การพัฒนาวิธีวิเคราะห์อีเทมบูทอล โดยไฮเพอร์ฟอร์แมนซ์ ลิควิด โครมาโทรกราฟี ตรวจวัดโดยยูวี [1]

นางสาว มนฤดี วรรณะเอี่ยมพิกุล
นาย วีระโชติ ลาภผลอำไพ

โครงการพิเศษนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร
ปริญญาเภสัชศาสตรบัณฑิต
คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล
พ.ศ. 2549

Development of HPLC with UV detection method for determination of ethambutol

MISS Monruedee Wanna-iampikul

MR. Weerachod Lapponampai

A SPECIAL PROJECT SUBMITTED IN PARTIAL FULFILMENT

OF THE REQUIREMENT FOR

THE BACHELOR DEGREE OF SCIENCE IN PHARMACY

FACULTY OF PHARMACY

MAHIDOL UNIVERSITY

โครงการพิเศษ

เรื่อง การพัฒนาวิธีวิเคราะห์อีเทมบูทอล โดยไฮเพอร์ฟอร์แมนซ์ลิควิด โครมาโทรกราฟี ตรวจวัดโดยยูวี

ลายเซ็น

.....

(นางสาวมนฤดี วรรณะเอี่ยมพิกุล)

ลายเซ็น

.....

(นายวีระโชติ ลาภผลอำไพ)

ลายเซ็น

.....

(รศ.ดร. พิสมัย กุลกาญจนาธร)

อาจารย์ที่ปรึกษา

ลายเซ็น

.....

(อ. ชุติมา มัธยัสถ์สุข)

อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม

บทคัดย่อ
การพัฒนาวิธีวิเคราะห์อีเทมบูทอล
โดยไฮเพอร์ฟอร์แมนซ์ลิควิดโครมาโทรกราฟี ตวจวัดโดยยูวี

มนฤดี วรรณะเอี่ยมพิกุล, วีระโชติ ลาภผลอำไพ
อาจารย์ที่ปรึกษา: พิสมัย กุลกาญจนาธร, ชุติมา มัธยัสถ์สุข
ภาควิชาเภสัชเคมี คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล
คำสำคัญ: อีเทมบลูทอล, การวิเคราะห์, ไฮเพอร์ฟอร์แมนซ์ลิควิดโครมาโทรกราฟี

อีเทมบูทอล(ethambutol) เป็นยารักษาวัณโรคที่ใช้กันมากในปัจจุบัน อีเทมบูทอลเป็นสารประกอบ aliphatic amine ไม่มีโครงสร้างที่จะดูดกลืนแสงอัลตราไวโอเลท โครงการพิเศษนี้ ทำการศึกษาและ พัฒนาวิธีวิเคราะห์หาปริมาณ อีเทมบูทอล โดยวิธีไฮเพอร์ฟอร์แมนซ์ลิควิดโครมาโทรกราฟีและเครื่องตรวจวัดแสงอัลตราไวโอเลต โดยอาศัยการเกิดสารประกอบเชิงซ้อนของอีเทมบูทอลกับ ไดวาเลนท์ แคทอิออน ได้แก่ ทองแดงซึ่งจะดูดกลืนแสงสูงสุดมีความยาวคลื่น 260 นาโนเมตร ทำการทดลองหาสภาวะที่เหมาะสมโดยใช้คอลัมน์ C18 พบว่าเฟสเคลื่อนที่ที่เหมาะสมคือ เททราไฮโดรฟูแรน (tetrahydrofuran) และ สารละลายน้ำ(aqueous solvent) ในอัตราส่วน 30 : 70 ซึ่ง สารละลายน้ำ ประกอบด้วย ทองแดง ความเข้มข้น 2.4 มิลลิโมลาร์, โซเดียม-1-ออคเทนซัลโฟเนท โมโนไฮเดรต (sodium 1-octane sulfonate monohydrate) ความเข้มข้น 3 กรัม/ลิตรในน้ำกลั่น วัดค่าการดูดกลืนแสง ที่ 260 นาโนเมตร ให้ความสัมพันธ์เชิงเส้นตรงกับความเข้มข้นของอีเทมบูทอล เท่ากับ 25 – 300 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร(r^2 = 0.9996) มีความถูกต้องและแม่นยำ มีความไวมากกว่าวิธีวิเคราะห์โดยสเปคโตรโฟโตเมตรี วิธีการที่ศึกษานี้สามารถนำไปหาปริมาณ อีเทมบูทอลในยาเม็ดได้

Abstract

Development of HPLC with UV detection method for determination of ethambutol

Monruedee Wanna-iampikul, Weerachod Lapponampai

Project adviser: Pisamai Kulkanjanathon, Chutima Matayatsuk

Department of Pharmaceutical Chemistry, Faculty of Pharmacy, Mahidol University

Keyword: Ethambutol, determination, HPLC

Ethambutol is an aliphatic amine used for the treatment of tuberculosis and it has not chromophore to absorb UV/ visible. The development of HPLC-UV method for determination of ethambutol HCl was the objective of this study. The complexation of ethambutol free base with cupric ion was applied. HPLC condition was reversed-phase C18 column. The presence of ethambutol-copper (II) complex was observed at 260 nm with UV detector. The suitable mobile phase was a mixture of tetrahydrofuran and distilled water containing 2.4 mM of copper sulfate and 3g/L of sodium-1-octane sulfonate monohydrate, 3:7 (v/v). The linearity range of ethambutol HCl was 25 – 300 µg/ml (r^2 = 0.9996) with good accuracy and precision. This method was more sensitive than UV method and suitable for assay of ethambutol in tablets.

กิตติกรรมประกาศ

โครงการพิเศษนี้สำเร็จลุล่วงตามความมุ่งหมายได้ด้วยความช่วยเหลือและคำแนะนำจากอาจารย์ที่ปรึกษาโครงการ คือ รศ. ดร. พิสมัย กุลกาญจนาธร และ อ. ชุติมา มัธยัสถ์สุข ภาควิชาเภสัชเคมี คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล

นอกจากนี้ ต้องขอขอบคุณ คุณสุรินทร์ อยู่ยง และคุณประดิษฐา รัตนวิจิตร์ ที่อำนวยความสะดวกและช่วยเหลือในระหว่างทำการทดลอง

ผู้ทำการวิจัย

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อ	ก
Abstract	ข
กิตติกรรมประกาศ	ค
สารบัญ	ง
สารบัญตาราง	จ
สารบัญรูป	ฉ
สัญลักษณ์และคำย่อ	ช
บทนำ	1
ทบทวนวรรณกรรม	3
วัสดุ, อุปกรณ์ที่ใช้ และการเตรียมสารเคมี	7
วิธีการวิจัย	10
ผลการวิจัย	14
วิจารณ์ผลการวิจัย	28
สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ	31
เอกสารอ้างอิง	33

สารบัญตาราง

ตารางที่	หน้า
1. แสดงเฟสเคลื่อนที่ และอัตราส่วนของ aqueous phase ต่อ organic phase	11
2. ผลการทดลองการปรับเฟสเคลื่อนที่	15
3. ผลการทดลองการปรับ pH	15
4. ผลการทดลองการปรับสัดส่วนของ organic phase: aqueous phase	17
5. ผลการทดลองเมื่อเปลี่ยนแปลงอุณหภูมิ	18
6. ผลการทดลองเมื่อปรับความเข้มข้น copper (II) sulfate	20
7. ผลการทดลองการปรับปริมาณ ion pairing agent	22
8. แสดงค่า peak area และความเข้มข้นของ Ethambutol ความยาวคลื่น 260 นาโนเมตร	24
9. แสดงผลการทดลอง Intraday precision	25
10. แสดงผลการทดลอง Interday precision	26
11. แสดงค่า %recoveryของวิธีการวิเคราะห์ด้วย HPLC	26
12. ผลการทดลองการวิเคราะห์ปริมาณ ethambutol ในตำรับยาเม็ด	27
13. เปรียบเทียบวิธีวิเคราะห์ ethambutol โดยใช้ HPLC / UV detector	31

สารบัญรูป

รูปที่	หน้า
1. โครงสร้างของ ethambutol และ ethambutol-copper(II) complex	1
2. กราฟแสดงค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่อง spectrophotometer	14
3. แสดง chromatogram เปรียบเทียบ pH ของ mobile phase	16
4. แสดง chromatogram เปรียบเทียบ สัดส่วนของ organic solvent	17
5. แสดง chromatogram เปรียบเทียบผลของ อุณหภูมิ ต่อ retention time และ peak area	19
6. ผลการทดลองเมื่อปรับความเข้มข้น copper(II) sulfate	21
7. ผลการทดลองการปรับปริมาณ ion pairing agent	23
8. แสดงความสัมพันธ์เชิงเส้นระหว่างความเข้มข้นของ ethambutol HCl กับ peak area, ค่า r^2	25

สัญลักษณ์และคำย่อ

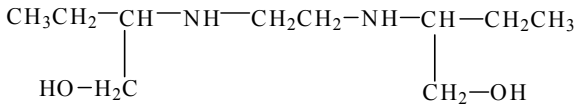
λ_{max}	=	maximum wavelength
nm	=	นาโนเมตร
pH	=	ความเป็นกรด-ด่าง
µg	=	ไมโครกรัม
mL	=	มิลลิลิตร
r^2	=	coefficient of determination
mg	=	มิลลิกรัม
USP	=	The United State Pharmacopoeia
^oC	=	องศาเซลเซียส
RSD	=	relative standard deviation
CV	=	coefficient of variation
$\overline{X}$	=	ค่าเฉลี่ยของผลการวิเคราะห์
SD	=	ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานจากค่าเฉลี่ย
UV	=	ultraviolet
mM	=	millimolar
HPLC	=	High Performance Liquid Chromatography

บทนำ

Ethambutol เป็นยารักษาวัณโรค โดยใช้ร่วมกับยารักษาวัณโรคตัวอื่นๆ ได้แก่ isoniazid, rifampicin และ pyrazinamide เป็นต้น ขนาดยาที่ใช้ 15-25 mg/kg/day มีรายงานความเป็นพิษของ ethambutol ต่อประสาทตาเป็นผลให้ประสาทตาเลวลง และไม่อาจแยกสีแดงและสีเขียวได้ ปริมาณยาในร่างกายมีความสำคัญ ต้องมีปริมาณที่เหมาะสมที่จะให้ผลในการรักษา และต้องไม่มากจนก่อให้เกิดความเป็นพิษต่อร่างกาย[1,2]

USP กำหนดวิธีวิเคราะห์หาปริมาณ ethambutol โดยวิธี non-aqueous titration[5] ซึ่งเป็นวิธีที่สะดวก แต่มีความไวต่ำ โครงการพิเศษนี้มีวัตถุ ประสงค์ที่จะพัฒนาวิธีวิเคราะห์ยา ethambutol โดยใช้วิธี high performance liquid chromatography(HPLC)/UV detector โดยทดลองหาสภาวะที่เหมาะสมในการวิเคราะห์หาปริมาณ ethambutol เพื่อให้ได้วิธีการที่มีความไวสูง ถูกต้อง แม่นยำ และเป็นวิธีที่ดีกว่าวิธีที่กำหนดใน USP

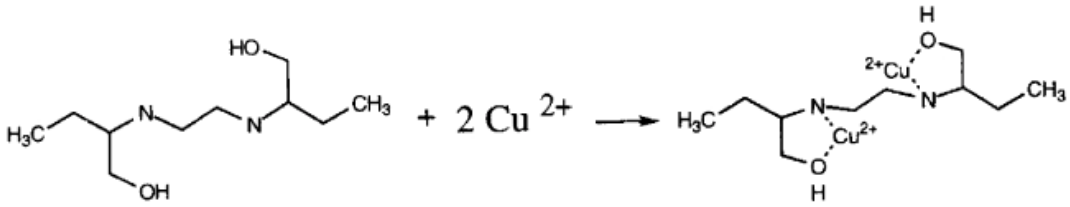
ethambutol มีโครงสร้างทางเคมีเป็น aliphatic amines ดังแสดงในรูปที่ 1.1



รูปที่1.1 โครงสร้าง ethambutol

จากโครงสร้างทางเคมีของ ethambutol พบว่าไม่มีโครงสร้าง chromophore ที่จะดูดกลืนรังสีอัลตร้าไวโอเลตและไม่สามารถทำการวิเคราะห์ด้วย spectrophotometry หรือ HPLC/UV detector ได้

มีรายงานการประยุกต์ใช้ divalent cationic metals ทำปฏิกิริยากับ ethambutol HCl เกิดเป็นสารประกอบ[4] ซึ่งสามารถดูดกลืนแสง UV ได้(รูปที่1.2) ซึ่งจะทำให้ วิเคราะห์หาปริมาณของ ethambutol โดย spectrophotometry หรือ HPLC/UV detector ได้ ในการพัฒนาวิธีวิเคราะห์จะต้องศึกษาหาสภาวะที่เหมาะสมในการเกิดและความคงตัวของ ethambutol-complex สภาวะที่ทำการศึกษาได้แก่ pH อัตราส่วนของ ethambutolและ metal เป็นต้น เนื่องจากต้องให้ ethambutol และ copper เกิดการcoupling ก่อนที่จะถึง detector ในทางกลับกัน ควรมีความคงตัวและไม่เกิดการเปลี่ยนสภาพก่อนที่จะถึง detector ด้วย



รูปที่1.2 โครงสร้างethambutol-copper (II) complex

วัตถุประสงค์ 1. หาสภาวะที่เหมาะสม เพื่อวิเคราะห์ปริมาณ ethambutol โดยใช้ HPLC/UV detector

2. ประเมินวิธีวิเคราะห์

3. วิเคราะห์หาปริมาณยา ethambutol ในเภสัชภัณฑ์ยาเม็ด

ทบทวนวรรณกรรม

Ethambutol HCl มีสูตรโครงสร้างเป็น aliphatic amines ชื่อทางเคมีคือ 1-butanol, 2,2-(1,2-ethanediyldiimine)bis-, dihydrochlorideหรือ (+) -2,2 (ethylenediimino)-di-1-butanol dihydorchloride ดังแสดงในรูปที่ 1 ใช้ในการรักษาวัณโรคโดยใช้ร่วมกับยาอื่น

คุณสมบัติทางกายภาพ[1]

Ethambutol HCl มีลักษณะเป็นผงผลึกสีขาว ไม่มีกลิ่น ไม่มีสี มีรสขม มีจุดหลอมเหลว 200.0 – 202.0 °C มีค่า specific rotation + 6.0 ° และ +6.7° สามารถละลายได้ดีในน้ำ ละลายได้ในเอธานอล และละลายได้น้อยมากในอะซีโตนและ คลอโรฟอร์ม ส่วน free bases ของ ethambutol เป็นกรดอ่อน มีค่า pKa 6.6 และ 9.5 สารละลายของ ethambutol HCl ในเอธานอลไม่มีการดูดกลืนแสงในช่วง UV/Visible

การเก็บรักษา

Ethambutol HCl tablet ควรเก็บให้พ้นแสง ความชื้น ความร้อน และควรเก็บในภาชนะที่ปิดสนิท ที่อุณหภูมิ 15-30 °C

ขอบเขตการออกฤทธิ์

Ethambutol มีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อ *Mycobacterium tuberculosis*, *Mycobacterium kansasii* ได้ผลดี และมีผลต่อบางสายพันธุ์ของ *Mycobacterium* spp. อื่นๆ โดยไม่มีฤทธิ์ต่อเชื้อแบคทีเรียกลุ่มอื่น ยับยั้งเชื้อวัณโรคที่ดื้อต่อ isoniazid และ streptomycin ได้ การดื้อ ethambutol ในหลอดทดลองเกิดขึ้นค่อนข้างช้า

กลไกการออกฤทธิ์

กลไกการออกฤทธิ์ของ ethambutol ยังไม่แน่ชัด อาจยับยั้งการนำ mycolic acid เข้าสู่ผนังเซลล์ หรือยับยั้งการสร้าง RNA หรืออาจยับยั้งการสังเคราะห์ metabolites ของเซลล์ mycobacteria โดยยาจะมีฤทธิ์เฉพาะกลุ่มแบคทีเรียที่กำลังแบ่งตัวอย่างรวดเร็วเท่านั้น

ประโยชน์ทางการแพทย์

ใช้รักษาวัณโรคร่วมกับยาอื่นๆ โดยรับประทานในขนาด 15-25 mg/kg วันละครั้ง หรือ 25-30 mg/kg สัปดาห์ละ 3 ครั้ง สำหรับผู้ป่วยที่เคยได้รับการรักษามาก่อนแต่ไม่หาย แนะนำให้ใช้ในขนาด 25 mg/kg/day เป็นเวลา 60 วัน แล้วจึงลดลงเหลือ 15 mg/kg/day

ฤทธิ์ไม่พึงประสงค์

ฤทธิ์ไม่พึงประสงค์ที่สำคัญของ ethambutol คือ การทำให้ประสาทตาอักเสบ พบมากเมื่อใช้ยาขนาดสูงหรือใช้ยาเป็นเวลานาน จะมีผลทำให้สายตาเลวลง และไม่สามารถแยกสีแดงและสีเขียวได้ อาการกลับเป็นปกติได้เมื่อหยุดยา

อาจพบอาการข้างเคียงอื่นๆ ได้แก่ ผื่น คัน มีไข้ ปวดข้อ ไม่สบายท้อง ปวดศีรษะ วิงเวียน สับสน ประสาทหลอน ได้บ้างแต่ไม่มาก

หากใช้ยาในขนาดไม่เกิน 15 mg/kg/day พบอาการข้างเคียงค่อนข้างน้อย

การวิเคราะห์ปริมาณ ethambutol HCl

1. Non-aqueous titration[3]

ละลาย ethambutol HCl ใน glacial acetic acid แล้วเติม mercuric acetate TS เติม Crystal violet TS เป็น indicator แล้วไตเตรทด้วย 0.1 N perchloric acid ได้ end point สี blue-green

2. Colorimetric method[5]

อาศัยหลักการ คือ การเกิดสารประกอบเชิงซ้อนระหว่าง bromothymol blue และ ethambutol เกิดเป็นสารประกอบสีเหลืองสามารถวัดค่าการดูดกลืนแสงได้ด้วยเครื่อง spectrophotometer

3. High-performance liquid chromatography with fluorescence detection[6]

คอลัมน์เป็น เฟสย้อนกลับ (Spherisorb CN) เฟสเคลื่อนที่ที่ใช้คือ acetonitrile : H_3PO_4 ความเข้มข้น 0.01 M ปรับให้มี pH 2.5 ด้วย KOH(30 : 70, v/v) , flow rate 1 ml/min ใช้ fluorimetric detector

4. HPLC/UV detector

4.1 ethambutol ทำปฏิกิริยา complex กับ copper salts โดยใช้คอลัมน์ silica (LiChrosorb Si 60, 5 μm) เฟสเคลื่อนที่ คือ water : acetonitrile (50 : 50)[7]

4.2 คอลัมน์ใช้ เฟสย้อนกลับ C18 เฟสเคลื่อนที่ที่ใช้คือ tetrahydrofuran :Cu (II) ความเข้มข้น 1 mM + sodium-1-heptane sulphonate 4 g/L ในน้ำที่ปรับ pH 4.5 (30 : 70) อุณหภูมิคอลัมน์ 35 ^{o}C flow rate 1.5 ml/min[4]

การตรวจสอบความถูกต้องของวิธีการวิเคราะห์ (Method validation)[3,8,9]

ผลการวิเคราะห์ที่ถูกต้อง แม่นยำ และเชื่อถือได้ ขึ้นอยู่กับวิธีการวิเคราะห์ที่ดี ดังนั้นจะต้องทำการตรวจสอบความแม่นยำ และความถูกต้องของวิธีการวิเคราะห์(validation) และต้องทำการตรวจสอบเป็นระยะ สำหรับการวิเคราะห์ในงานประจำ เพื่อควบคุมความแปรปรวนที่อาจเกิดขึ้นได้จากปัจจัยต่างๆ เช่น เครื่องมือ นักวิเคราะห์ สารเคมี เป็นต้น ซึ่งคุณสมบัติที่ใช้ในการตรวจสอบวิธีวิเคราะห์มีดังนี้

1. ความสัมพันธ์โดยตรงของค่าที่วิเคราะห์ได้กับค่าที่เป็นจริง (Linearity and range)

โดยค่าที่วิเคราะห์ได้ควรเป็นสัดส่วนกับปริมาณของตัวยาที่อยู่จริง ซึ่งวิธีวิเคราะห์ที่ดีควรมีค่า correlation coefficient (r^2) ไม่ต่ำกว่า 0.99

2. ความแม่นยำ (Precision)

ความแม่นยำเป็นการวัด ความแปรปรวนหรือการกระจายของผลการวิเคราะห์จากค่าเฉลี่ยในการวิเคราะห์ซ้ำหลายๆครั้ง เนื่องจากสภาวะแวดล้อมอื่นๆ วิธีวิเคราะห์ที่ดีจะต้องมีค่าความแปรปรวนต่ำ ซึ่งค่านี้จะเป็นค่าที่ใช้แสดงความแม่นยำของวิธีวิเคราะห์ ในการทดลองความแม่นยำของวิธีวิเคราะห์ จะทำการทดลองหาค่า relative standard deviation (RSD) หรือ coefficient of variation(CV)

$$\text{RSD (หรือ CV)} = \frac{SD}{\overline{X}} \times 100$$

โดย $\overline{X}$ คือ ค่าเฉลี่ยของผลการวิเคราะห์

SD คือ ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานจากค่าเฉลี่ย

ค่าความแม่นยำของวิธีวิเคราะห์แยกได้เป็น intraday precision โดยทำการทดลองซ้ำหลายๆครั้งในช่วงวันเดียวกัน โดยผู้ทำการทดลอง สภาวะการทดลอง และห้องปฏิบัติการเดียวกัน และ interday precision โดยทำการทดลองซ้ำต่างวันหรือต่างห้องปฏิบัติการ มีการเตรียมน้ำยาต่างๆ และเครื่องมือใหม่ในการทดลอง

วิธีวิเคราะห์ที่ดี มีความแม่นยำสูง ค่า %RSD ไม่ควรเกิน 2.0

3. ความถูกต้อง(Accuracy)

วิธีทดสอบความถูกต้องของวิธีการวิเคราะห์ที่นิยมมี 2 วิธีคือ

1.1 Spiked-placebo recovery method

วิธีนี้ทำโดยเตรียมตัวอย่าง โดยเตรียมส่วนผสมอื่นๆ เช่นเดียวกับที่มีในตัวอย่างทุกประการ แต่ไม่มีตัวยาที่ต้องวิเคราะห์ มาผสมกับตัวยามาตรฐานที่ทราบปริมาณแน่นอนให้เข้าเป็นเนื้อเดียวกัน แล้วนำมาวิเคราะห์หาปริมาณตัวยาโดยวิธีวิเคราะห์ที่ต้องการทดสอบ เพื่อให้การทดสอบครอบคลุมอัตราส่วนของตัวยาสำคัญกับส่วนผสมอื่นๆ ได้กว้าง ให้เตรียมตัวอย่างที่มีระดับความแรงต่างๆ โดยทั่วไปให้ทดสอบความถูกต้องในความแรง ร้อยละ80 ของค่าต่ำสุดที่กำหนดถึงร้อยละ120 ของปริมาณตัวยาสูงสุดที่กำหนด วิธีทดสอบนี้มีข้อเสียคือส่วนผสมของตัวอย่างที่เตรียมขึ้นมาจะไม่เหมือนตัวอย่างจริงที่ผ่านกระบวนการผลิต โดยเฉพาะอย่างยิ่งในกรณีที่การผลิตทำให้เกิดการสลายตัวหรือเกิดปฏิกิริยาระหว่างส่วนผสมต่างๆ

1.2 Standard addition method

วิธีตรวจสอบความถูกต้องของผลการวิเคราะห์ ทำได้โดยการเตรียมสารมาตรฐานที่ทราบปริมาณแน่นอน เติมลงในสารตัวอย่าง โดยที่ปริมาณสารตัวอย่างจะเท่ากันแต่จะเปลี่ยนแปลงที่ปริมาณของสารมาตรฐาน คำนวณออกมาในรูป %recovery

วิธีการวิเคราะห์ที่ดีนั้น ผลการวิเคราะห์ที่ได้จะต้องมี %recovery อยู่ในช่วง 90-110, %RSD < 2.0

วัสดุและอุปกรณ์ที่ใช้

อุปกรณ์ที่ใช้ในการทดลอง

1. volumetric flask ขนาด 500, 250, 100, 50,25, 10 mL
2. beaker ขนาด 1000,600 ,400 ,250 ,100 ,50 mL
3. measuring pipet ขนาด 10,5 ,2 ,1 mL
4. volumetric pipet ขนาด 5, 4, 3, 2, 1 mL
5. cylinder 100, 25, 10, 5 mL
6. จุกยาง
7. weighing bottle
8. dropper
9. stirring rod
10. test tube
11. pH meter
12. spectrophotometer Shimadzu UV-160A
13. HPLC
14. vacuum pump

สารเคมีที่ใช้

1. Ethambutol analytical grade (Sigma-Alrich, Switzerland)
2. Copper sulfate pentahydrate (Fluka Garantie, Switzerland)
3. Sodium-1-Octane Sulfonate Monohydrate (Sigma-Alrich, Switzerland)
4. Boric acid analytical grade (May & Baker LTD. Dagenham, England)
5. Sodium hydroxide analytical grade (Eka Nobel, Sweden)
6. Glacial acetic acid analytical grade (Lab scan, Thailand)
7. Hydrochloric acid analytical grade (Lab scan, Thailand)
8. Methanol HPLC grade (Lab scan Asia, Thailand)
9. Acetonitrile HPLC grade (Lab scan Asia, Thailand)
10. Tetrahydrofuran HPLC grade (Lab scan Asia,Thailand)
11. Ethambutol HCl 400 mg tablet (องค์การเภสัชกรรม Lot No. 400308, Thailand)
12. Distilled water
13. Water for injection

การเตรียมสารละลาย

1. เตรียม ethambutol standard stock solution 1.8 mM

   ชั่ง ethambutol HCl 125 mg ละลายในน้ำและปรับปริมาตรจนครบ 250 mL

2. เตรียม copper sulfate solution 50 mM

   ชั่ง copper(II) sulfate pentahydrate 3.125 กรัม ละลายในน้ำและปรับปริมาตรจนครบ 250 ml

3. เตรียม borate buffer

   ชั่ง boric acid ประมาณ 1.24 กรัม ลงใน volumetric flask ขนาด 100 ml ละลายในน้ำประมาณ 90 ml ปรับ pH ของ buffer ให้เป็น 9 โดยใช้ sodium hydroxide ความเข้มข้น 5 N ปรับปริมาตรด้วยน้ำให้ครบ 100 ml

วิธีทำการวิจัย

1. หาสภาวะที่เหมาะสมใการวิเคราะห์ ethambutol HCl ด้วยเครื่อง HPLC โดย UV detector

1.1 การทดลองหา pH และความยาวคลื่นที่ดูดกลืนสูงสุดในการเกิดปฏิกิริยาระหว่างethambutol กับ copper

การทดลองหา pH ทำได้โดย pipet copper sulfate solution 25 mM ลงใน volumetric flask ขนาด 100 mL จำนวน 3 flask, flaskละ 10 mL จากนั้นเติมน้ำให้มีปริมาตรประมาณ 90 mL ปรับpHแต่ละflaskเป็น pH7, pH10, pH4 โดยใช้ 0.1 N NaOH และ 0.1N acetic acid แล้วปรับปริมาตรเป็น 100 mL สังเกตลักษณะทางกายภาพของ copper sulfate solution

การทดลองหาความยาวคลื่นที่ดูดกลืนสูงสุด ทำได้โดย pipet ethambutol HCl 1.2 mM ลงใน volumetric flask ขนาด 10 mL จำนวน 2 flask, flask ละ 2 mL โดย flask หนึ่งนำไปเติมสารละลาย copper(II)sulfate ความเข้มข้น 25 mM 2 mL อีก flask หนึ่งไม่ใส่สารละลาย copper (II) sulfate ปรับปริมาตรของ flask ทั้ง 2 ด้วยน้ำกลั่น จากนั้นนำแต่ละ flask ไปวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่อง spectrophotometer โดยทำการ scan λ ช่วง200-400 นาโนเมตร ณ อุณหภูมิห้อง

1.2 พัฒนาวิธีวิเคราะหาปริมาณ ethambutol HCl โดยใช้ HPLC

ทำการทดลองปรับสภาวะต่างๆเพื่อให้ได้วิธีวิเคราะห์ที่เหมาะสม โดยใช้ flow rate 1.0 mL/min วัดที่ความยาวคลื่น 260 นาโนเมตร โดยใช้สารละลายของ standard ethambutol ความเข้มข้น 0.45 mM จำนวน 20 µL เปรียบเทียบ chromatogram ที่ได้ โดยดูจาก retention time, peak symmetry, peak area เพื่อเลือกสภาวะที่เหมาะสม สภาวะที่ทำการทดลองได้แก่

1.2.1 สภาวะของเฟสเคลื่อนที่ (mobile phase condition)

เลือกใช้เฟสเคลื่อนที่และสัดส่วนของ aqueous phase ต่อ organic phase ดังตารางที่ 1

ตารางที่1 แสดงเฟสเคลื่อนที่และอัตราส่วนของ aqueous phase ต่อ organic phase

Aqueous phase : Organic phase	สัดส่วน
Copper(II) 25 mM in borate buffer(pH 4.5): MeOH	70 : 30
Copper(II) 25 mM + Sodium 1-octane sulfonate monohydrate 4 g/L : Acetronitrile	75 : 25
Copper(II) 4 mM + Sodium 1-octane sulfonate monohydrate 4 g/L adjust pH 4.5 with Acetic acid : Tetrahydrofuran(THF)	75 : 25
Copper(II) + Sodium 1-octane sulfonate monohydrate + adjust pH 4.5 with HCl : THF	75 : 25

1.2.2 pH

aqueous phase คือ copper (II) sulfate 2.5 mM+ sodium-1-octane sulfonate monohydrate 4g/L ในน้ำ จากนั้นปรับเป็นกรดด้วย HCl ให้มี pH4.5 และไม่ปรับ pH

1.2.3 สัดส่วนของ organic solvent

ทำการเปลี่ยนแปลง organic phase : aqueous phase จากผลการวิจัยข้อ 1.2.1 ในสัดส่วน 25 : 75, 30 : 70, 35 : 65, 40 : 60

1.2.4 อุณหภูมิ

จากผลการวิจัยข้อ 1.2.3 ปรับอุณหภูมิของคอลัมน์ที่ อุณหภูมิห้อง, 35, 40, 45 ^{o}C

1.2.5 ความเข้มข้นของสารละลาย copper (II)sulfate

จากผลการทดลองข้อ 1.2.4 ปรับความเข้มข้นของสารละลาย copper (II) sulfate ใน aqueous phase เป็น 2.5, 1.89, 1.26, 0.63 mM

1.2.6 ปริมาณของ ion pairing agent

จากผลการทดลองข้อ 1.2.5 ปรับปริมาณของ sodium 1-octane sulfonate monohydrate ใน aqueous solvent เป็น 4.5, 4, 3, 0 g/L

สรุปสภาวะที่เหมาะสมต่างๆและกำหนดเป็นวิธีวิเคราะห์ ethambutol โดย HPLC/UV detector จากผลการเปรียบเทียบ chromatogram โดยดูจาก retention time, peak symmetry, peak area

2. Method validation

จากวิธีวิเคราะห์ ethambutol โดย HPLC/UV detector ที่ได้จากข้อ 1.2 ทำการประเมินวิธีวิเคราะห์ในหัวข้อต่างๆดังนี้

2.1 Linearity

เตรียม calibration curve โดยใช้สารละลาย ethambutol ให้มีความเข้มข้น 25.04, 50.08, 100.16, 150.24, 200.32, 250.40, 300.48 µg/mL ความเข้มข้นละ 3 flask นำไปวิเคราะห์ด้วย HPLC/UV ที่กำหนด คำนวณหาความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นและพื้นที่ใต้รูปกราฟ

2.2 Precision

2.2.1 Intraday precision

การตรวจสอบความแม่นยำทำโดย เตรียมสารละลาย ethambutol ให้มีความเข้มข้น 50.08, 100.16, 150.24, 200.32, 250.40 µg/mL ความเข้มข้นละ 6 flask นำไปวิเคราะห์ด้วย HPLC/UV ที่กำหนด จากpeak area ที่ได้ คำนวณหาค่าความเบี่ยงเบน

2.2.2 Interday precision

การตรวจสอบความแม่นยำทำโดย เตรียมสารละลาย ethambutol ให้มีความเข้มข้น 50.08, 100.16, 150.24, 200.32, 250.40 µg/mL ความเข้มข้นละ 1 flask นำไปวิเคราะห์ด้วย HPLC/UV ที่กำหนด ทำการทดลองแบบเดียวกัน 4 วัน จาก peak area ที่ได้ คำนวณหาค่าความเบี่ยงเบน

2.3 Accuracy

การตรวจสอบความถูกต้องทำโดยใช้วิธี standard addition โดยการเติมสารละลายมาตรฐานของ ethambutol ที่ทราบปริมาณที่แน่นอน 4 ความเข้มข้น คือ 50.08, 100.16, 150.24, 200.32 µg/mL ในสารละลายที่มีสารละลายตัวอย่างที่มีปริมาตร ethambutol เท่ากัน คือ 104.04 µg/mL ทำ 3 ซ้ำ นำสารละลายแต่ละflaskไปวิเคราะห์ด้วย HPLC/UV ที่กำหนด จาก peak area ที่ได้ คำนวณหาค่าความเบี่ยงเบน

3. การวิเคราะห์ปริมาณ ethambutol HCl ในตำรับยาเม็ด

3.1 Calibration curve

ใช้ standard calibration curve ของ ethambutol ให้มีความเข้มข้น 50.08 – 250.40 µg/mL วิเคราะห์ด้วยเครื่องHPLC สร้างความสัมพันธ์เชิงเส้นตรงระหว่างความเข้มข้นของ ethambutol กับpeak area

3.2 สารละลายตัวอย่าง

ชั่งยาเม็ด ethambutol HCl 20 เม็ด หาน้ำหนักเฉลี่ย บดให้ละเอียดชั่งผงยาให้มีตัวยา ethambutol HCl 100 mg ละลายน้ำให้ครบ 100 mL กรองสารละลายผ่าน membrane ขนาด 0.45 ไมครอน โดยใช้ vaccuum pump จากนั้น pipet มา 1 mL ลงใน volumetric flask ขนาด 10 mL ปรับปริมาตรด้วยน้ำ

จากสารละลายตัวอย่างที่เตรียมไว้ นำมาวิเคราะห์ด้วยHPLC แล้วนำค่า peak area ที่ได้ มาหาค่าน้ำหนักจาก calibration curve เทียบน้ำหนักของยาเม็ดethambutolที่พบกับน้ำหนักของ standard หาร้อยละของน้ำหนักฉลาก (%labeled amount)

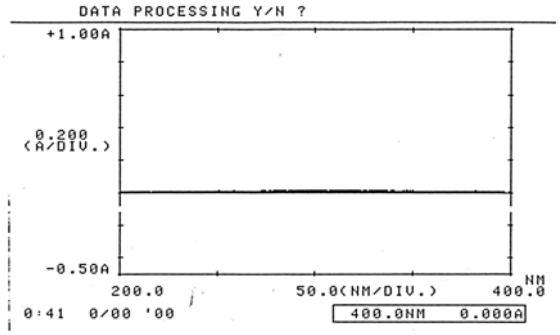
ผลการวิจัย

1. หาสภาวะที่เหมาะสมในการวิเคราะห์ ethambutol HCl ด้วยเครื่อง HPLC โดย UV detector

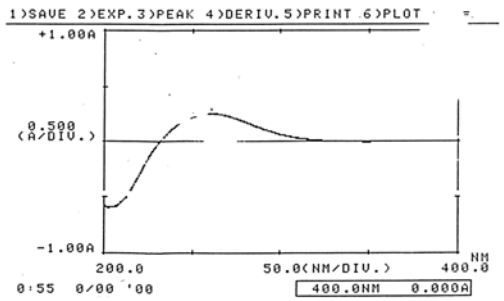
1.1 การทดลองหา pH และ ความยาวคลื่นที่ดูดกลืนสูงสุดในการเกิดปฏิกิริยาระหว่าง ethambutol กับcopper

ผลการเปลี่ยนแปลง pH ของสารละลาย copper sulfateพบว่า ในสารละลายcopper (II)sulfate pH 7 และ pH 10 พบตะกอนขุ่นขาว ไม่สามารถใช้ทำทดลองต่อไปได้ ส่วนสารละลาย copper sulfate pH 4 สังเกตได้สีฟ้าใส จึงใช้ในการทดลองขั้นต่อไป

ผลของการดูดกลืนแสง พบว่า reaction flask ที่มี standard ethambutol และ copper (II) sulfate solution สามารถวัดค่าการดูดกลืนแสงโดยใช้เครื่อง spectrophotometer มี λ_{max} ที่ 260 nm และ reaction flask ที่ไม่ใส่ copper(II) sulfate solution ไม่สามารถวัดค่าการดูดกลืนแสงโดยใช้เครื่อง spectrophotometer ดังแสดงในภาพที่ 2a และ ภาพที่ 2b



รูปที่2a



รูปที่2b

รูปที่2 กราฟแสดงค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่อง spectrophotometer; (2a) reaction flask ที่ไม่มี copper (II) ion; (2b) reaction flask ที่มี copper (II) ion และ ethambutol

1.2 พัฒนาวิธีวิเคราะห์หาปริมาณ ethambutol HCl โดยใช้ HPLC

1.2.1 สภาวะของเฟสเคลื่อนที่

ผลการวิจัยพบว่าเฟสเคลื่อนที่ที่เหมาะสมที่สุด คือ copper(II)sulfate 2.5 mM + sodium 1-octane sulfonate monohydrate 4 g/L ปรับความเป็นกรดด้วย HCl ให้ได้ pH 4.5 ในน้ำ : THF (75 : 25) ได้ผลดัง HPLC chromatogramที่ 1 และผลการทดลองแสดงดังตารางที่ 2

ตารางที่2 ผลการทดลองการปรับเฟสเคลื่อนที่

Mobile phase	Retention time (min)	peak area
copper(II)25 mM in borate buffer: MeOH (70:30)	-*	-
Copper(II)25 mM+ Sodium-1-octane sulfonate monohydrate 4 g/L: acetonitrile (75:25)	-	-
Copper(II)4 mM+ Sodium-1-octane sulfonate monohydrate 4 g/L adjust pH 4.5 with acetic acid : tetrahydrofuran(THF) (75:25)	-	-
Copper(II)2.5 mM+ Sodium-1-octane sulfonate monohydrate 4g/L adjust pH 4.5 with HCl : THF (75:25)	13.789	2,599,185

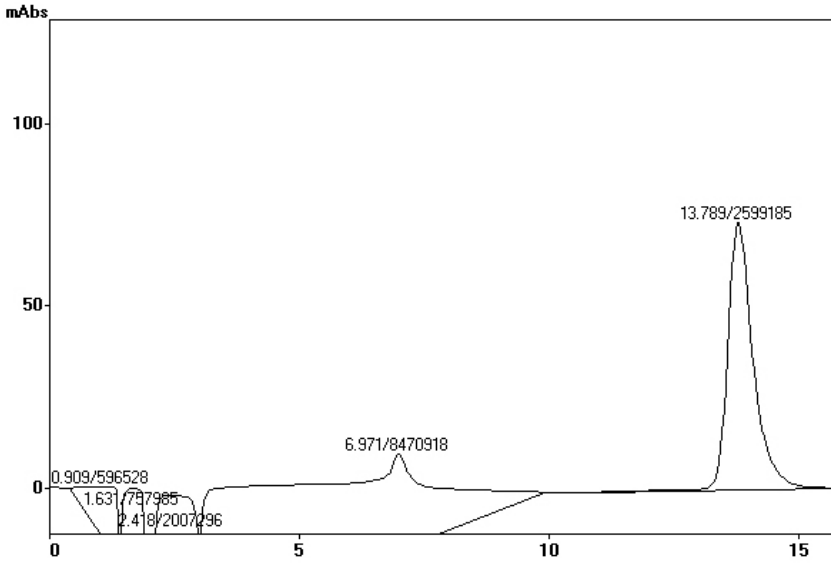
*หมายเหตุ - หมายถึง ไม่ปรากฏผลการทดลอง

1.2.2 pH

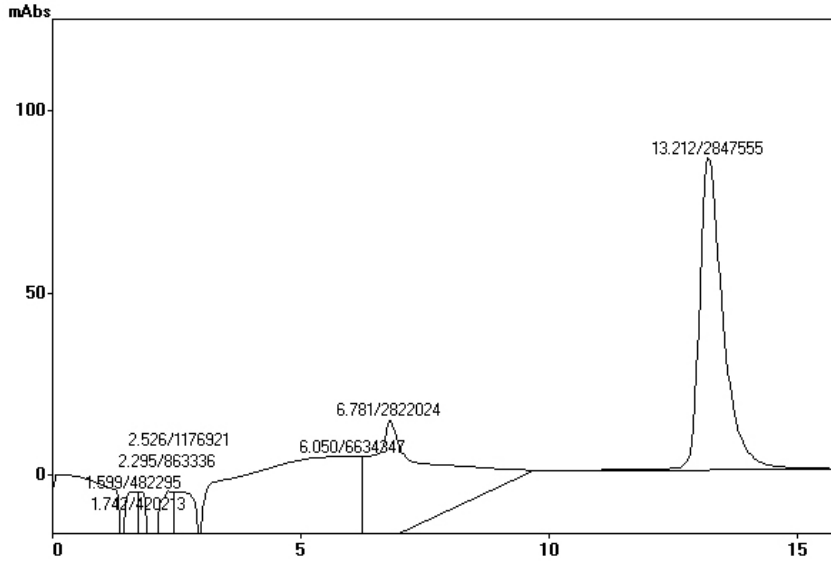
ผลการเปรียบเทียบ HPLC chromatogramที่1 และ รูปที่ 2 พบว่า aqueous phase ที่เหมาะสม คือ copper(II)sulfate 2.5 mM + sodium 1-octane sulfonate monohydrate 4 g/L ในน้ำ ไม่ปรับ pH จะได้ pH 4.7 ผลการทดลองแสดงดังตารางที่ 3และรูปที่3

ตารางที่3 ผลการทดลองการปรับ pH

pH	Retention time(min)	peak area
4.5	13.789	2,599,185
ไม่ปรับpH	13.212	2,847,555



รูปที่3a



รูปที่3b

รูปที่ 3 แสดง chromatogram เปรียบเทียบ pH ของ mobile phase

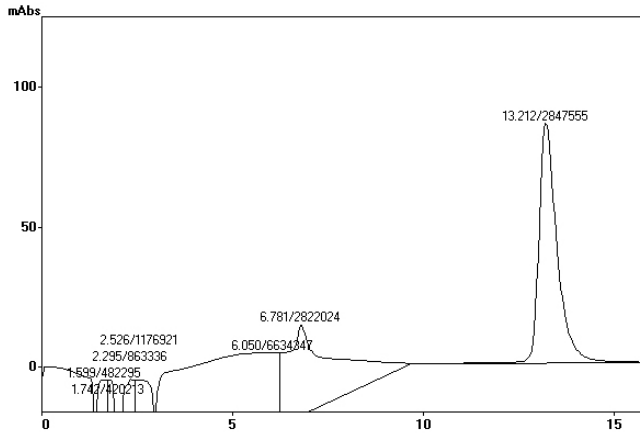
Condition : Copper(II) 2.5 mM + Sodium 1-octane sulfonate monohydrate 4 g/L : THF (75 : 25) at room temperature , flow rate 1.0 ml/min, λ_{max} 260 nm; (3a) ปรับ pH ด้วย HCl ให้มีpH4.5; (3b) ไม่ปรับ pH

1.2.3 สัดส่วนของ organic solvent

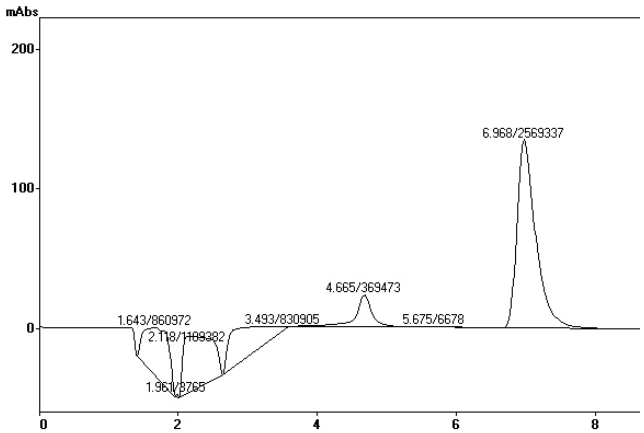
ผลการเปรียบเทียบ HPLC chromatogram พบว่าสัดส่วน organic phase : aqueous phase ที่เหมาะสมในการทดลอง คือ 30 : 70 ผลการทดลองแสดงดังตารางที่4 และรูปที่4

ตารางที่4 ผลการทดลองการปรับสัดส่วนของ organic phase: aqueous phase

Organic phase: aqueous phase	Retention time(min)	Peak area
25:75	13.212	2,847,555
30:70	6.968	2,569,337
35:65	4.059	2,690,738
40:60	2.822	2,438,902

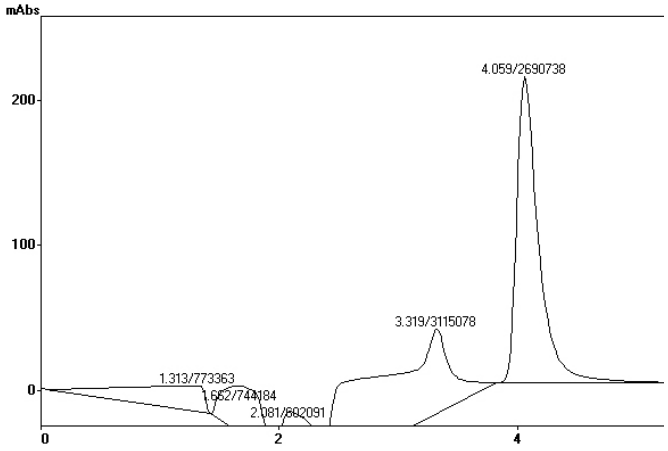


รูปที่ 4a

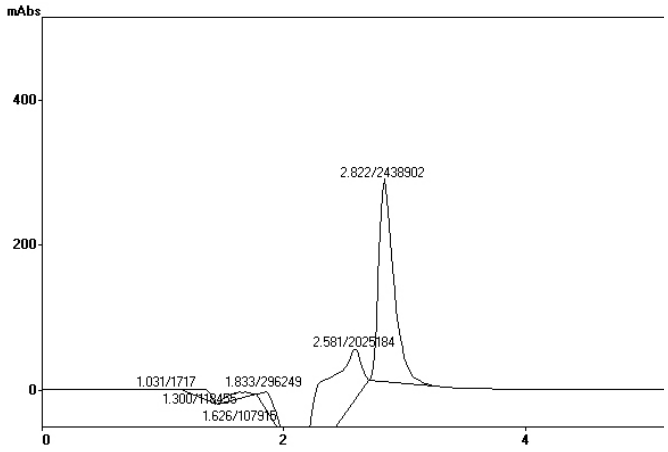


รูปที่ 4b

รูปที่ 4 แสดง chromatogram เปรียบเทียบ สัดส่วนของ organic solvent



รูปที่ 4c



รูปที่ 4d

รูปที่ 4(ต่อ) แสดง chromatogram เปรียบเทียบ สัดส่วนของ organic solvent

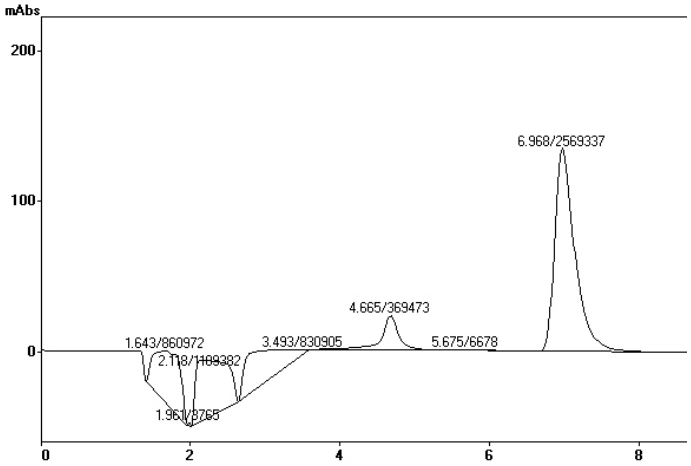
Condition : tetrahydrofuran : distilled water containing 2.5 mM of copper (II) and 3g/L of sodium-1-octane sulfonate monohydrate at room temperature , flow rate 1.0 ml/min, λ_{max} 260 nm; (4a) 25:75 ; (4b) 30:70 (4c) 35:65 (4d) 40:60

1.2.4 อุณหภูมิ

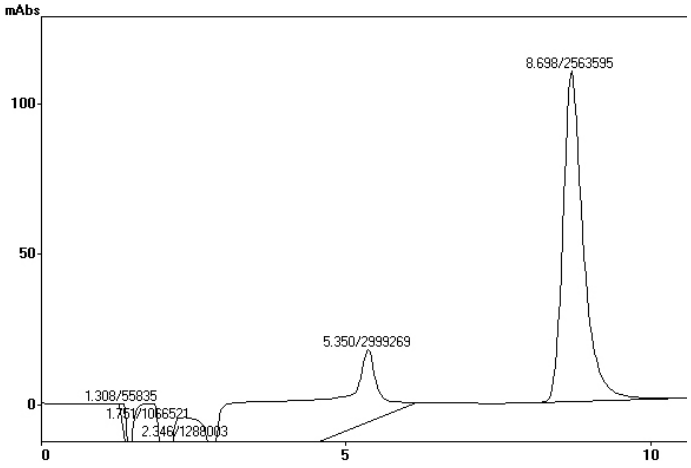
ผลการเปรียบเทียบ HPLC chromatogram พบว่าอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการทดลอง คือ ที่อุณหภูมิห้อง ผลการทดลองแสดงดังตารางที่ 5 และรูปที่ 5

ตารางที่5 ผลการทดลองเมื่อเปลี่ยนแปลงอุณหภูมิ

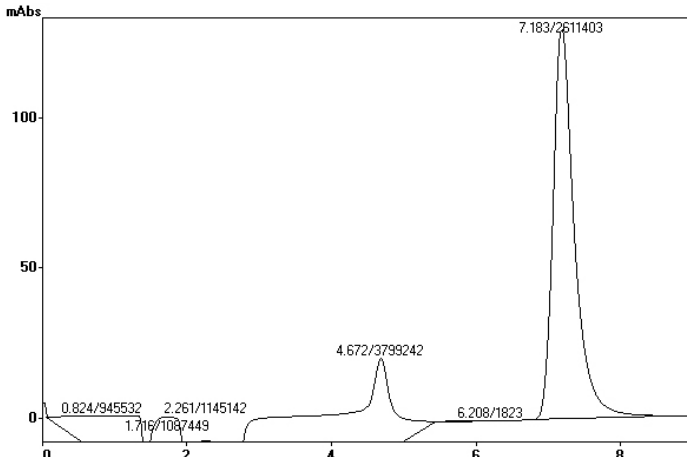
Temperature (องศาเซลเซียส)	Retention time (min)	Peak area
อุณหภูมิห้อง	6.968	2,569,337
35	8.698	2,563,595
40	7.183	2,611,403
45	6.139	2,623,648



รูปที่ 5a

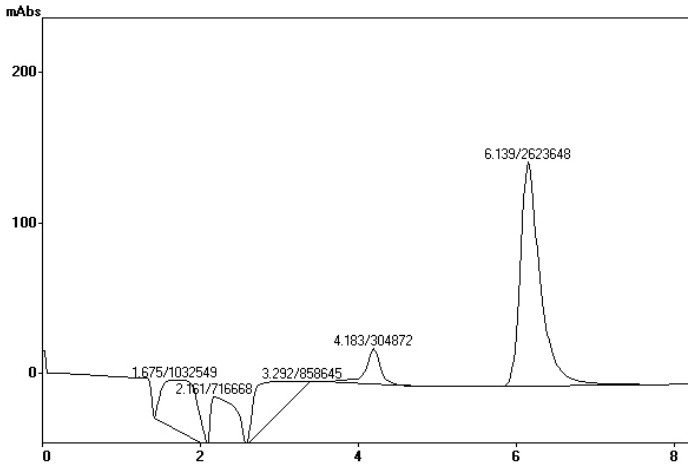


รูปที่ 5b



รูปที่ 5c

รูปที่ 5 แสดง chromatogram เปรียบเทียบผลของ อุณหภูมิ ต่อ retention time และ peak area



รูปที่ 5d

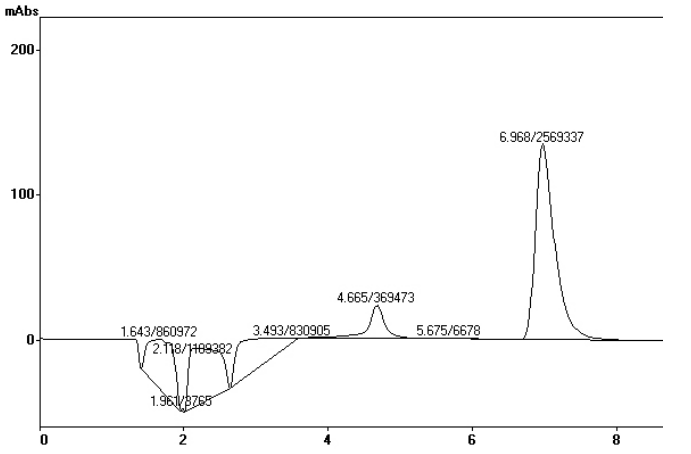
รูปที่ 5(ต่อ) แสดงchromatogramเปรียบเทียบผลของอุณหภูมิต่อ retention timeและ peak area Condition : tetrahydrofuran : distilled water containing 2.5 mM of copper (II) and 4 g/L of sodium-1-octane sulfonate monohydrate (70 : 30), flow rate 1.0 mL/min, λ_{max} 260 nm; (5a) room temperature; (5b) 35^0C; (5c) 40^0C; (5d) 45^0C

1.2.5 ความเข้มข้นของสารละลาย copper (II)sulfate

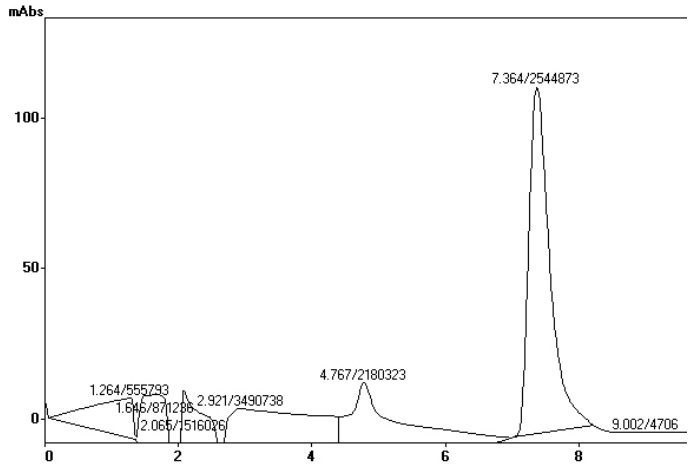
ผลการเปรียบเทียบ HPLC chromatogram พบว่าความเข้มข้นที่เหมาะสมที่สุดของสารละลาย copper (II) sulfate ในการทดลองคือ 2.5mM ผลการทดลองแสดงดังตารางที่6 และรูปที่ 6

ตารางที่6 ผลการทดลองเมื่อปรับความเข้มข้น copper(II) sulfate

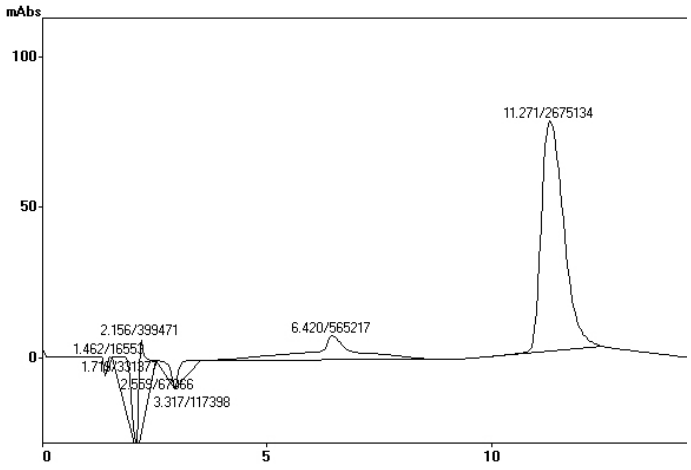
Copper(II) sulfate concentration (mM)	Retention time(min)	Peak area
2.5	6.968	2,569,337
1.89	7.364	2,544,873
1.26	11.271	1,675,134
0.83	10.926	2,930,032



รูปที่ 6a

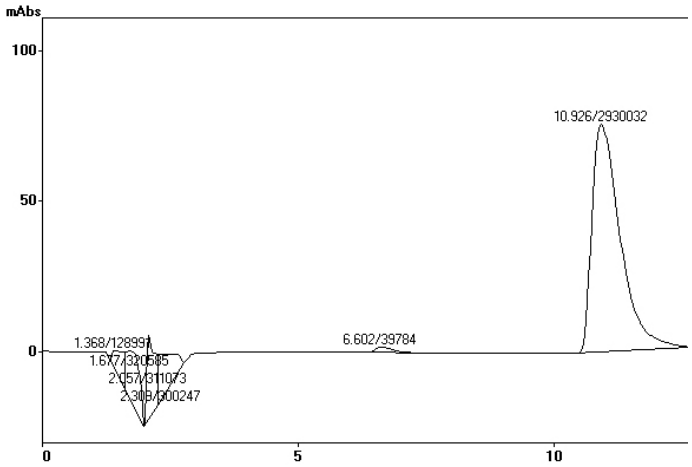


รูปที่ 6b



รูปที่ 6c

รูปที่ 6 แสดง chromatogram เปรียบเทียบ ความเข้มข้น copper(II) sulfate



รูปที่ 6d

รูปที่ 6(ต่อ) แสดง chromatogram เปรียบเทียบ ความเข้มข้น copper(II) sulfate

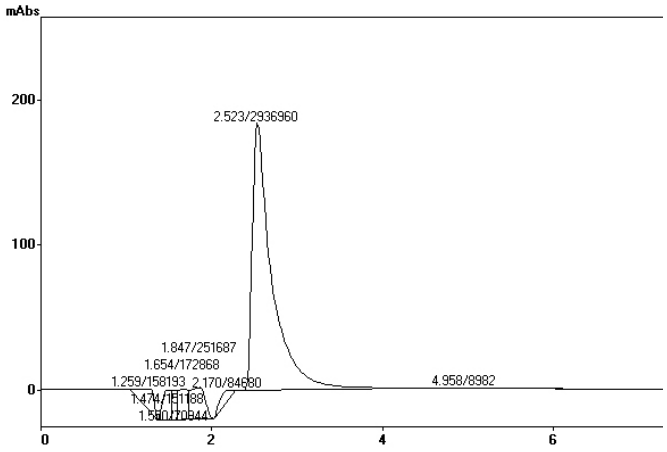
Condition : tetrahydrofuran : distilled water containing copper (II) and 4 g/L of sodium-1-octane sulfonate monohydrate (70 : 30),room temperature, flow rate 1.0 ml/min, λ_{max} 260 nm; (6a) Cu (II) 2.5 mM; (6b)1.89 mM; (6c) 1.26 mM; (6d) 0.83 mM

1.2.6 ปริมาณของ ion pairing agent

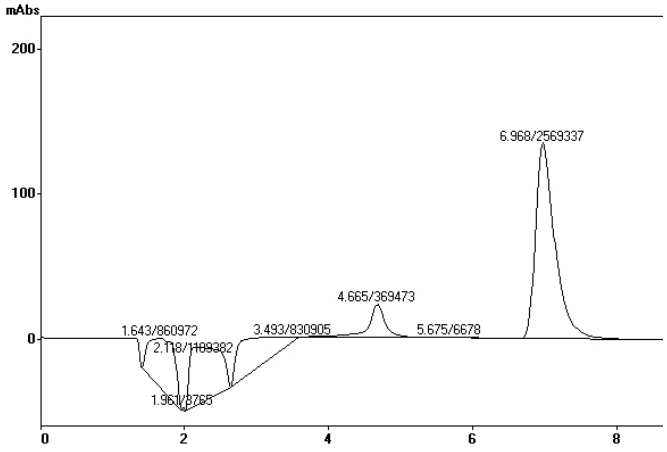
ผลการเปรียบเทียบ HPLC chromatogram พบว่าปริมาณของ sodium-1-octane sulfonate monohydrate ที่เหมาะสมคือ 3 g/L ผลการทดลองแสดงดังตารางที่ 7 และ รูปที่7

ตารางที่7 ผลการทดลองการปรับปริมาณ ion pairing agent

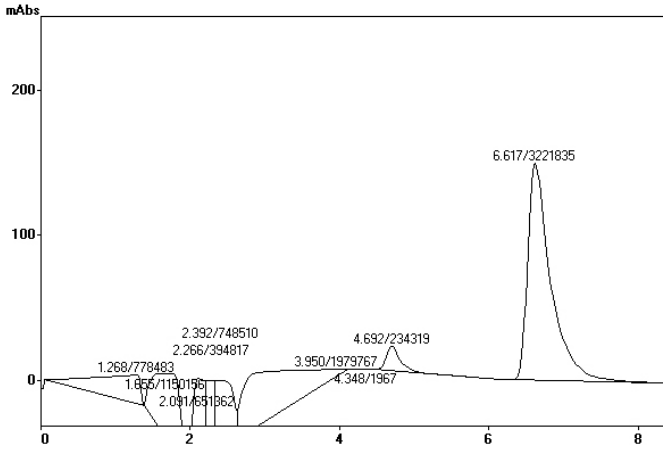
Sodium-1-octane sulfonate monohydrate concentration (g/L)	Retention time (min)	Peak area
0	2.523	2936960
3	6.617	3221835
4	6.968	2569337
4.5	8.035	2370584



รูปที่ 7a

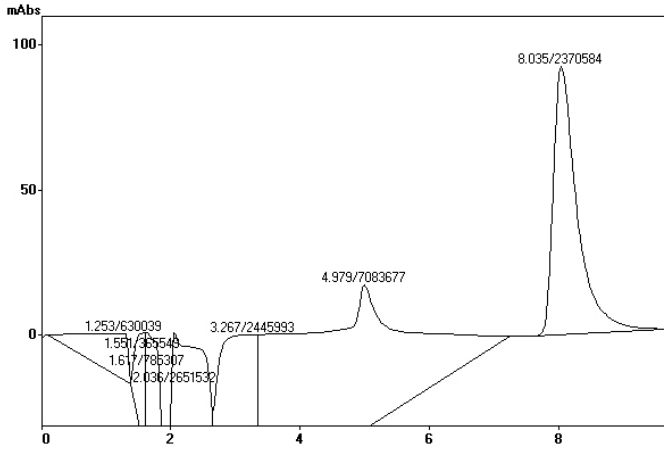


รูปที่ 7b



รูปที่ 7c

รูปที่ 7 แสดง chromatogram เปรียบเทียบปริมาณ ของ ion pairing agent



รูปที่ 7d

<u>รูปที่ 7(ต่อ)</u> แสดง chromatogram เปรียบเทียบปริมาณ ของ ion pairing agent

<u>Condition</u> : tetrahydrofuran : distilled water containing 2.5 mM of copper (II) and sodium-1-octane sulfonate monohydrate (70 : 30),room temperature, flow rate 1.0 mL/min, λ_{max} 260 nm; (7a) sodium-1-octane sulfonate monohydrate 0 g/L;(7b) 3 g/L; (7c) 4 g/L; (7d) 4.5 g/L

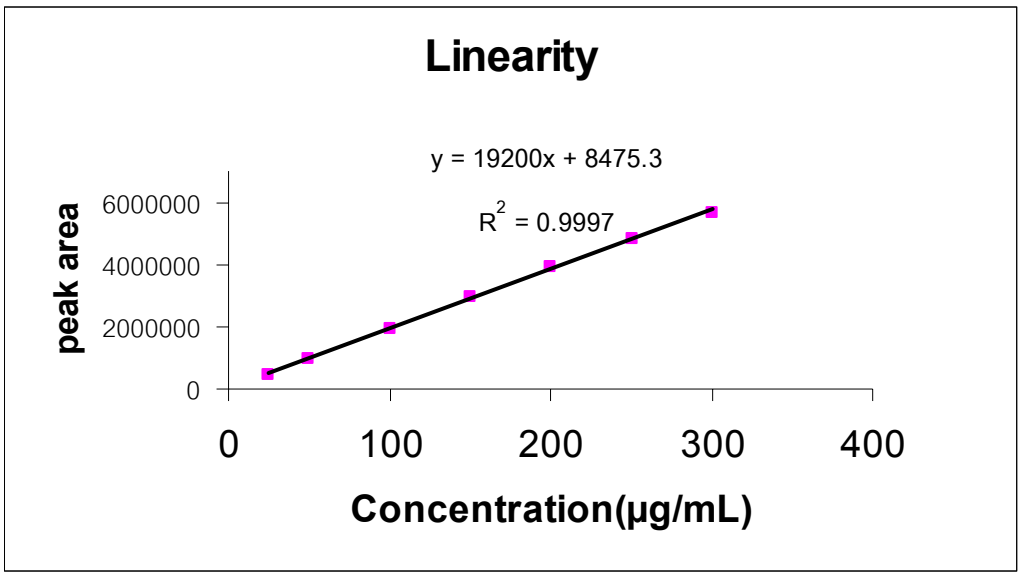
2. Method validation

2.1 Linearity

ค่า peak area ของการวิเคราะห์ ethambutol HCl ด้วย HPLC ที่ความยาวคลื่น 260 นาโนเมตร ในความเข้มข้นระหว่าง25.04-300.48 µg/mL แสดงในตารางที่ 8 ซึ่งให้สมการ linearity y = 19200x + 8475.3 และ r^2=0.9997 ดังรูปที่ 8

<u>ตารางที่8</u> แสดงค่า peak area และความเข้มข้นของ Ethambutolที่ความยาวคลื่น 260 นาโนเมตร

Ethambutol HCl(µg/mL)	peak area (Mean ± SD, n =3)
25.04	475,804± 13,799
50.08	976,092 ± 13,677
100.16	190,6709 ± 12,601
150.24	289,2341 ± 50,858
200.32	3,917,321 ± 28,977
250.40	4,836,508 ± 32,836
300.48	5,727,955 ± 95,208



รูปที่ 8 แสดงสมการเชิงเส้นระหว่างความเข้มข้นของ ethambutol HCl กับ Peak area

2.2 Precision

2.2.1 Intraday precision

จากการทดลองซ้ำ 5 ความเข้มข้น ความเข้มข้นละ 6 ครั้งพบว่า %RSD อยู่ในช่วง0.49-1.65 ดังตารางที่ 9

ตารางที่ 9 แสดงผลการทดลอง intraday precision

Conc. Of standard (µg/mL)	peak area (mean ± SD, n=6)	%RSD
50.08	954710.7 ± 4927.04	0.51
100.16	1816444 ± 23175.13	1.27
150.24	2882107 ± 47545	1.65
200.32	3805498 ± 18833.08	0.49
250.40	4750366 ± 49050.99	1.03

2.2.2 Interday precision

จากการทดลอง 5 ความเข้มข้น ความเข้มข้นละ 1 ครั้งต่อวัน ทำซ้ำในวันที่แตกต่างกัน เป็นเวลา 4 วัน พบว่า%RSD อยู่ในช่วง 0.48-3.14 ดังตารางที่ 10

ตารางที่10 แสดงผลการทดลอง Interday precision

Conc. Of standard (µg/mL)	peak area (average)	SD (n=4)	%RSD
50.08	987570.75	30964.03	3.14
100.16	1925610.25	26813.33	1.39
150.24	2917862.75	14068.93	0.48
200.32	3816477.50	80656.35	2.11
250.40	4872456.75	65199.62	1.34

3.1.3 Accuracy

เมื่อทำการทดลองวิเคราะห์ปริมาณสารมาตรฐาน ethambutol ที่เติมในสารตัวอย่าง (standard addition) 4 ความเข้มข้นโดยทำซ้ำ 3 ครั้ง พบว่า %recovery อยู่ในช่วง 93.63-97.59% ดังแสดงในตารางที่ 11

ตารางที่ 11 แสดงค่า%Recoveryของวิธีการวิเคราะห์ด้วย HPLC

Amount add(µg/mL)	Amount found (µg/ml), n=3	%recovery	Average of %recovery ±SD
50.08	45.88 48.60 47.74	91.62 97.04 95.32	94.66 ± 2.77
100.16	95.15 94.00 92.19	95.00 93.85 92.04	93.63 ± 1.49
150.24	146.85 141.16 151.85	97.75 93.96 101.07	97.59 ± 3.56
200.32	190.76 187.96 189.22	95.22 93.83 94.46	94.51 ± 0.70

3. การวิเคราะห์ปริมาณ ethambutol HCl ในตำรับยาเม็ด

การทดลองวิเคราะห์ ethambutol HCl ในตำรับยาเม็ดโดยวิธี HPLC ทั้งซ้ำ 3ครั้ง ได้ปริมาณยาเป็นร้อยละของฉลากระบุเท่ากับ 101.30, 96.28, 98.71 (ค่าเฉลี่ย ± %SD = 98.76± 2.51) ผลการทดลองแสดงดังตารางที่ 12

ตารางที่12 ผลการทดลองการวิเคราะห์ปริมาณ ethambutol ในตำรับยาเม็ด

ปริมาณตามฉลากระบุ (µg/mL)	ปริมาณที่วิเคราะห์ได้((µg/ml) (n=3)	ร้อยละของน้ำหนักฉลาก (%labeled amount)
1040.44	1053.965	101.30
	1001.684	96.28
	1026.975	98.71
	Average of %labeled amount	98.76
	%RSD	2.54

สูตรในการคำนวณหาปริมาณยา ethambutol HCl ในตำรับยาเม็ดด้วยวิธี HPLC

$$\text{ปริมาณ ethambutol HCl ที่มีในตัวอย่าง (mg)} = \frac{\text{น้ำหนักยาที่ชั่งได้จริง (mg)}}{\text{น้ำหนักยาเฉลี่ย 20 เม็ด (mg) x 4}}$$

$$\text{\% labeled amount} = \frac{\text{ปริมาณ ethambutol HCl ที่วิเคราะห์ได้}}{\text{ปริมาณ ethambutol HCl ที่มีในตัวอย่าง}} \times 100$$

วิจารณ์ผลการวิจัย

1. หาสภาวะที่เหมาะสมในการวิเคราะห์ ethambutol HCl ด้วยเครื่อง HPLC โดย UV detector

1.1 การทดลองหา pH และความยาวคลื่นที่ดูดกลืนสูงสุดในการเกิดปฏิกิริยาระหว่าง ethambutol กับ copper

การเกิดปฏิกิริยาระหว่าง ethambutol กับ โลหะ น่าจะอยู่ในรูป ionized form หรือใน pH ต่ำ ซึ่งจากการทดลองพบว่าสารละลายที่ pH 7 จะมีการตกตะกอนของ copper จึงทำการทดลองในสารละลาย pH ประมาณ 4-4.5 เพราะสารละลาย copper (II) sulfate ในน้ำ มีค่าpH ประมาณ 4-5 และสารละลาย ethambutol-copper complex ในน้ำ ให้การดูดกลืนแสงสูงสุดที่260 nm

การทดลอง พบว่า ethambutol ไม่สามารถดูดกลืนแสงอัลตร้าไวโอเลตได้ เนื่องจากโครงสร้างไม่มี chromophore จำเป็นต้องใช้ divalent cationic metals เพื่อทำปฏิกิริยา เกิด complex ที่มีรูปร่างคงรูป และ อิเล็คตรอนสามารถเคลื่อนที่ได้มากขึ้น เป็นผลให้สามารถดูดกลืนรังสีอัลตร้าไวโอเลต และสามารถวิเคราะห์ได้ด้วย spectrophotometer และ HPLC/UV detector

1.2 พัฒนาวิธีวิเคราะหาปริมาณ ethambutol HCl โดยใช้ HPLC

1.2.1 สภาวะของเฟสเคลื่อนที่

จากผลการทดลอง พบว่า MeOH และ acetonitrile ซึ่งใช้เป็น organic phase ไม่พบpeak ethambutol-copper(II) complex คาดว่าเกิดจากcopper complex จับกับ stationary phaseได้ดีกว่า หรือออกจากคอลัมน์ในรูป free form มากกว่า ethambutol complex เพราะว่า MeOH และ acetonitrile มีขั้วมากเกินไปจึงเปลี่ยนมาใช้ THF ซึ่งสามารถปรากฏ peak ของสารที่ต้องการศึกษา

การใช้ ion pairing agent sodium-1-octane sulfonate monohydrate ใน aqueous phase เพื่อให้ประจุลบของ sulfonate ion จับ ethambutol-copper (II) complex ได้ สารที่มีขั้วลดลง ยับยั้งการจับกับ silanol ในคอลัมน์ จึงทำให้สามารถแยก ethambutol-copper (II) complex ออกจาก column ได้ง่ายขึ้น

1.2.2 pH

จากการเปรียบเทียบผลทดลอง เลือกใช้เฟสเคลื่อนที่ ที่ไม่ปรับ pH เนื่องจากมี chromatogram ไม่แตกต่างจาก เฟสเคลื่อนที่ ที่ปรับ pH ด้วย HCl และ เตรียมได้ง่ายกว่า

1.2.3 สัดส่วนของ organic solvent

จากการเปรียบเทียบผลการทดลอง พบว่าที่สัดส่วนเฟสเคลื่อนที่ 35 : 65 และ 40 : 60 ไม่สามารถแยก peak ของ ethambutol-copper(II) complex ออกจาก solvent front ได้

เลือกสัดส่วน organic phase : aqueous phase ที่ 30 : 70 เนื่องจาก มีค่า retention time, resolution ที่เหมาะสมที่สุด

1.2.4 อุณหภูมิ

จากการเปรียบเทียบผลทดลอง พบว่าอุณหภูมิของคอลัมน์ที่สูงขึ้นทำให้ peak area ของ ethambutol-copper(II) complex มีค่าสูงขึ้น แต่ไม่มากนักเมื่อเปรียบเทียบกับที่อุณหภูมิห้อง

เลือกใช้อุณหภูมิของคอลัมน์ที่ อุณหภูมิห้อง เนื่องจากสามารถทำได้ง่าย และให้ผลไม่แตกต่างการที่อุณหภูมิอื่นๆ ที่ศึกษา

1.2.5 ความเข้มข้นของสารละลาย copper (II) sulfate

จากผลเปรียบเทียบการทดลอง พบว่า copper (II) sulfate ที่ความเข้มข้นน้อยมีผลต่อการเกิด tailing ที่มากกว่าการใช้ copper(II) sulfate ที่ความเข้มข้นสูง จึงเลือกใช้ copper(II) sulfate ความเข้มข้น 2.5 mM ซึ่งเป็นความเข้มข้นสูงสุด ในการทดลอง

1.2.6 ปริมาณของ ion pairing agent

จากผลการทดลอง พบว่าเมื่อไม่ใส่ sodium -1-octane sulfonate monohydrate จะทำให้ peak ของ ethambutol-copper (II) complex มี tailing มากและอยู่ใกล้กับ solvent front มากเกินไป ดังนั้นจึงไม่เหมาะสมในการทดลอง

การใส่Sodium 1-octane sulfonate monohydrate ปริมาณ 4.5, 4 , 3 g/L ให้ peak area และ tailing ของ ethambutol-copper(II) complex ไม่แตกต่างกัน จึงเลือกใช้ปริมาณ 3 g/L เนื่องจาก ใช้ปริมาณของ ion pairing agent น้อยที่สุดในการทดลองนี้

2. การตรวจสอบความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์(Method validation)

2.1 linearity

จากผลการทดลองพบว่าความสัมพันธ์ระหว่างค่า peak area กับความเข้มข้นของ ethambutol มีความสัมพันธ์กันเป็นเส้นตรง ในช่วงความเข้มข้น 25.04-300.48 µg/mL ค่าความสัมพันธ์ (r^2) เท่ากับ 0.9997

2.2 precision

2.2.1 intraday precision

จากผลการทดลอง intraday precision พบว่าวิธีวิเคราะห์นี้มีความแม่นยำซึ่งคำนวณจากร้อยละความเบี่ยงเบนมาตรฐาน ได้ค่าอยู่ในช่วงที่ยอมรับได้ คือ 0.49-1.65

2.2.2 interday precision

จากผลการทดลอง interday precision พบว่าวิธีวิเคราะห์นี้มีความแม่นยำซึ่งคำนวณจากร้อยละความเบี่ยงเบนมาตรฐาน ได้ค่าอยู่ในช่วง คือ 0.48-3.14 ซึ่งค่าความแม่นยำควรจะมีค่าไม่เกิน 2.0 ซึ่งในการทดลองจะมีบางค่าที่สูงไป ดังนั้นจึงควรทำการทดลองซ้ำอีกครั้งเพื่อตรวจสอบความแม่นยำของวิธีการทดลอง

2.3 accuracy

จากผลการทดลอง พบว่าวิธีวิเคราะห์นี้มีความถูกต้อง ซึ่งคำนวณจาก %recovery ได้ค่าที่ยอมรับได้ คือ 93.63-97.59 และมีค่าความเบี่ยงเบนเท่ากับ 0.70-3.56

3. การวิเคราะห์ปริมาณยา ethambutol

เมื่อทำการวิเคราะห์ปริมาณ ethambutol HClโดยวิธี HPLC ในตัวอย่างยาเม็ด พบว่ามีค่าเฉลี่ยของ%labeled amount (±ค่าร้อยละความเบี่ยงเบนมาตรฐาน) เท่ากับ 98.76 (±2.54)

สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ

สรุปผลการวิจัย

1. การปรับสภาวะที่เหมาะสมเพื่อให้อีเทมบูทอลเกิดสารประกอบเชิงซ้อนกับคิวปริกอิออนทำให้พัฒนาเป็นวิธีวิเคราะห์อีเทมบูทอลโดย HPLC/UV detection โดยมีสภาวะที่เหมาะสมได้แก่ tetrahydrofuran : distilled water containing 2.5 mM of copper (II) and 3 g/L of sodium-1-octane sulfonate monohydrate (7 : 3, v/v),room temperature, flow rate 1.0 mL/min, λ_{max} 260 nm

2. เมื่อประเมินวิธีวิเคราะห์พบว่า

2.1 วิธีวิเคราห์นี้มีค่า %RSD ของ intraday precision อยู่ในช่วง 0.49 – 1.65 และ interday precision อยู่ในช่วง 0.48 – 3.14

2.2 วิธีวิเคราะห์นี้มี linearity range อยู่ในช่วง 25.04–300.48 µg/mL (r^2 = 0.9997) เปรียบเทียบการวิจัยหาปริมาณ ethambutol โดยใช้เครื่อง spectrophotometer[10] มี linearity range เท่ากับ221-665 µg/ml พบว่าการวิเคราะห์ที่พัฒนาได้มีความไวและช่วงความเข้มข้นกว้างกว่า

2.3 วิธีวิเคราะห์นี้มีความถูกต้อง(% recovery)อยู่ในช่วง 93.63 – 97.59

2.4 สามารถวิเคราะห์ ethambutol HCl ในเภสัชภัณฑ์โดยใช้ HPLC ได้

3. เมื่อเปรียบเทียบสภาวะในการทดลอง ที่ใช้HPLC/UV[4]

พบว่ามีความแตกต่างที่ปริมาณcopper sulfate และชนิดกับปริมาณ ion pairing agent และวิธีที่พัฒาได้ทำได้สะดวกกว่า เพาะว่าไม่ต้องปรับ pH และทำการทดลองที่อุณหภูมิห้อง (ตารางที่13)

4. วิธีนี้สามารถนำไปประยุกต์ใช้ในการวิเคราะห์หาปริมาณ ethambutol ในยาเม็ดได้

ตารางที่ 13 เปรียบเทียบวิธีวิเคราะห์ ethambutol โดยใช้ HPLC / UV detector

Condition	Developed method	Analytica Chimica Acta 456(2002) 189 – 192
Mobile phase -copper(II) sulfate -ion pairing agent -THF -pH	 2mM 3g/L(octane sulfonate) 30% v/v No adjust	 1mM 4g/L(heptane sulfonate) 30% v/v Adjust to 4.5
column	Reversed phase C18 (hypersil)	Reversed phase C18 (bondapak)
Column temperature	Room temperature	35 ^{0}C

ข้อเสนอแนะ

1. เนื่องจาก $CuSO_4$ ตกตะกอนใน pH ที่เป็นกลางและเบส ดังนั้นควรระวังในขั้นตอนการเตรียมสารเคมี และระหว่างทำการทดลอง

2. ในการทดลองหาค่าความแม่นยำ(precision) มี %RSD บางค่า ที่มีค่ามากกว่า 2.0 ทั้งนี้เนื่องจากระยะเวลาในการทำการทดลองมีจำกัด จึงไม่สามารถทำการทดลองซ้ำหลายๆ ครั้งได้ ดังนั้นควรจะทำการทดลองซ้ำ เพื่อยืนยันผลการทดลอง

3. ในการวิจัย สามารถใช้เครื่อง HPLC ตรวจพบ ethambutol ในปริมาณที่น้อยได้ และมีแนวโน้มที่สามารถนำมา ประยุกต์ใช้ ตรวจ ethambutol ใน biological fluid จึงควรทำการศึกษาค่า limit of detection (LOD) และ limit of quantitative (LOQ) และทดลองตรวจวิเคราะห์ปริมาณ ethambutol ในของเหลวจากร่างกาย (biological fluid)

เอกสารอ้างอิง

1. Brunton LL, Lazo JS, Parker KL, editors. Goodman & Gilman's The Pharmacological Basis of THERAPEUTICS, 11th ed. The United States of America, The McGraw-Hill Companies, 2006.
2. อโนชา อุทัยพัฒน์, นงลักษณ์ สุขวาณิชย์ศิลป์, บรรณาธิการ. เภสัชวิทยา เล่ม 2. พิมพ์ครั้งที่ 2. กรุงเทพฯ. บริษัท นิวไทยมิตรการพิมพ์(1996) จำกัด, 2543.
3. United states Pharmaceutical Convention. The United stated Pharmacopiea 29, The National Formula 24. Webcom Limited, Toronto, Ontario 2005.
4. Jiang Z, Wang H, Locke DC. Determination of ethambutol by ion-pair reversed phase liquid chromatography with UV detection. Analytica Chimica Acta[Online] 2002 Jan 22; 456: [4 screens]. Available from: URL: http://www.elsevier.com/locate/aca
5. Lee CS, Benet LZ. Ethambutol hydrochloride in: Florey K, editor Analytical profiles of drug substances 1977; 7 : 231-249.
6. M. breda, P. Marrari, E. Pianezzola, M. Strolin. Determination of ethambutol in human plasma and urine by high-performance liquid chromatography with fluorescence detection. Journal of chromatography a[Online] 1996 Apr; 1-2: [6 screens]. Available from URL : http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez /query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&list_uids=9004954&dopt=Abstract
7. Lacroix C, Cerutti F, Nouveau J, Menager S and Lafont O. Determination of plasma ethambutol with liquid chromatography and ultraviolet spectrophotometry. Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications volume 415[Online] 1987 Mar 20; 415(1): [10 screens]. Available from: URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/ query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&list_uids=3584365&dopt=Abstract
8. Skoog DA, West DM, Holler FJ, Crouch SR, Analytical chemistry: Introduction. 7th ed. Florida : Saunders college publing, 2000 : 595-601.

9. Mendham J, Denney RC, Barners TD, Vogel TM: Textbook of quantitative chemical analysis. 6th ed. London : Premtice Hall, 2000.
10. จักรพันธุ์ พันธุ์ศรีรัตน์, สาลินี ศิโรดม. การวิเคราะห์เอแธมบูทัลโดยวิธีสเปคโตรโฟโตเมตรี. กรุงเทพฯ. คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล. 2544