**Thesis Title** Development of Micellar Liquid Chromatographic and Capillary Electrophoresis Techniques for Quantitative Analysis of Some Antimicrobial Agents

**Author** Mrs. Piyaporn Srisom

**Degree** Doctor of Philosophy (Pharmacy)

**Thesis Advisory Committee**

| | |
|---|---|
| Assoc. Prof. Dr. Boonsom Liawruangrath | Chairperson |
| Assoc. Prof. Dr. Saisunee Liawruangrath | Member |
| Asst. Prof. Dr. Sunanta Wangkarn | Member |
| Dr. Jonathan M. Slater | Member |

## ABSTRACT

Two environmental friendly analytical methods: micellar liquid chromatographic (MLC) and capillary electrophoresis (CE) with indirect UV detection techniques were developed for the quantitative analysis of some antimicrobial agents in pharmaceutical preparations.

Two MLC procedures were developed and validated for the simultaneous determination of either four penicillins (amoxicillin, ampicillin, cloxacillin and dicloxacillin) or three cephalosporins (cefoxitin, cefazolin and cephalothin). Optimization procedures included studying about the composition of mobile phases, the type and concentration of surfactants (sodium dodecyl sufate, SDS, and cetyltrimethylammonium bromide, CTAB), the type and concentration of organic modifiers (methanol, 1-propanol, 2-propanol, 1-butanol and acetonitrile), the pH of mobile phase, the detection wavelength and flow rate.

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

The first MLC method allowed the determination of four penicillins and used an Ultra C18 column (4.6 mm × 150 mm, 5 μm) at 25 °C with an optimum micellar mobile phase of 25.0 mmol $l^{-1}$ SDS - 2 % (v/v) 1-butanol in phosphate buffer, pH 5.0, at a flow rate of 1.0 ml $min^{-1}$ and detection at 200 nm. The calibration curves for amoxicillin, ampicillin, cloxacillin and dicloxacillin were linear over the ranges of 0.87 - 436, 0.43 - 433, 0.46 - 458 and 0.46 - 368 mg $l^{-1}$, respectively with $r^2$ greater than 0.999. The relative standard deviations were between 0.23 and 1.8 % in the intra-day assay, and between 0.37 and 1.4 % in the inter-day assay. The limits of detection (S/N = 3) of the method were 0.030, 0.072, 0.070 and 0.087 mg $l^{-1}$ for amoxicillin, ampicillin, cloxacillin and dicloxacillin, respectively. The method was successfully applied to the determination of four penicillins in various pharmaceutical formulations.

The three cephalosporins were determined by the second developed MLC method, using an Ultrasphere C18 column (4.6 mm × 150 mm, 5 μm) at 25 °C with an optimum micellar mobile phase of 32.8 mmol $l^{-1}$ SDS in phosphate buffer, pH 2.5, at a flow rate of 2.0 ml $min^{-1}$ and detection at 210 nm. Under the optimum conditions, calibration curves over the ranges of 0.95 - 474, 0.95 - 476 and 0.95 - 473 mg $l^{-1}$ were obtained for cefoxitin, cefazolin and cephalothin, respectively. The relative standard deviations were 0.34 – 1.9 % and 1.6 – 2.1 % in the intra-day and the inter-day assay, respectively. Standard addition recoveries were generally greater than 98.7 %. The limits of detection (S/N = 3) of the method were 0.040, 0.022 and 0.035 mg $l^{-1}$ for cefoxitin, cefazolin and cephalothin, respectively. The proposed method enables the determination of three cephalosporins in pharmaceutical preparations, without using any harmful reagents.

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

A simple and rapid CE method, with indirect UV detection, for the simultaneous determination of neomycin and polymyxin B in pharmaceutical formulations was developed. Critical parameters such as pH, buffer composition and concentration, voltage and injection time were studied to evaluate how they affect responses such as resolution and migration times. Separation was performed on a fused silica capillary with the effective length of 20 cm (50 μm i.d. × 375 μm o.d.), using voltage of 6 kV at a negative polarity with a 15 mmol $l^{-1}$ phosphate run buffer (pH 5.0) containing 40 mmol $l^{-1}$ N-(4-hydroxyphenyl)acetamide and 50 mmol $l^{-1}$ tetradecylammonium bromide (TTAB). The UV detection was employed at 280 nm in the indirect mode. Quantitative analysis was validated by testing the reproducibility of the method, giving a relative standard deviation less than 0.4 % and 2.4 % for the repeatability of migration time and corrected peak area, respectively. Linearity of neomycin sulfate and polymyxin B sulfate were obtained in the ranges of 17 - 682 and 24 - 608 mg $l^{-1}$, respectively with $r^2$ values above 0.999. This method was applied to the determination of neomycin and/or polymyxin B in eye–ear preparations. No interference from excipients, impurities or other active drugs was encountered.

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

**ชื่อเรื่องวิทยานิพนธ์** การพัฒนาเทคนิคโครมาโทกราฟีของเหลวแบบไมเซลล์และคะพิลลารีอิเล็กโทรโฟรีซิสสำหรับการหาปริมาณสารต้านจุลชีพบางตัว

**ผู้เขียน** นางปิยพร ศรีสม

**ปริญญา** วิทยาศาสตรดุษฎีบัณฑิต (เภสัชศาสตร์)

**คณะกรรมการที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์**

| | |
|---|---|
| รศ. ดร. บุญสม เหลี่ยวเรืองรัตน์ | ประธานกรรมการ |
| รศ. ดร. สายสุนีย์ เหลี่ยวเรืองรัตน์ | กรรมการ |
| ผศ. ดร. สุนันทา วังกานต์ | กรรมการ |
| ดร. โจนาธานส์ สเลเตอร์ | กรรมการ |

**บทคัดย่อ**

ได้ทำการพัฒนาวิธีวิเคราะห์ทางเคมีที่เป็นมิตรต่อสิ่งแวดล้อมสองวิธี ประกอบด้วยวิธีโครมาโทกราฟีของเหลวแบบไมเซลล์ (เอ็มแอลซี) และวิธีคะพิลลารีอิเล็กโทรโฟรีซิส (ซีอี)ร่วมกับการตรวจวัดการดูดกลืนแสงยูวีโดยทางอ้อมสำหรับการหาปริมาณสารต้านจุลชีพบางตัวในยาเตรียม

ได้พัฒนาวิธีเอ็มแอลซีสองวิธีสำหรับหาปริมาณเพนนิซิลินพร้อมกันสี่ชนิดได้แก่ อะม็อกซี-ซิลลิน แอมพิซิลลิน คล็อกซาซิลลิน และไดคล็อกซาซิลลิน หรือการหาปริมาณเซฟาโลสปอรินพร้อมกันสามชนิด ได้แก่ เซฟ็อกซิทิน เซฟาโซลิน และเซฟาโลทิน ได้ศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการวิเคราะห์ ได้แก่ การศึกษาองค์ประกอบของเฟสเคลื่อนที่ ชนิดและความเข้มข้นของสารลดแรงตึงผิว (โซเดียมโดเดซิลซัลเฟต หรือเอสดีเอส และเซทิลไตรเมทิลแอมโมเนียมโบรไมด์ หรือซีทีเอบี) ชนิดและความเข้มข้นของสารอินทรีย์ปรับปรุง (เมทานอล 1-โพรพานอล 2-โพรพานอล 1-บิวทานอล และอะซีโทไนไทรล์) พีเอชของเฟสเคลื่อนที่ ความยาวคลื่นที่ใช้ตรวจวัด และอัตรา

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

การไหลของเฟสเคลื่อนที่ พบว่าเพนนิซิลลินสี่ชนิดสามารถหาปริมาณได้โดยวิธีเอ็มแอลซีวิธีแรก ซึ่งใช้คอลัมน์ซี 18 (4.6 มิลลิเมตร × 150 มิลลิเมตร, 5 ไมครอน) ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส และมีเฟสเคลื่อนที่แบบไมเซลล์ที่เหมาะสม คือ สารละลายเอสดีเอส ความเข้มข้น 25.0 มิลลิโมลต่อลิตร-2% (โดยปริมาตร) 1-บิวทานอลในฟอสเฟตบัฟเฟอร์ (พีเอช 5.0) ใช้อัตราการไหลเท่ากับ 1.0 มิลลิลิตรต่อนาที และตรวจวัดการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 200 นาโนเมตร ให้กราฟที่เป็นเส้นตรงตลอดช่วงความเข้มข้น 0.87 - 436, 0.43 - 433, 0.46 - 458 และ 0.46 - 368 มิลลิกรัมต่อลิตร สำหรับอะม็อกซีซิลลิน แอมพิซิลลิน คล็อกซาซิลลิน และไดคล็อกซาซิลลิน ตามลำดับ โดยมีค่า $r^2$ มากกว่า 0.999 ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ในการหาค่าความแม่นยำของวิธีภายในวันเดียวกันอยู่ในช่วง 0.23 - 1.8 เปอร์เซ็นต์ และอยู่ในช่วง 0.37 - 1.4 เปอร์เซ็นต์ สำหรับค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ในการหาค่าความแม่นยำของวิธีระหว่างวัน ขีดจำกัดของการตรวจวัด (เอส/เอ็น = 3) มีค่าเท่ากับ 0.030, 0.072, 0.070 และ 0.087 มิลลิกรัมต่อลิตร สำหรับอะม็อกซีซิลลิน แอมพิซิลลิน คล็อก-ซาซิลลิน และไดคล็อกซาซิลลิน ตามลำดับ เมื่อประยุกต์ใช้วิธีดังกล่าววิเคราะห์ปริมาณเพนนิซิลลินสี่ชนิดในตัวอย่างยาเตรียมตำรับต่าง ๆ พบว่าให้ผลเป็นอย่างดี

สามารถหาปริมาณเซฟาโลสปอรินทั้งสามชนิดพร้อมกันได้โดยวิธีเอ็มแอลซีวิธีที่สองที่ได้พัฒนาขึ้น ซึ่งใช้คอลัมน์ซี 18 (4.6 มิลลิเมตร × 150 มิลลิเมตร, 5 ไมครอน) ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส และมีเฟสเคลื่อนที่แบบไมเซลล์ที่เหมาะสม คือ สารละลายเอสดีเอส ความเข้มข้น 32.8 มิลลิโมลต่อลิตรในฟอสเฟตบัฟเฟอร์ (พีเอช 2.5) ใช้อัตราการไหลเท่ากับ 2.0 มิลลิลิตรต่อนาที และตรวจวัดการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 210 นาโนเมตร พบว่าภายใต้สภาวะที่เหมาะสมได้กราฟมาตรฐานที่เป็นเส้นตรงตลอดช่วงความเข้มข้น 0.95 - 474, 0.95 - 476 และ 0.95 - 473 มิลลิกรัมต่อลิตร สำหรับเซฟ็อกซิทิน เซฟาโซลิน และเซฟาโลทิน ตามลำดับ ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ได้พัฒนาวิธีซีอีที่ง่ายและรวดเร็วร่วมกับการตรวจวัดการดูดกลืนแสงยูวีโดยทางอ้อมสำหรับหาปริมาณนีโอมัยซิน และโพลิมัยซิน บี ในยาเตรียม โดยได้ทำการศึกษาพารามิเตอร์ที่สำคัญ ได้แก่ พีเอช องค์ประกอบ และความเข้มข้นของบัฟเฟอร์ ตลอดจนความต่างศักย์ และเวลาที่ใช้ในการฉีดสาร ทั้งนี้เพื่อประเมินผลกระทบที่มีต่อสัญญาณการตรวจวัด เช่น การแยกสาร และเวลาไมเกรชัน พบว่าสามารถแยกสารได้ด้วยคะพิลลารีความยาวสุทธิ 20 เซนติเมตร (เส้นผ่าศูนย์กลางภายใน 50 ไมครอน × เส้นผ่าศูนย์กลางภายนอก 375 ไมครอน) ความต่างศักย์ -6 กิโลโวลต์ ใช้บัฟเฟอร์ฟอสเฟตความเข้มข้น 15 มิลลิโมลต่อลิตร ที่ประกอบด้วย เอ็น-(4-ไฮดรอกซีเฟนิล)อะเซตาไมด์เข้มข้น 40 มิลลิโมลต่อลิตร และเตตระเดซิลแอมโมเนียมโบรไมด์ (ทีทีเอบี) ความเข้มข้น 50 มิลลิโมลต่อลิตร และตรวจวัดค่าการดูดกลืนแสงยูวีโดยทางอ้อมที่ความยาวคลื่น 280 นาโนเมตร ได้ทำการวาลิเดทวิธีวิเคราะห์โดยทดสอบค่าความแม่นยำของวิธี พบว่าวิธีนี้ให้ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ต่ำกว่า 0.4 และ 2.4 เปอร์เซนต์ สำหรับเวลาไมเกรชัน และพื้นที่ใต้พีคสัมพัทธ์ของสาร ตามลำดับ กราฟมาตรฐานของนีโอมัยซิน และโพลิมัยซิน บีเป็นเส้นตรงตลอดช่วงความเข้มข้น 17 - 682 และ 24 - 608 มิลลิกรัมต่อลิตร ตามลำดับ โดยมีค่า $r^2$ มากกว่า 0.999 วิธีดังกล่าวนี้สามารถนำไปประยุกต์ใช้ในการหาปริมาณนีโอมัยซิน และ/หรือ โพลิมัยซิน บีในตัวอย่างยาหยอดตา-หูได้ผลเป็นอย่างดีโดยปราศจากการรบกวนจากองค์ประกอบอื่น ๆ ในตำรับ

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved