การวิเคราะห์หาปริมาณของอิริโทรมัยซินเบส และเภสัชภัณฑ์ด้วยเทคนิคไฮเพอร์ฟอร์มานซ์ลิควิดโครมาโทกราฟี

นางสาว พรลดา กรอบทอง

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรเภสัชศาสตรมหาบัณฑิต
ภาควิชาเภสัชเคมี
บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
พ.ศ. 2537

ISBN 974-584-130-7

ลิขสิทธิ์ของบัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

I 15852908

High-Performance Liquid Chromatographic Assay of Erythromycin Base and Its Pharmaceutical Dosage Form

Miss Pornlada Krobtong

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements
for the Degree of Master of Science in Pharmacy
Department of Pharmaceutical Chemistry
Graduate School
Chulalongkorn University

1994

ISBN 974-584-130-7

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

หอสมุดกลาง สถาบันวิทยบริการ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

Thesis Title	High-Performance Liquid Chromatographic Assay of Erythromycin Base and Its Pharmaceutical Dosage Form
By	Miss Pornlada Krobtong
Department	Pharmaceutical Chemistry
Thesis Advisor	Assistant Professor Chamnan Patarapanich, Ph.D.
	Associate Professor Suttatip Chantaraskul

Accepted by the Graduate School, Chulalongkorn University in Partial Fulfillment of the Requirements for the Master's Degree,

.....Dean of Graduate School

(Professor Thavorn Vajrabhaya, Ph.D.)

Thesis Committee :

.....Chairman

(Assist. Prof. Somkiat Rujirawat, M.Sc. in Pharm.)

.....Thesis Advisor

(Assist. Prof. Chamnan Patarapanich, Ph.D.)

.....Thesis Coadvisor

(Assoc. Prof. Suttatip Chantaraskul, M.Sc. in Pharm.)

.....Member

(Assoc. Prof. Suwanna Laungchonlatan, M.Sc. in Pharm.)

.....Member

(Assoc. Prof. Vimolmas Lipipun, Ph.D.)

ศูนย์วิทยทรัพยากร จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

หอสมุดกลาง สถาบันวิทยบริการ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

พิมพ์ต้นฉบับบทคัดย่อวิทยานิพนธ์ภายในกรอบสีเขียวนี้เพียงแผ่นเดียว

พรลดา กรอบทอง : การวิเคราะห์หาปริมาณของอิริโทรมัยซินเบส์และเภสัชภัณฑ์ ด้วยเทคนิคไฮเพอร์ฟอร์มานซ์ลิควิดโครมาโทกราฟี (HIGH-PERFORMANCE LIQUID CHROMATOGRAPHIC ASSAY OF ERYTHROMYCIN BASE AND ITS PHARMACEUTICAL DOSAGE FORM). อ.ที่ปรึกษา : ผศ.ดร.ชำนาญ ภัตรพานิช, อ.ที่ปรึกษาร่วม : รศ.สุทธาทิพย์ จันทรสกุล. 88 หน้า. ISBN 974-584-130-7

การพัฒนาวิธีวิเคราะห์หาปริมาณของอิริโทรมัยซินในวัตถุดิบและเภสัชภัณฑ์ด้วยเทคนิคไฮเพอร์ฟอร์มานซ์ลิควิดโครมาโทกราฟี ในการศึกษานี้ได้ศึกษาการแยกและวิเคราะห์ที่เหมาะสม คือใช้คอลัมน์รีเวอร์สเฟส-ฟีนิล (30x0.39 ซม.) ที่อุณหภูมิห้อง โดยใช้สารละลายผสมของ อะซีโตไนไตรล์-เมทานอล-โซเดียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต 0.05 โมลาร์ พีเอช 5.0 ในอัตราส่วน 15:38:47 เป็นโมบายเฟส ด้วยอัตราการไหล 1.0 มล./นาที และใช้เครื่องตรวจวัดอัลตราไวโอเลต ที่ความยาวคลื่น 215 นาโนเมตร โดยใช้กลัยเบนคลาไมด์เป็นสารมาตรฐานอินเทอร์นอล พบว่าสามารถแยกสารประกอบสำคัญ คือ อิริโทรมัยซิน เอ จากสารประกอบอื่น ๆ ได้แก่ อิริโทรมัยซิน บี และ ซี และจากสารสลายตัว ได้แก่ แอนไฮโดรอิริโทรมัยซิน เอ และ อิริโทรมัยซิน เอ อีนอล อีเทอร์ ได้เป็นอย่างดี วิธีนี้ให้ความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นกับค่าอัตราส่วนความสูงของพีคเป็นเส้นตรงในช่วงความเข้มข้นของอิริโทรมัยซิน เอ 0.48-1.28 มก/มล. ความเที่ยงตรงของวิธีวิเคราะห์ของวัตถุดิบและเภสัชภัณฑ์แสดงในรูปของค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ภายในวันเดียวกัน (จำนวนตัวอย่าง=6) มีค่า 0.34 และ 1.21% ตามลำดับ และระหว่างวัน (จำนวน 6 วัน) มีค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ 0.39 และ 1.34% ตามลำดับ ความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์แสดงจากค่าร้อยละของการกลับคืนของอิริโทรมัยซิน เอ เป็น 97.86, 103.1 และ 98.15% โดยมีค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์เป็น 2.13, 4.12 และ 3.51% ตามลำดับ และให้ความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณของอิริโทรมัยซินที่เติมกับปริมาณที่ตรวจพบเป็นเส้นตรงด้วยค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ 0.9997, 0.9983 และ 0.9989 วิธีที่พัฒนาขึ้นนี้พบว่ามีความเฉพาะเจาะจง และค่าต่ำสุดของการตรวจวัดเป็น 9.26 ส่วนในล้านส่วน ปริมาณของอิริโทรมัยซินที่ได้จากการวิเคราะห์โดยวิธีนี้ไม่แตกต่างจากค่าที่ได้จากการวิเคราะห์ทางจุลชีววิทยาอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่น 95% และมีค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ต่ำ วิธีทางโครมาโทกราฟีที่พัฒนาขึ้นนี้ เป็นวิธีวิเคราะห์ที่รวดเร็ว เที่ยงตรง ถูกต้อง มีความเฉพาะเจาะจงและสามารถใช้ในการทดสอบความคงตัวของสารได้

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาควิชา เภสัชเคมี ลายมือชื่อนิสิต .....

สาขาวิชา เภสัชเคมี ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา .....

ปีการศึกษา 2536 ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม .....

##C275259 : MAJOR PHARMACEUTICAL CHEMISTRY
KEY WORD: HIGH-PERFORMANCE LIQUID CHROMATOGRAPHIC ASSAY/ ERYTHROMYCIN BASE
PORNLADA KROBTONG : HIGH-PERFORMANCE LIQUID CHROMATOGRAPHIC ASSAY OF ERYTHROMYCIN BASE AND ITS PHARMACEUTICAL DOSAGE FORM. THESIS ADVISOR : ASSIST. PROF. CHAMNAN PATARAPANICH, Ph.D.; THESIS CO-ADVISOR : ASSOC. PROF. SUTTATIP CHANTARASKUL, M.Sc. in PHARM. 88 pp. ISBN 974-584-130-7

The developed high-performance liquid chromatographic method for the analysis of erythromycin in raw material and pharmaceutical dosage form was performed on a phenyl reversed-phase column (30 x 0.39 cm i.d.) at ambient temperature with acetonitrile-methanol-0.05 M sodium dihydrogen phosphate pH 5.0 (15:38:47), the flow rate was 1.0 ml/min and UV detection was performed at 215 nm. Glibenclamide was used as an internal standard. The main component, erythromycin A, was well separated from its related substances i.e. erythromycin B and C; and degradation products i.e. anhydro-erythromycin A and erythromycin A enol ether. The relationship between concentration and peak height ratio was linear in the range of 0.48-1.28 mg/ml. The intra-day precision (n=6) of raw material and pharmaceutical dosage form expressed as relative standard deviation were 0.34 and 1.21% respectively, and relative standard deviation for inter-day precision (n=6) were 0.39 and 1.34% respectively. The accuracy of method expressed as the recovery of erythromycin A were 97.86, 103.1 and 98.15% with relative standard deviation of 2.13, 4.12 and 3.51% respectively and relationship between the added erythromycin and the erythromycin found was linear with correlation coefficient of 0.9997, 0.9983 and 0.9989. The method was proved to be specific with detection limit of 9.26 ppm. The content of erythromycin in term of erythromycin A which was analysed by HPLC method was not significantly different from those obtained from the official microbiological assay method at 95% confidential limit, and the low relative standard deviation was noted from HPLC method. The developed chromatographic method was rapid, precise, accurate, specific and stability-indicating.

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาควิชา เภสัชเคมี ลายมือชื่อนิสิต .....
สาขาวิชา เภสัชเคมี ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา .....
ปีการศึกษา 2536 ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม .....

พิพิธภัณฑ์ สถาบันวิทยบริการ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ACKNOWLEDGEMENT

The author wishes to express her grateful thanks to her advisor, Assistant Professor Dr. Chamnan Patarapanich and her co-advisor, Associate Professor Suttatip Chantaraskul of the Department of Pharmaceutical Chemistry, Faculty of Pharmaceutical Sciences, Chulalongkorn University for their advice, guidance, encouragement and grateful suggestion throughout this research.

The author would like to express her appreciation to Associate Professor Dr. Vimolmas Lipipun, Department of Microbiology, Faculty of Pharmaceutical Sciences, Chulalongkorn University for her advice, guidance and helpful suggestion on the microbiological assay.

A special appreciation is given to Dr. Krisana Kraisintu of the Government Pharmaceutical Organization and Mrs. Sooksri Ungboriboonpisal of the Department of Medical Sciences for their kindness, advice and encouragement.

The author also wishes to express her gratitude to the staffs of the Department of Pharmaceutical Chemistry and Department of Microbiology for their cooperation on the experiments.

The author wishes to express her appreciation to Abbott Laboratories, IL, USA and The Lilly Laboratories, IN, USA for providing the authentic substances of related substance and degradation products. The appreciation is also given to Abbott Thailand and Lupin Chemicals for supply of raw material.

The author would like to thank to the Graduate School, Chulalongkorn University for granting her partial financial support to conduct this investigation.

Finally, the author thanks her parents for their love and understanding and to all of those who help her making this study a reality.

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

CONTENTS

Page

Thai abstract iv

English abstract v

Acknowledgement vi

List of tables x

List of figures xiii

List of abbreviations xv

Chapter

I Introduction 1

II Experimentation 14

- Instruments and materials 14
- Method 17
  - Development of chromatographic conditions 17
  - Stability of erythromycin solution in optimum mobile phase 18
  - Selection of internal standard 19
  - Developed HPLC method for analysis of erythromycin in raw material and dosage form 19
- Analytical method validation 21
  - Linearity and range 21
  - Precision 22

Page

- Accuracy 22
- Selectivity or specificity 23
- Limit of detection 23
- Quantitative analysis of raw material and tablets by HPLC method 24
- Quantitative analysis of raw material and tablets by microbiological assay 24
- Comparison of quantitative analysis of raw material and tablets by HPLC and microbiological assay 25

III Result and discussion 26

IV Summary 39

References 41

Appendix 47

Vita 88

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

LIST OF TABLES

Table No.		Page
1	Polarities of chemically bonded phases in ascending order	48
2	Effect of mobile phase composition on retention for erythromycin, its related substances and degradation products	49
3	Effect of buffer salts on plate number (N) and tailing factor for erythromycin	50
4	Effect of phosphate buffer concentration on retention for erythromycin, its related substances and degradation products	51
5	Effect of mobile phase pH on retention for erythromycin, its related substances and degradation products	52
6	Stability of erythromycin solution in buffer pH 5.0	53
7	Stability of erythromycin solution in buffer pH 3.0	54
8	Stability of erythromycin solution in buffer pH 4.0	55
9	Stability of erythromycin solution in buffer pH 6.0	56

Table No. Page

10 Stability of erythromycin solution in buffer pH 6.5 57

11 Selection of internal standard 58

12 Samples of raw material and enteric-coated tablets used 60

13 Relationship between concentration and peak height ratio of erythromycin A 61

14 Intra-day precision data of erythromycin raw material 62

15 Inter-day precision data of erythromycin raw material 63

16 Intra-day precision data of erythromycin tablets 64

17 Inter-day precision data of erythromycin tablets 65

18 Precision of recovery of erythromycin from tablets powder spiked with reference standard 66

19 Linearity of recovery of erythromycin from tablets powder spiked with reference standard 67

20 Peak height of erythromycin peak with and without erythromycin B, anhydroerythromycin A and erythromycin A enol ether 69

21 Detection limit of erythromycin 70

22 Quantitative analysis of raw material 71

Table No. Page

23 Quantitative analysis of enteric-coated tablets 72

24 Statistical test of HPLC and microbiological assay 73

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

LIST OF FIGURES

Figure No.		Page
1	Structures of erythromycins	2
2	a. Structure of enol ether b. Structures of spiroketals	4
3	UV absorption spectrum of erythromycin A in mobile phase (1.0 mg/ml)	75
4	Effect of phosphate buffer concentration on capacity factor (k') for erythromycin, its related substances and degradation products ..	76
5	Effect of mobile phase pH on capacity factor (k') for erythromycin, its related substances and degradation products	77
6	Chromatogram of erythromycin, its related substances, degradation products and internal standard	78
7	Stability of erythromycin solution in buffer pH 5.0	79
8	Stability of erythromycin solution in buffer pH 3.0	80
9	Stability of erythromycin solution in buffer pH 4.0	81
10	Stability of erythromycin solution in buffer pH 6.0	82

Figure No. Page

11 Stability of erythromycin solution in buffer pH 6.5 83

12 Relationship between concentration and peak height ratio of erythromycin A 84

13 Chromatograms of erythromycin tablet solution with (a) and without (b) the addition of authentic substances erythromycin B, anhydroerythromycin A and erythromycin A enol ether 85

14 Chromatograms of erythromycin 86

15 Chromatograms of erythromycin raw material solution 87

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

LIST OF ABBREVIATIONS

HPLC	=	high-performance liquid chromatography
i.d.	=	internal diameter
mg	=	milligram
MIC	=	minimum inhibitory concentration
min	=	minute
ml	=	millilitre
nm	=	nanometer
ppm	=	part per million
p.s.i.	=	pounds per square inch
RS	=	reference standard
RSD	=	relative standard deviation
S.D.	=	standard deviation
μm	=	micron
UV	=	ultraviolet

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย