanol. The percentage recovery was calculated using the expression: Recovery (%) = (response after extraction/response after direct injection) x 100.

The limit of detection (LOD) and the lower limit of quantification (LLOQ) were

determined based on the signal-to-noise ratio method. Signals from serum samples with known low concentrations of mitragynine (0.05, 0.1, 0.2 and 0.4 μg/mL, 3 replicates each) were compared with those from blank serum samples. The concentration values resulting in a signal-to-noise ratio of 3:1 and 10:1 were considered to be the LOD and LLOQ, respectively.

The long-term stability of a stock solution of mitragynine (1 mg/mL) refrigerated at 4°C was tested. At different storage periods, the stock was diluted to 1 μg/mL with pure methanol (3 replicates) prior to analysis and the accuracy was determined. Two lots of the stock solution were checked.

Pharmacokinetic study in rats

Six male Wistar rats (body weight 220-290 g) were obtained from the Southern Laboratory Animal Facility, Prince of Songkla University. The experimental protocol was approved by the Ethics Committee for experimental animals, Prince of Songkla University. The rats were fasted overnight but with free access to water before receiving a single dose of 40 mg mitragynine /kg body weight by oral gavage. The formulation for the oral administration was prepared by dissolving mitragynine powder at the requiring dose with a minimum volume of 100% propylene glycol providing a clear solution. After gavage, about 0.3 mL of propylene glycol was fed to flush any mitragynine remaining in the syringe. Blood samples (300 μl) were collected by puncture of the retro-orbital sinus under ether anesthesia at 0, 0.5, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 8, 10 and 15 h after administration. Serum was separated by centrifugation at 2000 x g for 15 min and kept at –70°C until analysis.

Pharmacokinetics of mitragynine was analysed based on the non-compartmental method (Gibaldi and Perrier, 1982) with aid of the software WinNonlin^{TM} version 4.1 (Pharsight Corporation, Mountain View, CA, USA). The maximum serum concentration (C_{max}) and the time to maximum concentration (T_{max}) were directly read from the concentration-time curve of each individual rat. The area under the concentration-time curve from the time of dosing to the last quantifiable time point ($AUC_{0\rightarrow t}$) and the area under the first moment curve from the time of dosing to the last quantifiable time point ($AUMC_{0\rightarrow t}$) were calculated by using the linear trapezoidal rule. The area under the curve from the time of dosing extrapolated to infinity ($AUC_{0\rightarrow\infty}$) and the area under the first moment curve from the time of dosing extrapolated to infinity ($AUMC_{0\rightarrow\infty}$) were calculated from the following formulas: $AUC_{0\rightarrow\infty} = AUC_{0\rightarrow t} + C_{last}/\lambda_z$; $AUMC_{0\rightarrow\infty} = AUMC_{0\rightarrow t} + [(T_{last} \times C_{last})/ \lambda_z] + (C_{last}/\lambda_z^2)$, where C_{last} represents the last concentration corresponding to T_{last} which is the time of the last measurable concentration and λ_z represents the elimination rate constant calculated from the formula: λ_z = -(slope of the terminal phase of log concentration-time curve)/2.303. The mean residence time extrapolated to infinity ($MRT_{0\rightarrow\infty}$) was calculated as $MRT_{0\rightarrow\infty} = AUMC_{0\rightarrow\infty}/AUC_{0\rightarrow\infty}$. The absorption rate constant (k_a) was obtained by using the method of residuals (Gibaldi and Perrier, 1982). The half-lives of absorption ($t_{1/2\ ab}$) and elimination ($t_{1/2\ \lambda z}$) were derived from the formulas: $t_{1/2\ ab} = 0.693/k_{ab}$; $t_{1/2\ \lambda z} = 0.693/\lambda_z$. The total body clearance (Cl/F) and the volume of distribution (V_d/F) were calculated from the formulas: $Cl/F = Dose/AUC_{0\rightarrow\infty}$; $V_d/F = Dose/(\lambda_z \times AUC_{0\rightarrow\infty})$.

Statistical analysis

Descriptive statistical data were calculated using Microsoft® Excel 2000 (Microsoft Corporation, USA) and expressed as the arithmetic mean, standard deviation (SD) and relative standard deviation (RSD). Harmonic means were calculated for the half-lives of elimination and absorption.

RESULTS AND DISCUSSION

Optimization of chromatographic and sample preparation methods

Separation of mitragynine was dependant on the condition of the reversed-phase liquid chromatography method used in this study. Since mitragynine is insoluble in water but freely soluble in an alcohol like methanol, the composition of methanol and water in the mobile phase determines its selectivity and sensitivity of separation. At a high percentage of methanol in the mobile phase (>80%, v/v), mitragynine was eluted quickly with a high detection response but the peak overlapped with interfering peaks. In contrast, at a low percentage of methanol (<80%, v/v), i.e., the higher the composition of water in the system, the less soluble was mitragynine. Due to its hydrophobicity, mitragynine was retained in the column longer and although well separated from the polar interferences it eluted with a poor detection response and resulted in a broad peak. The final choice of solvent was an 80:20 v/v methanol:water mixture. In addition to the mobile phase composition, separation of mitragynine was also influenced by variations in the room temperature that caused an imprecise retention time. To overcome this problem, the column temperature was set at a constant of 35°C, and this also resulted in better resolution. For the analytical column, the shorter column

(150 mm x 3.9 mm i.d., 5 μm; Xterra™ MS C_{18}; Waters, Milford, MA, USA) had been tried initially. This resulted in a shorter run time (within 10 min) but poor resolution. The longer column used produced better resolution and was therefore chosen.

Several methods for sample preparation were tried. Precipitation of protein from serum with methanol and acetonitrile prior to a direct injection of supernatant resulted in poor resolution. Sample cleanup by solid phase extraction using a C_{18} classic cartridge and ethyl acetate elution reduced interferences but produced low recovery. Sample alkalinization followed by liquid-liquid extraction using organic solvents with different polarities such as diethyl ether, methylene chloride, chloroform and ethyl acetate, revealed that extraction with diethyl ether gave the best recovery of mitragynine from serum. Additionally, diethyl ether extraction resulted in fewer interfering peaks during HPLC separation compared with other organic solvents. Due to this being a simple and most·effective method, extraction of serum samples with diethyl ether was therefore chosen.

Confirmation of Mitragynine by LC-MS

When optimum conditions for the HPLC system were achieved, the separation of standard mitragynine was confirmed using LC-MS (Fig. 2). The peak of the analyte was observed at 8.38 min with the photodiode array detection (Fig. 2A) and at 8.56 min with the mass spectrometer (Fig. 2B). The protonated molecule at such a retention time had a mass m/z of 399.1 which was identified as mitragynine (Fig. 2C).

Chromatographic profiles

Chromatograms for separating mitragynine from human serum under the developed HPLC method are shown in Fig. 3. Some additional peaks were seen in the blank serum (Fig. 3A). The peaks for mitragynine and the internal standard acenapthene obtained with spiked serum samples were well separated from these additional peaks (Fig. 3B & 3C). With human serum samples spiked with mitragynine and acenapthene, retention times of 10.09 and 15.98 min, were obtained (Fig. 3C). A serum sample spiked with mitragynine at the LLOQ concentration and acenapthene is shown in Fig. 3D. The elution time for each sample was approximately 30 min.

Mitragynine and the internal standard were also spiked into rat serum samples and their chromatograms are presented in Fig. 4. Rat serum samples also produced some additional peaks just as had the human serum samples (Fig. 4A). Mitragynine and the internal standard were also well separated with retention times of 9.54 and 15.21 min, respectively (Fig. 4B & 4C). When an oral dose of 40 mg mitragynine /kg of body weight was administered to a rat and a serum sample at 0.5 h post-dose was assayed, this method was shown to be effective for identifying and quantifying mitragynine in serum (Fig. 4D).

Method validation

Regression analysis showed linearity of the calibration curves for mitragynine over the concentration range of 0.1-10 μg/mL. The regression equation was $y = 0.986 \pm 0.024x + 0.021 \pm 0.032$ ($n = 5$) with a good correlation coefficient ($r = 0.9995 \pm 0.0005$), where y is the peak height ratio and x is the mitragynine concentration in

μg/mL.

Three QC samples at 0.2, 1 and 2.5 μg/mL were used for validation because this range should be sufficient for determining mitragynine in the serum of rats administered a low dose of mitragynine without any significant adverse effects. The precision for determining serum mitragynine is presented in Table 1. The values of %RSD were found to be between 4.29 and 5.88% for intra-day precision and between 7.06 and 8.45% for inter-day precision. Both parameters are within the level of acceptance.

The accuracy of the method is the closeness of the agreement between the true concentration value and the value found. As shown in Table 2, the %DEV for determination of serum mitragynine at the concentrations of 0.2-2.5 μg/mL ranged from -9.54 to +0.67% which is acceptable.

The recovery i.e. the percentage of mitragynine added to the sample that was recovered after extraction and separation by HPLC. Extraction of serum mitragynine added at concentrations of 0.2, 1, and 2.5 μg/mL with diethyl ether resulted in a high percentage recovery of 84.73, 86.2 and 93.96% respectively (Table 3).

The limit of detection, the lowest concentration of mitragynine in serum that can be detected but not necessarily quantified as an exact value, was 0.03 μg/mL (RSD = 6.9%, n = 3). The lower limit of quantification was 0.1 μg/mL (RSD =13.4%, n = 3).

The long-term stability of the stock solution of mitragynine expressed as the %DEV of a 1 μg/mL standard solution measured after different storage periods is presented in Table 4. No change of %DEV exceeded ±15%, indicating that the stock solution of mitragynine kept at 4°C was stable during at least 30 days of storage.

Pharmacokinetic study

The developed HPLC method with UV detection was applied to determine the concentrations of mitragynine in the serum of rats receiving a single oral dose of 40 mg of mitragynine/kg body weight. Due to lack of data about the toxic dose, or LD_{50}, of mitragynine in rats, the first trial dose of 200 mg mitragynine /kg, that had been shown previously to produce antinociceptive activity in mice (Idid *et al.*, 1998), was used but this caused death to a rat in our study. The much lower dose, that was sufficient for detection and assay in the serum with no observable adverse effects, was therefore chosen for the pharmacokinetic study.

Mitragynine existed in serum at measurable concentrations from 0.5 up to 15 h post dose (Fig. 5). Blood samples at 24 h post dose were also collected but the levels of mitragynine detected were below the LLOQ.

Pharmacokinetic parameters of mitragynine derived from the non-compartmental method are presented in Table 5. After an oral administration, mitragynine was rapidly absorbed. The maximum serum concentration (C_{max}) of 0.63 ± 0.18 μg/mL was achieved at 1.83 ± 1.25 h (T_{max}) with the absorption rate constant (k_a) of 1.43 ± 0.90 h^{-1}. Mitragynine had a high volume of distribution (V_d/F, 89.50 ± 30.30 L/kg). This may be due to its distribution to highly-perfused and lipid-contained tissues especially the brain which is its site of action. It was slowly eliminated with an elimination rate constant (λ_z) of 0.07 ± 0.01 h^{-1} and a clearance (Cl/F) of 1.60 ± 0.58 L/h. The half-lives of absorption ($t_{1/2\ ab}$) and elimination ($t_{1/2\ \lambda z}$) were 0.48 ± 0.36 and 9.43 ± 1.74 h, respectively. The mean residence time ($MRT_{0\rightarrow\infty}$) was 14.00 ± 2.84 h.

These results indicate that this analytical method could be used for

characterizing the pharmacokinetics of mitragynine in rats and it may also be applicable to other *in vivo* models.

CONCLUSION

A reversed-phase high performance liquid chromatographic method with UV detection for determination of mitragynine extracted from leaves of *M. speciosa* was developed. The chromatographic technique was uncomplicated. Sample preparation required a simple procedure of liquid-liquid extraction resulting in a sufficiently high recovery of the analyte. This method was simple, sensitive, precise and accurate for serum sample analysis. Although mitragynine could be analyzed using a more sensitive technique such as LC-MS (as shown in this report), most laboratories are not equipped with such high cost instruments and this developed method could be adopted with ease and low expense. This method was successfully applied to determine the mitragynine levels in the serum of rats after an oral administration and to characterize the pharmacokinetics of this compound in this animal model.

Acknowledgements

This work was financially supported by the Thai Government Budget for the year 2005-2006 (project code SCI 49117). The authors thank Dr. Ekkasit Kumarnsit, Department of Physiology, Faculty of Science, Prince of Songkla University, for his assistance during the isolation steps of mitragynine.

REFERENCES

Gibaldi M and Perrier D. Pharmacokinetics, 2 ed. Marcel Dekker: New York, 1982.

Houghton PJ, Latiff A and Said IM. Alkaloids from *Mitragyna speciosa*. *Phytochemistry* 1991; 30: 347-350.

ICH Steering Committee. *ICH Harmonised Tripartite Guideline, Validation of Analytical Procedures: Methodology Q2B*, 1996; 1-8.

Jansen KLR and Prast CJ. Ethnopharmacology of kratom and the Mitragyna alkaloids. *Journal of Ethnopharmacology* 1988; 23: 115-119.

Matsumoto K, Mizowaki M, Suchitra T, Murakami Y, Takayama H, Sakai S, Aimi N and Watanabe H. Central antinociceptive effects of mitragynine in mice: contribution of descending noradrenergic and serotonergic systems. *European Journal of Pharmacology* 1996a; 317: 75-81.

Matsumoto K, Mizowaki M, Thongpradichote S, Takayama H, Sakai S, Aimi N and Watanabe H. Antinociceptive action of mitragynine in mice: evidence for the involvement of supraspinal opioid receptors. *Life Sciences* 1996b; 59: 1149-1155.

Matsumoto K, Yamamoto LT, Watanabe K, Yano S, Shan J, Pang PKT, Ponglux D, Takayama H and Horie S. Inhibitory effect of mitragynine, an analgesic alkaloid from Thai herbal medicine, on neurogenic contraction of the vas deferens. *Life Sciences* 2005; 78: 187-194.

Ponglux D, Wongseripipatana S, Takayama H, Kikuchi M, Kurihara M, Kitajima M, Aimi N and Sakai S. A new indole alkaloid, 7 α-hydroxy-7*H*-mitragynine, from *Mitragyna speciosa* in Thailand. *Planta Medica* 1994; 60: 580-581.

Shellard EJ, Houghton PJ and Resha M. The *Mitragyna* species of Asia Part XXXI. The alkaloids of *Mitragyna speciosa* Korth from Thailand. *Planta Medica* 1978;

Central Library
Prince of Songkla University

34: 26-36.

Shellard EJ. The alkaloids of Mitragyna with special reference to those of Mitragyna speciosa, Korth. *Bulletin on Narcotics* 1974; 26: 41-55.

Suwanlert S. A study of kratom eaters in Thailand. *Bulletin on Narcotics* 1975; 27: 21-27.

Takayama H, Maeda M, Ohbayashi S, Kitajima M, Sakai S, Aimi N. The first total synthesis of (-)-mitragynine, an analgesic indole alkaloid in *Mitragyna speciosa*. *Tetrahedron Letters* 1995; 36: 9337-9340.

Takayama H. Chemistry and pharmacology of analgesic indole alkaloids from the Rubiaceous plant, *Mitragyna speciosa*. *Chemical & Pharmaceutical Bulletin* 2004; 52: 916-928.

Tantivatana P. *Kratom Mitragyna speciosa*. Institute of Health Research, Chulalongkorn University: Bangkok, 1976; 1-12.

Thongpradichote S, Matsumoto K, Takayama H, Aimi N, Sakai S and Watanabe H. Identification of opioid receptor subtypes in antinociceptive actions of supraspinally-administered mitragynine in mice. *Life Sciences* 1998; 62: 1371-1378.

Tohda M, Thongpradichote S, Matsumoto K, Murakami Y, Sakai S, Aimi N, Takayama H, Tongroach P and Watanabe H. Effects of mitragynine on cAMP formation mediated by delta-opiate receptors in NG108-15 cells. *Biological & Pharmaceutical Bulletin* 1997; 20: 338-340.

Tsuchiya S, Miyashita S, Yamamoto M, Horie S, Sakai S, Aimi N, Takayama H and Watanabe K. Effect of mitragynine, derived from Thai folk medicine, on gastric

acid secretion through opioid receptor in anesthetized rats. *European Journal of Pharmacology* 2002; 443: 185-188.

Watanabe K, Yano S, Horie S and Yamamoto LT. Inhibitory effect of mitragynine, an alkaloid with analgesic effect from Thai medicinal plant *Mitragyna speciosa*, on electrically stimulated contraction of isolated guinea-pig ileum through the opioid receptor. *Life Sciences* 1997; 60: 933-942.

Zarembo JE, Douglas B, Valenta J and Weisbach JA. Metabolites of mitragynine. *Journal of Pharmaceutical Sciences* 1974; 63: 1407-1414.

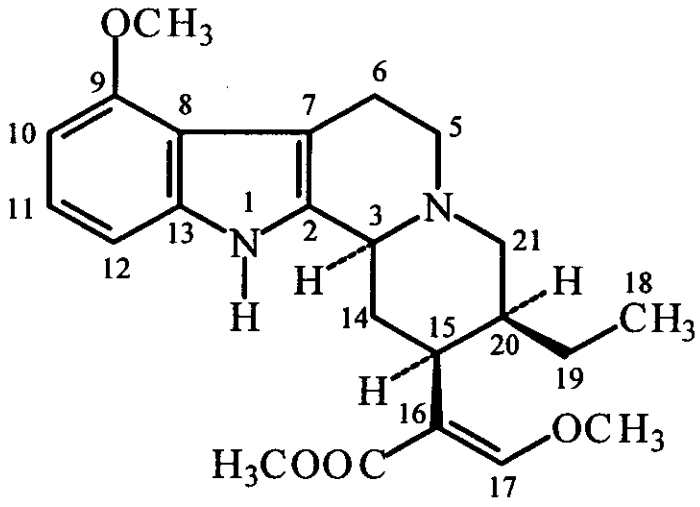


Figure 1. Chemical structure of mitragynine (calculated for $C_{23}H_{30}N_2O_4$; m/z 398.2207).

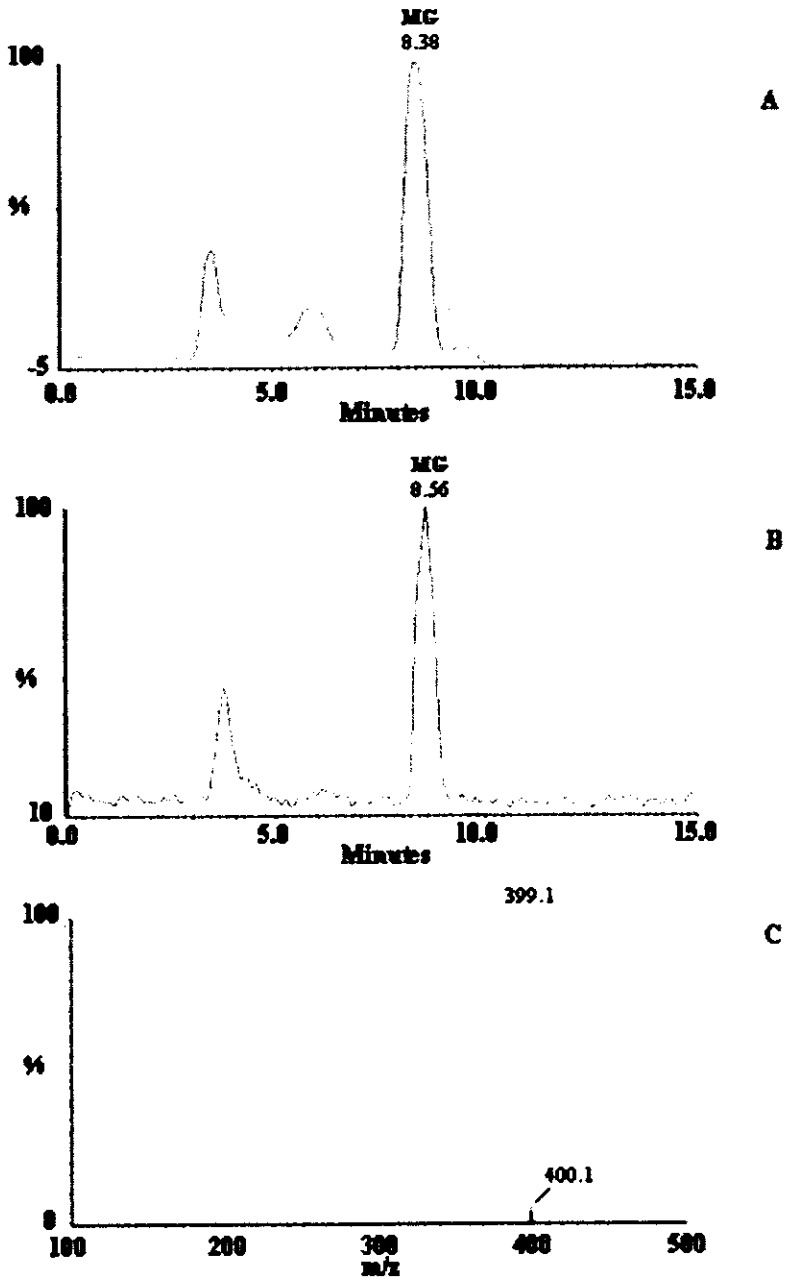


Figure 2. Confirmation results of standard mitragynine (MG) in methanol using LC-MS; A, HPLC chromatogram with photodiode array detection; B, total ion chromatogram; C, MS spectrum. LC condition; column: SunFireTM C18 (5 μm), 250 x 4.6 mm; column temp.: 35°C; mobile phase: methanol-water (80:20, v/v); flow: 0.8 ml/min; injection: 5 μl; diode array detection (200-250 nm). MS condition; ESI positive mode; capillary: 3000V; RF lens: 275V; sample cone: 30V; source temp.: 100°C; extraction cone: 5V; desolvation temp.: 120°C; cone gas flow: 20 l/hr; desolvation gas flow: 318 l/hr; mass range: 100-500 m/z.

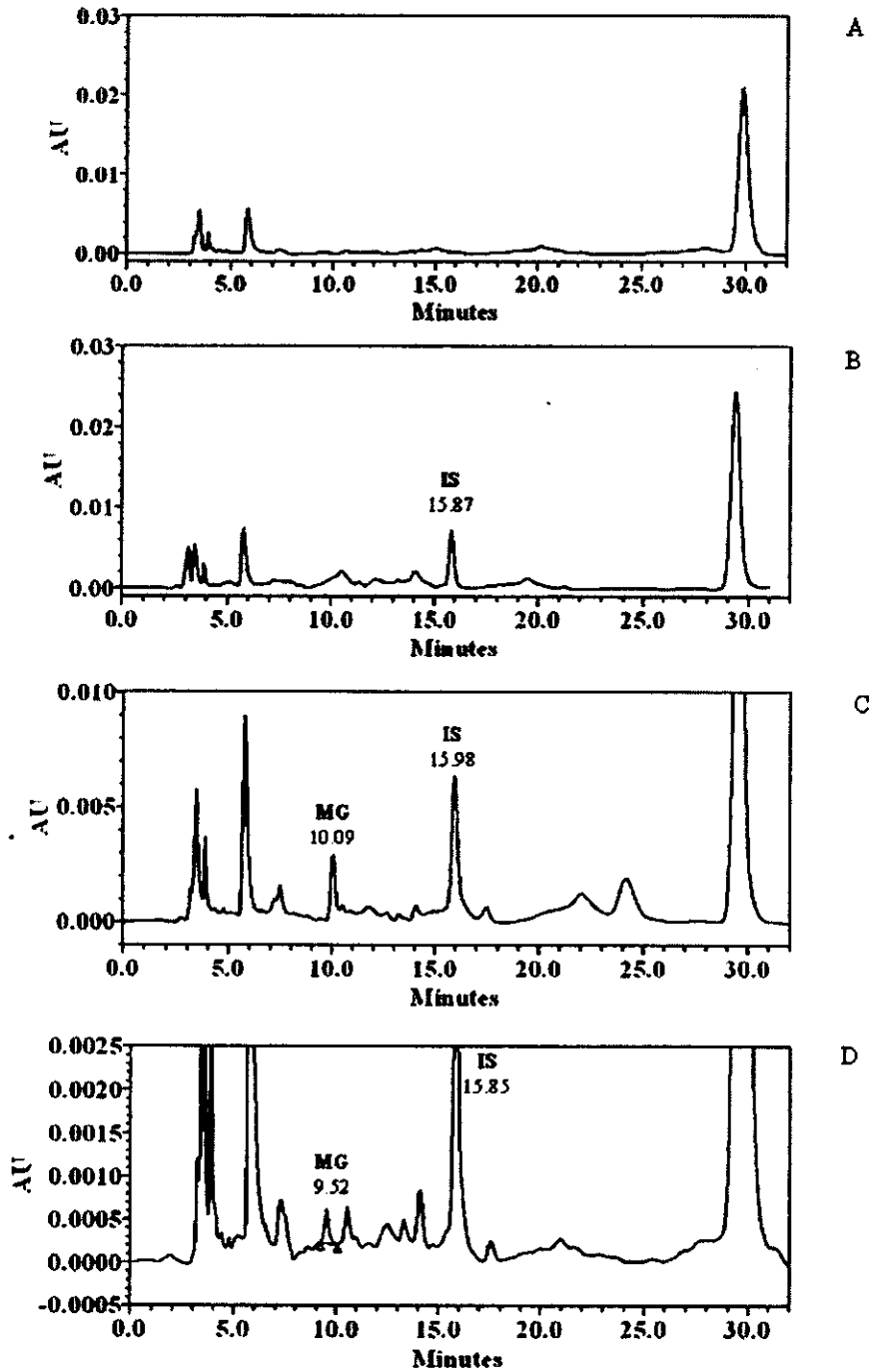


Figure 3. Representative chromatograms for mitragynine (MG) in human serum; A, blank serum; B, internal standard (IS) blank serum; C, serum spiked with MG (1 μg/ml) and IS (0.4 μg/ml); D, serum spiked with mitragynine at LLOQ and IS (0.4 μg/ml).

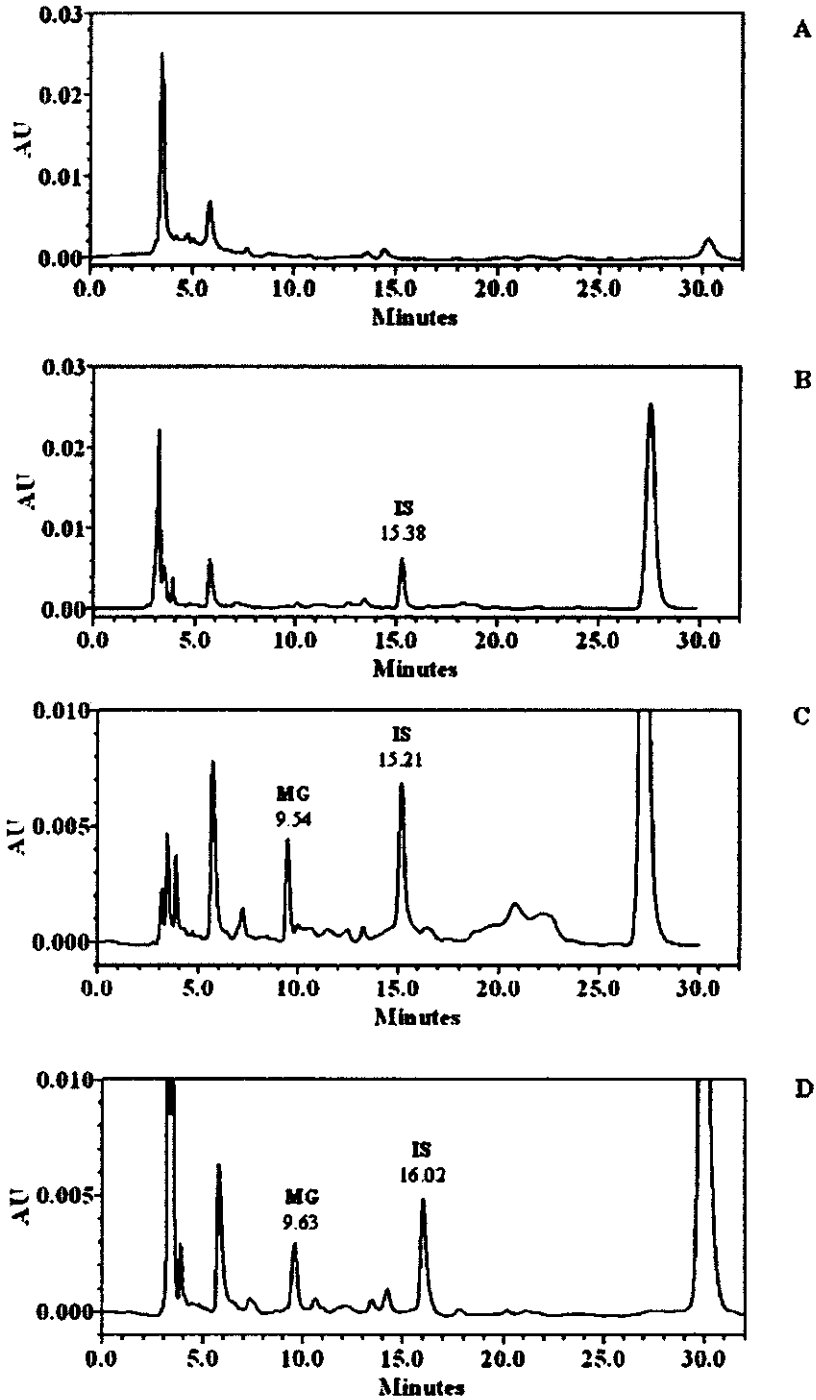


Figure 4. Representative chromatograms for mitragynine (MG) in rat serum; A, blank serum; B, internal standard (IS) blank serum; C, serum spiked with MG (1 μg/ml) and IS (0.4 μg/ml); D, serum sample collected at 0.5 h after an oral dose of 40 mg/kg of mitragynine; the measured concentration was 0.54 μg/ml.

Table 1. Precision of the method for the determination of mitragynine in serum (n = 5)

Concentration of mitragynine (μg/ml)	Intra-day		Inter-day	
	Mean ratio [a]	RSD (%)	Mean ratio [a]	RSD (%)
0.2	0.144	4.29	0.162	7.13
1	0.690	5.88	0.715	7.06
2.5	1.517	5.63	1.529	8.45

[a] Ratio of peak height of mitragynine to that of the internal standard

Table 2. Accuracy of the method for the determination of mitragynine in serum (n = 5)

Nominal concentration (μg/ml)	Measured concentration [a] (μg/ml)	DEV (%)
0.2	0.20 ± 0.01	+0.67
1	0.91 ± 0.07	-9.54
2.5	2.49 ± 0.29	-0.51

[a] Mean ± SD

Table 3. Extraction recovery for the determination of mitragynine in serum (n = 5)

Concentration of mitragynine (μg/ml)	Mean peak height ratio		Recovery [a] (%)
	Direct injection	After extraction	
0.2	0.07	0.06	84.73 ± 5.73
1	0.30	0.26	86.21 ± 8.06
2.5	0.72	0.68	93.96 ± 3.19

[a] Mean ± SD

Table 4. Stability of the stock solution of mitragynine stored at 4°C

Stock lot number	Day			
	0	7	15	30
1	-2.30	-1.40	-3.57	-3.79
2	-0.25	1.06	-7.08	3.68

Data expressed as mean of %DEV (n = 3)

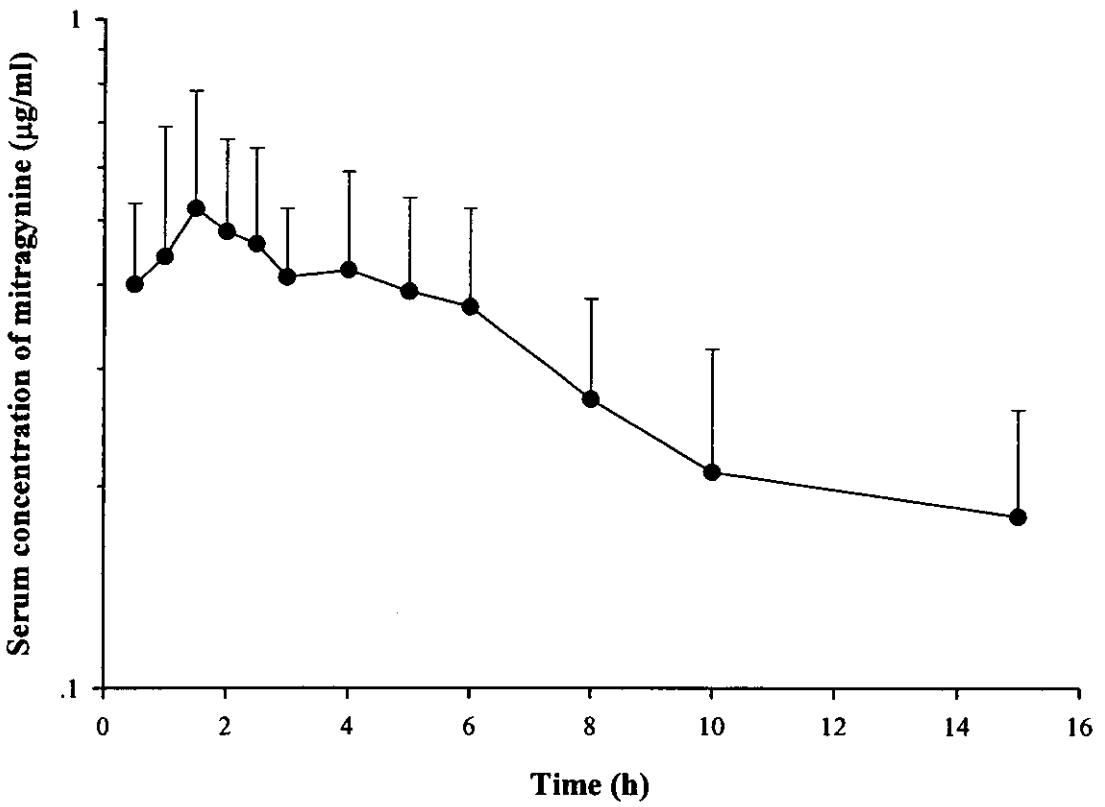


Figure 5. Semi-logarithmic plot of mean serum concentrations of mitragynine and standard deviation error bars in rats (n = 6) receiving a single oral dose of 40 mg mitragynine /kg of body weight.

Table 5. Pharmacokinetic parameters derived from a non-compartmental analysis of mitragynine in six rats receiving a single oral dose of 40 mg mitragynine /kg of body weight

Parameters	Units	Mean ± SD
C_{max}	μg/ml	0.63 ± 0.18
T_{max}	h	1.83 ± 1.25
k_{ab}	h^{-1}	1.43 ± 0.90
$t_{1/2\ ab}$	h	0.48[a] ± 0.36
V_d/F	L/kg	89.50 ± 30.30
λ_z	h^{-1}	0.07 ± 0.01
$t_{1/2\ \lambda z}$	h	9.43[a] ± 1.74
Cl/F	L/h	1.60 ± 0.58
$AUC_{0\rightarrow\infty}$	μg.h/ml	6.99 ± 2.93
$AUMC_{0\rightarrow\infty}$	$\mu g.h^2/ml$	102.23 ± 55.98
$MRT_{0\rightarrow\infty}$	h	14.00 ± 2.84

[a] Harmonic mean value

ภาคผนวก

ประวัติคณะผู้วิจัย

ผศ.ดร.เบญจมาศ จันทร์ฉวี (หัวหน้าโครงการ)

ผศ.ดร.นิวัติ แก้วประดับ

ผศ.สมสมร ชิตตระการ

ผศ.สุภาภรณ์ ประเศรษโฐ

ดร.ภุชงค์ วรรัตนานุรักษ์

ผศ.ดร.กิจจา สว่างเจริญ

ชื่อ-สกุล (ภาษาไทย) นางสาว เบญจมาศ จันทร์ฉวี **(หัวหน้าโครงการ)**

(ภาษาอังกฤษ) Miss Benjamas Janchawee

เลขหมายประจำตัวประชาชน 3-4099-00655-92-4

ตำแหน่งปัจจุบัน ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ระดับ 8

หน่วยงานและที่อยู่ ภาควิชาเภสัชวิทยา คณะวิทยาศาสตร์ ม.สงขลานครินทร์ อ.หาดใหญ่ จ.สงขลา 90112

โทรศัพท์ 074-28 8171-2 โทรศัพท์/โทรสาร 0 7444 6678

Email : benjamas.j@psu.ac.th

ประวัติการศึกษา

ชื่อปริญญา	สถาบันที่จบการศึกษา	ปีที่จบการศึกษา
วท.บ. (เคมี)	มหาวิทยาลัยขอนแก่น	2529
วท.ม. (เภสัชวิทยา)	มหาวิทยาลัยมหิดล	2532
Ph.D. (Pharmacoepidemiology)	University of Wales Cardiff	2540

สาขาวิชาการที่มีความชำนาญพิเศษ เภสัชจลนศาสตร์ เภสัชระบาดวิทยา

ประสบการณ์ที่เกี่ยวข้องกับการบริหารงานวิจัย

หัวหน้าโครงการวิจัย : การพัฒนาระบบฐานข้อมูลเพื่อการตรวจหาและป้องกันการกระทำระหว่างกันของยาในโรงพยาบาลสงขลานครินทร์

งานวิจัยที่ทำเสร็จแล้ว :

- Ridtitid, W., Wongnawa, M., Janchawee, B. Chittrakarn, S. Sunbhanich, M. and Mahatthanatrakul, W.(1997). Single dose pharmacokinetic comparative studies between intramuscular acetaminophen formulation with and without lidocaine in healthy volunteers. *Thai Journal of Pharmacology*. 19(1): 7-14.
- Al-Sheriff, A., Janchawee, B., Buss, D.C., Hutchings, A.D. and Routledge, P.A. (1998). Effects of single dose activated charcoal and cholestyramine on amiodarone in rabbits. *Human and Experimental Toxicology*, 17: 469.
- Thomas, H.F., Sweetnam, P.M. and **Janchawee, B.** (1998). What sort of men take garlic preparations? *Complementary Therapies in Medicine*, 6: 195-197.
- Thomas, H.F., Sweetnam, P.M., **Janchawee, B.** and Luscombe, D.K. (1999). Polypharmacy among older men in South Wales. *European Journal of Clinical Pharmacology*, 55: 411-415.
- **Janchawee, B.**, Wongpoowarak, W., Amnuaypanit, C., Wamae, M., Ovartlarnporn, T. and Chongsuvivatwong, V. (2003). Development and trial of the drug interaction database system. *Songklanakarin Journal of Science and Technology*, 25(4): 525-534.
- **Janchawee, B.**, Wongpoowarak, W., Ovartlarnporn, T. and Chongsuvivatwong, V. (2005). Pharmacoepidemiologic study of potential drug interactions in outpatients of a university

hospital in Thailand. Journal of Clinical Pharmacy and Therapeutics. 30, 13-20.

- Janchawee, B., Owatranpon, T., Mahatthanatrakul, W. and Chongsuvivatwong, V. (2005). Clinical drug interactions in outpatients of a university hospital in Thailand. Journal of Clinical Pharmacy and Therapeutics. 30, 583-590.

ชื่อ-สกุล (ภาษาไทย) นายนิวัติ แก้วประดับ

(ภาษาอังกฤษ) Mr. Niwat Keawpradub

เลขหมายประจำตัวประชาชน 3-9011-00033-30-7

ตำแหน่งปัจจุบัน ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ระดับ 7

หน่วยงานและที่อยู่ ภาควิชาเภสัชเวทและเภสัชพฤกษศาสตร์ คณะเภสัชศาสตร์
มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ อ.หาดใหญ่ จ.สงขลา 90112
โทรศัพท์ 074-428220 หรือ 8891 โทรสาร 074-428220
Email : niwat.k@psu.ac.th

ประวัติการศึกษา

ชื่อปริญญา	สถาบันที่จบการศึกษา	ปีที่จบการศึกษา
ภ.บ.	จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย	2530
ภ.ม. (เภสัชเวท)	จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย	2533
Ph.D. (Pharmacognosy)	University of London (U.K.)	2541

สาขาวิชาการที่มีความชำนาญพิเศษ เภสัชเวท (Pharmacognosy) เคมีผลิตภัณฑ์ธรรมชาติ ยาสมุนไพร และการเพาะเลี้ยงเซลล์สัตว์

ประสบการณ์ที่เกี่ยวข้องกับการบริหารงานวิจัย

- ได้รับทุนโครงการความร่วมมือทางวิชาการระหว่างไทย-ญี่ปุ่น (NRCT-JSPS) ฝึกอบรมการวิจัยทางพฤกษเคมีเรื่อง อินโดลแอลคาลอยด์ของพืช *Alstonia glaucescens* (Chiba University) ญี่ปุ่น (90 วัน) 2536
- โครงการอบรมหลักสูตรระยะสั้นเทคโนโลยีชีวภาพเซลล์สัตว์ (Animal cell biotechnology) ซึ่งเป็นโครงการความร่วมมือทางวิชาการระหว่างรัฐบาลอิสราเอล และมหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ 2541(12 วัน)
- ได้รับมอบหมายจากศูนย์เครื่องมือวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์เข้ารับการอบรมเชิงปฏิบัติการเรื่อง LCT (LC-MS) operator training course ณ บริษัท Micromass UK Limited, Manchester ประเทศอังกฤษประเทศอังกฤษ (4 วัน) 2544

หัวหน้าโครงการวิจัย :

งานวิจัยที่ทำเสร็จแล้ว :

- Keawpradub, N., Salaeh, S. and Muangwong, S. Free radical scavenging activity of star anise (*Illicium verum*). *Songklanakarin J. Sci. Technol.* 23: 527-536, 2001.
- Keawpradub, N., Itharat, A., Tantikarnkul, A., Rugleng, S. and Inruspong, P. Cytotoxic alkaloids from the tuber of *Stephania venosa*. *Songklanakarin J. Sci. Technol.* 23: 225-234, 2001.
- Keawpradub, N., Kirby, G.C., Steele, J.C.P. and Houghton, P.J. Antiplasmodial activity of extracts and alkaloids of three *Alstonia* species from Thailand. *Planta Medica* 65: 690-694, 1999.

- **Keawpradub, N.**, Eno-Amooquaye, E., Burke, P.J. and Houghton, P.J. Cytotoxic activity of indole alkaloids from *Alstonia macrophylla*. *Planta Medica* 65: 311-315, 1999.
- สนั่น ศุภธีรสกุล, จินดาพร ภูริพัฒนาวงษ์ และ **นิวัติ แก้วประดับ** "ปริมาณโลหะหนักในตำรับยาไทยแผนโบราณสำเร็จรูปสำหรับยาใช้ภายนอก" ว. สงขลานครินทร์ วทท. 21: 341-345, 1999.
- **Keawpradub, N.** and Houghton, P.J. Indole alkaloids from *Alstonia macrophylla*. *Phytochemistry* 46: 757-762, 1997.
- **Keawpradub, N.**, Houghton, P.J., Eno-Amooquaye, E. and Burke, P.J. Activity of extracts and alkaloids of Thai *Alstonia* species against human lung cancer cell lines. *Planta Medica* 63: 97-101, 1997.
- **Keawpradub, N.**, Takayama, H., Aimi, N. and Sakai, S. Indole alkaloids from *Alstonia glaucescens*. *Phytochemistry* 37: 1745-1749, 1994.

ชื่อ-สกุล (ภาษาไทย) นางสมสมร ชิตตระการ

(ภาษาอังกฤษ) Mrs. Somsmorn Chittrakarn

เลขหมายประจำตัวประชาชน 3-1006-01719-32-1

ตำแหน่งปัจจุบัน ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ระดับ 8

หน่วยงานและที่อยู่ ภาควิชาเภสัชวิทยา คณะวิทยาศาสตร์ ม.สงขลานครินทร์ อ.หาดใหญ่ จ.สงขลา 90112

โทรศัพท์ 074-28 8171-2 โทรศัพท์/โทรสาร 0 7444 6678

Email : somsmom.c@psu.ac.th

ประวัติการศึกษา

ชื่อปริญญา	สถาบันที่จบการศึกษา	ปีที่จบการศึกษา
วท.บ. (พยาบาล)	มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์	2524
วท.ม. (เภสัชวิทยา)	มหาวิทยาลัยเชียงใหม่	2528

สาขาวิชาการที่มีความชำนาญพิเศษ เภสัชวิทยาระบบประสาทอัตโนมัติ, เภสัชวิทยารอยต่อประสาท-กล้ามเนื้อลาย

ประสบการณ์ที่เกี่ยวข้องกับการบริหารงานวิจัย

หัวหน้าโครงการวิจัย : เภสัชจลนศาสตร์ของยาไอเวอร์เมคตินในแมวสุขภาพปกติ

งานวิจัยที่ทำเสร็จแล้ว :

- Chittrakarn, S., Trisdikoon, P. and Wanwimolruk, S. (1990) Blood alcohol in driver involved in road traffic accidents admitted to hospitals in Songkhla Province. *Songklanakarin Journal of Science and Technology* 12(4): 373-379. หัวหน้าโครงการวิจัย
- Nakai, S., Chittrakarn, S., Chang, H.S., Kato, N. and Uchiyama, T. (1992) Preliminary study on the germanium tissue accumulation in the subacute toxicate of GeO_2 and carboxyethylgermanium sesquioxide (Ge-132) in rats. *Toxicology Letters Supplement*, 267. ผู้ร่วมวิจัย
- Uchiyama, T., Nakai, S., Chittrakarn, S., Chang, H.S. and Kato, N.(1993) Toxicity and tissue accumulation of germanium compound. *Biomedical Research on Trace Elements 4(2): 125-126.* ผู้ร่วมวิจัย
- สงวนสิน รัตนเลิศ, วิญญู มิตรานันท์, สมสมร ชิตตระการ และ สุธีระ ประเสริฐสรรพ์. เครื่องมือหนีบหนังศีรษะในระหว่างผ่าตัด. รางวัลที่ 3 ผลงานสิ่งประดิษฐ์คิดค้นของสภาวิจัยแห่งชาติ ประจำปี 2540 ประเภททั่วไป. ผู้ร่วมวิจัย
- Nakai, S., Chittrakarn, S., Chang, H.S. and Uchiyama, T. (1994) A 90-days repeated oral dose toxicity study of calium carbonate-carboxyethyl germanium sesquioxide suspension (CGS) in rats. *Japanese Pharmacology & Therapeutics. 22(10):77-94* ผู้ร่วมวิจัย
- Ridtitid, W., Wongnawa, M., Janchawee, B., Chittrakarn, S., Sunbhanich, M. and

Mahatthanatrakul, W. (1997) Single dose pharmacokinetics comparative studies between intramuscular acetaminophen formulation with and without lidocaine in healthy Thai volunteers. *Thai Journal Pharmacology.* 19(1): 7-14. ผู้ร่วมวิจัย

- Ridtitid, W., Rattanaprom, W., Thaina, P., **Chittrakarn**, S. and Sunbhanich, M. (1998) Neuromuscular blocking activating of methanolic extract of Piper samentosum leaves in the rat phrenic nerve-hemidiaphragm preparation. *Journal of Ethnopharmacology.* 61: 135-142. ผู้ร่วมวิจัย
- Nakai, S., **Chittrakarn**, S. and Togashi, T. (1998) Subacute toxicity study and germanium tissue accumulation of three germanium compounds, germanium dioxide (GeO_2), propagermanium (PPG), tetra (2-carboxy-2-aminoethylmercapto) germanium (TCG) in rats. *Pharmacometrics.* 56(1) : 1-16. ผู้ร่วมวิจัย
- Prasettho, S, Chittrakarn, S. and Wongwatcharanon, U. (2003). Subacute toxicity of the crude extract of *Pisonia alba* Span. leaves on rat liver and heart. *Songklanakarin Journal of Science and Technology* 25 (3) : 515-524. ผู้ร่วมวิจัย

ชื่อ-สกุล (ภาษาไทย) นางสุภาภรณ์ ประเศรษโฐ

(ภาษาอังกฤษ) Mrs. Supaporn Prasettho

เลขหมายประจำตัวประชาชน 3-7299-00137-88-2

ตำแหน่งปัจจุบัน ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ระดับ 8

หน่วยงานและที่อยู่ ภาควิชาเภสัชวิทยา คณะวิทยาศาสตร์ ม. สงขลานครินทร์ อ. หาดใหญ่ จ. สงขลา 90112 โทรศัพท์ 0 7428 8171-2 โทรศัพท์/โทรสาร 0 7444 6678

Email : supaporn.p@psu.ac.th

ประวัติการศึกษา

ชื่อปริญญา	สถาบันที่จบการศึกษา	ปีที่จบการศึกษา
วิทยาศาสตรบัณฑิต (วท.บ.)	มหาวิทยาลัยเชียงใหม่	2524
วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (วท.ม.)	มหาวิทยาลัยเชียงใหม่	2529

สาขาวิชาการที่มีความชำนาญพิเศษ เภสัชวิทยาระบบหายใจ และระบบหัวใจและหลอดเลือด

ประสบการณ์ที่เกี่ยวข้องกับการบริหารงานวิจัย

หัวหน้าโครงการวิจัย : การศึกษาฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาในกายและนอกกายสัตว์ทดลองของสารสกัดหยาบใบแสงจันทร์ต่อกล้ามเนื้อเรียบหลอดลมและระบบหัวใจและหลอดเลือด

งานวิจัยที่ทำเสร็จแล้ว :

- Kansenalak S, Panthong A ,Tantiwachwuttikul P (1985). Bronchodilator activity of 5,7-dihydroxyflanone(5,7-DHF). *Seminar on Drug Development from Medicinal Plant* . July 17-19 Bankok, Thailand :124-125.
- Harchariyakul C, **Prasettho** S, Wongnawa N (1995). The study of anti-inflammatory activity of *Randia siamensis Criab.* in rats. *The seventh Southeast Asia/Western Pacific Reginal Meeting of Pharmacologists*. Noverber 21-25, Manila, Philipines.
- Harchariyakul C, **Prasettho** S, Bumrungwong N, Sanbhanich M (1999). The study of anti-inflammatory activity of *Randia siamensis Criab.* in rats. *Songklanakarin Journal of Science and Technology* 21(3) : 329-332.
- **Prasettho** S, Teachawong A, Wongnava M, Sanbhanich M (1999). Effect of water extract of *Randia siamensis Criab.* on guinea-pig tracheal smooth muscle. *SongKlanakarin Journal of Science and Technology*. 21(3) : 333-340.
- **Prasettho** S, Chittrakarn S, Wongwatcharanon U. (2003). Subacute toxicity of the crude extract of *Pisonia alba* Span. leaves on rat liver and heart. *Songklanakarin Journal of Science and Technology* 25(4) : 516-524.

ชื่อ-สกุล (ภาษาไทย) นายภุชงค์ วรรัตนานุรักษ์

(ภาษาอังกฤษ) Mr. Puchong Wararatananurak

เลขหมายประจำตัวประชาชน 3-8097-00131-20-1

ตำแหน่งปัจจุบัน อาจารย์ระดับ 6

หน่วยงานและที่อยู่ ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ ม.สงขลานครินทร์ อ.หาดใหญ่ จ.สงขลา 90112

โทรศัพท์ 0 7428 8424 โทรศัพท์/โทรสาร 0 74 212918

Email : puchong.w@psu.ac.th

ประวัติการศึกษา

ชื่อปริญญา	สถาบันที่จบการศึกษา	ปีที่จบการศึกษา
วท.บ.(เคมี)	ม.สงขลานครินทร์	2529
วท.ม.(เคมีวิเคราะห์)	ม.เชียงใหม่	2537
Ph.D.(Environmental Chemistry)	University of Aberdeen	2544

สาขาวิชาการที่มีความชำนาญพิเศษ เคมีวิเคราะห์

ประสบการณ์ที่เกี่ยวข้องกับการบริหารงานวิจัย

หัวหน้าโครงการวิจัย :

งานวิจัยที่ทำเสร็จแล้ว : การวิเคราะห์หาสปีชีส์ของสารหนูอนินทรีย์โดยเทคนิค HG-ICP-OES

ชื่อ-สกุล (ภาษาไทย) นายกิจจา สว่างเจริญ

(ภาษาอังกฤษ) Mr. Kitja Sawangjaroen

เลขหมายประจำตัวประชาชน 3-9010-00520-60-5

ตำแหน่งปัจจุบัน ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ระดับ 8

หน่วยงานและที่อยู่ ภาควิชาเภสัชวิทยา คณะวิทยาศาสตร์ ม.สงขลานครินทร์ อ.หาดใหญ่ จ. สงขลา 90112

โทรศัพท์ 074-288175 โทรศัพท์/โทรสาร 074-446678

Email : kitja.s@psu.ac.th

ประวัติการศึกษา

ชื่อปริญญา	สถาบันที่จบการศึกษา	ปีที่จบการศึกษา
ภบ.	มหาวิทยาลัยมหิดล	2521
วท.ม. (เภสัชวิทยา)	มหาวิทยาลัยมหิดล	2524
Ph.D. (Physiology)	University of Queensland, AUSTRALIA	2540

ประสบการณ์ที่เกี่ยวข้องกับการบริหารงานวิจัย

ผู้อำนวยการแผนงานวิจัย :

- การศึกษาทางเภสัชวิทยาและพิษวิทยาของใบกระท่อม

หัวหน้าโครงการวิจัย :

- การศึกษาพิษเรื้อรังของสารสกัดใบกระท่อม

งานวิจัยที่ทำเสร็จแล้ว :

- Sunbhanich, M., Thaina, P., Pongmarutai, M. and **Sawangjaroen, K.** (1989) Study on some pharmacological effects of *Portulaca oleracea* Linn. on the isolated guinea-pig preparations. *Songklanakarin Journal of Science and Technology*. 10(4): 405-410.
- **Sawangjaroen, K.**, Dallemagne, C. R., Cross, R. B. and Curlewis, J. D. (1992) Effects of pituitary adenylate cyclase activating polypeptide (PACAP) and vasoactive intestinal polypeptide (VIP) on the cardiovascular system in sheep. *Peptides*. 13: 1029-1032.
- **Sawangjaroen, K.** and Curlewis, J. D. (1994) Effects of pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP) and vasoactive intestinal polypeptide (VIP) on prolactin, luteinizing hormone and growth hormone secretion in the ewe. *Journal of Neuroendocrinology*. 6: 549-565.
- **Sawangjaroen, K.**, Sernia, C. and Curlewis J. D. (1996) Effects of pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide and vasoactive intestinal polypeptide on cyclic AMP accumulation in sheep pituitary cells *in vitro*. *Journal of Endocrinology*. 148: 545-562.
- Anderson, S.T., **Sawangjaroen, K.** and Curlewis, J. D. (1996) Pituitary adenylate cyclase-

activating polypeptide acts within the medial basal hypothalamus to inhibit prolactin and luteinizing hormone secretion. *Endocrinology.*137: 3424-3429.

- Anderson, S. T., **Sawangjaroen, K.** and Curlewis, J. D. (1996) A method for drug infusion into the lateral median eminence and arcuate nucleus of sheep. *Journal of Neuroscience Methods.* 71: 169-176.
- **Sawangjaroen, K.**, Anderson, S. T. and Curlewis, J. D. (1997) Effects of pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP) and vasoactive intestinal polypeptide (VIP) on hormone secretion from sheep pituitary cells in vitro. *Journal of Neuroendocrinology.* 9: 279-286.
- Sawangjaroen, N., **Sawangjaroen, K.** and Phunpanang, P. (2004) Effects of *Piper longum* fruit, *Piper sarmentosum* root and *Quercus infectoria* nut gall on caecal amoebiasis in mice. *Journal of Ethnopharmacology* 91: 357 – 360.
- Sawangjaroen, N., Subhadhirasakul, S., Phongpaichit, S., Siripanth, C., Jamjaroen, K. and **Sawangjaroen, K.** (2005) The *in vitro* anti-giardial activity of extracts from plants that are used for self-medication by AIDS patients in Southern Thailand. *Parasitology Research* 95: 17-21.
- Sawangjaroen, N. and **Sawangjaroen, K.** (2005) The effects of extracts from anti-diarrheic Thai medicinal plants on the *in vitro* growth of the intestinal protozoa parasite: *Blastocystis hominis, Journal of Ethnopharmacology* 98: 67-72.