

การวิเคราะห์หาปริมาณน้ำ (Water Determination) ด้วยวิธี Karl Fischer Titration

ภญ. จารุบล ชัยชนะ, ภญ. ปัทมรส แซ่มขมดาว

1. วัตถุประสงค์

เพื่ออธิบายหลักการและแนวทางการวิเคราะห์หาปริมาณน้ำด้วยวิธี Karl Fischer Titration สำหรับห้องปฏิบัติการ

2. บทนำ

การตรวจวิเคราะห์สาร เช่น สารมาตรฐาน หรือวัตถุดิบยา ที่มีการกำหนดมาตรฐานในสถานะแห้งหรือสถานะปราศจากน้ำ (calculated on the anhydrous basis) จำเป็นต้องทราบปริมาณน้ำในสาร การวิเคราะห์ปริมาณน้ำในสาร (water content) ที่ระบุในตำรายาด้วยวิธี Karl Fischer Titration เป็นวิธีที่จำเพาะเจาะจง (specific) เหมาะสำหรับตัวอย่างที่มีปริมาณน้ำสูง วิเคราะห์ปริมาณน้ำได้ตั้งแต่ 0.001 ถึง 100% ส่วนการวิเคราะห์ด้วย coulometric titration เหมาะสำหรับตัวอย่างที่มีปริมาณน้ำน้อย ตั้งแต่ 100 µg ถึง 10 mg

3. หลักการ

Karl Fischer Titration (KF Titration) หรือ Semi-micro determination of water เป็นวิธีมาตรฐานในการวิเคราะห์หาปริมาณน้ำในสารทั้งในและนอกโมเลกุล อาศัยการทำปฏิกิริยาของน้ำในตัวทำละลายแอลกอฮอล์ (R-OH) กับไอโอดีน (I₂), Sulfur dioxide anhydrous solution (SO₂) และเบสเช่น pyridine ซึ่งเป็นส่วนประกอบพื้นฐานของ Karl Fischer reagent ปฏิกิริยาอาจเกิดขึ้นโดยตรง (direct titration) หรือโดยทางอ้อม (back titration) ก็ได้ โดยขณะเกิดปฏิกิริยาต้องมี methanol ปริมาณมากเพียงพอเสมอ

หลักการของปฏิกิริยาดังนี้



4. เครื่องมือ Karl Fischer Titrator และอุปกรณ์

การติดตั้งเครื่องมือ Karl Fischer Titrator ควรติดตั้งในห้องปฏิบัติการที่ควบคุมอุณหภูมิและความชื้น ไม่ควรติดตั้งในห้องที่มีการเปลี่ยนแปลงของอุณหภูมิ ความชื้นสูง และไม่ติดตั้งในตำแหน่งที่ใกล้กับแหล่งความร้อนและแหล่งความเย็น การไทเทรตต้องเป็นระบบปิดและปฏิบัติงานอย่างรวดเร็ว รมัดระวังทุกขั้นตอนเพื่อป้องกันการดูดความชื้นจากอากาศเข้ามาในตัวอย่างและระบบ เครื่องมือ Titrator เป็นการ apply ไฟฟ้ากระแสตรงที่ platinum electrodes ประมาณ 5 - 10 µA แรงดันไฟฟ้า 200 mV ที่จุดสมมูลเมื่อปริมาณน้ำในสารตัวอย่างถูกทำปฏิกิริยาหมดไป ปริมาณ Karl Fischer reagent ที่

เติมเพิ่มลงไปอีกเพียงเล็กน้อยจะทำให้การไหลของกระแสไฟฟ้าเพิ่มขึ้นอยู่ระหว่าง 50 – 150 μ A เป็นเวลา 30 วินาทีถึง 30 นาทีที่ขึ้นกับตัวอย่างที่วิเคราะห์ ผลการวิเคราะห์และ reproducibility ขึ้นกับหลายปัจจัย อาทิ ความเข้มข้นสัมพัทธ์ของ Karl Fischer reagent, ตัวทำละลายที่ใช้ละลายตัวอย่าง และเทคนิคการวิเคราะห์

เครื่องมือและอุปกรณ์

1. Karl Fischer Titration apparatus with automatic Burette
2. Analytical balance (minimum resolution 0.1 mg)
3. Syringe with long, thin needle (microsyringe)
4. Weighing spoon for solid samples with cover
5. A titration vessel with:
 - 2 identical platinum electrodes;
 - Tight inlets for introduction of solvent and titrant;
 - An inlet for introduction of air via a desiccant;
 - A sample inlet fitted with a stopper or, for liquids, a septum
6. Magnetic stirrer

สารเคมี

1. Karl Fischer reagents for volumetric water determination
2. Anhydrous Methanol

5. การเตรียม Karl Fischer (KF) reagent

เติม iodine 125 กรัม ในสารละลายซึ่งประกอบด้วย anhydrous methanol 670 มิลลิลิตรและ pyridine 170 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันและตั้งทิ้งไว้ให้เย็น แช่เย็น pyridine 100 มิลลิลิตรใน graduated cylinder ขนาด 250 มิลลิลิตร ในอ่างน้ำแข็งผ่าน dry sulfur dioxide จนได้ปริมาตร 200 มิลลิลิตร ค่อยๆ เทสารละลายนี้อย่างช้าๆ ลงในสารผสม iodine ที่เย็น เขย่าให้ iodine ละลายจนหมด เทสารละลายที่ได้ใส่ภาชนะป้องกันแสง ตั้งทิ้งไว้ 24 ชั่วโมงก่อน standardization ในช่วงแรกของการเตรียม (freshly prepare) สารละลายนี้ 1 มิลลิลิตรมีค่าสมมูลกับน้ำโดยประมาณ 5 มิลลิกรัมแต่ค่าสมมูลจะลดลงเรื่อยๆ ให้ standardize ก่อนใช้ภายใน 1 ชั่วโมงหรือวันละครั้งกรณีที่มีการใช้งานอย่างต่อเนื่อง โดยบรรจุ KF reagent ในภาชนะป้องกันแสงขณะใช้งาน สภาวะการเก็บรักษา KF reagent ที่เหมาะสมคือเก็บในภาชนะป้องกันแสง ปิดสนิทเพื่อป้องกันความชื้น และเก็บในตู้เย็น

สำหรับการวิเคราะห์น้ำที่มีปริมาณน้อย (trace amount of water: less than 1.0%) ควรใช้ KF reagent ที่มีค่าสมมูลกับน้ำ (water equivalent factor) ไม่เกิน 2 เพราะจะมีการใช้ปริมาตร KF reagent เพิ่มขึ้นและให้ผลวิเคราะห์ที่ถูกต้องอย่างมีนัยสำคัญ

ในอดีต การเตรียม KF reagent ขึ้นใช้เองมีความยุ่งยาก ไม่เป็นที่นิยมกันในทางปฏิบัติและมีการใช้ pyridine ซึ่งเป็นอันตรายกับผู้ใช้งานเนื่องจากเป็นสารก่อมะเร็ง ปัจจุบันมีหลายบริษัทที่ผลิต KF

reagent ที่มีความคงตัวและคุณภาพดีจำหน่าย โดยมีการใช้สารอื่นที่มีความปลอดภัยกว่าได้แก่ imidazole แทน pyridine หรือการใช้ alcohol ชนิดอื่นแทน methanol นอกจากนี้มีการออกแบบเครื่องไทเทรตอัตโนมัติในระบบปิดที่เพิ่มความปลอดภัยต่อผู้ใช้งานและให้ผลวิเคราะห์ที่แม่นยำมากยิ่งขึ้น

6. การหาปริมาณน้ำที่สมมูลกับ Karl Fischer reagent (Standardization of the reagent)

เป็นการหาค่า Water equivalent factor (F) ของ KF reagent วิธีการดังนี้

เติม anhydrous methanol หรือสารละลายที่เหมาะสมลงในภาชนะ titration vessel ให้มีปริมาณมากเพียงพอจนท่วมปลาย platinum electrodes โดยมีแท่งแม่เหล็กกวนอยู่ตลอดเวลา

สารมาตรฐานน้ำที่สามารถใช้สำหรับการ standardization ได้แก่ purified water (water content 100.00%), sodium tartrate dihydrate, USP reference standard หรือ commercial standard with a certificate of analysis traceable to a national standard

ปัจจัยที่ต้องพิจารณาในการ standardization คือ ค่าปริมาณน้ำที่สมมูลกับ KF reagent (The reagent equivalent factor), ปริมาตร titrant ที่ใช้ในการไทเทรต, ขนาด burette, และปริมาณสารมาตรฐานน้ำที่ใช้ ในขั้นตอนการ standardization ค่า water equivalent factor ที่ได้ ต้องไม่น้อยกว่า 80% ของค่าที่ระบุไว้บนฉลาก

การใช้ purified water หรือ water standards เป็นสารมาตรฐานน้ำ

ซึ่ง purified water (ความละเอียดอย่างน้อย 0.1 mg) ให้มีน้ำหนักที่ถูกต้องมีปริมาณน้ำ 2 – 250 mg โดยใช้ microsyringe ใส่อย่างรวดเร็วลงใน titration vessel ที่มีตัวทำละลายในระบบที่ปราศจากน้ำ ไทเทรตด้วย KF reagent จนถึงจุดสมมูล คำนวณปริมาณน้ำที่สมมูลกับ KF reagent (water equivalent factor; F) ดังนี้

$$F = W / V$$

โดย F = water equivalent factor

W = น้ำหนักของน้ำ (mg)

V = ปริมาตรของ KF reagent ที่สมมูลกับปริมาณน้ำ (mL)

7. การตรวจสอบความเหมาะสมของระบบ (Suitability)

การทวนสอบ (verification) เพื่อหาค่าความแม่นยำ (accuracy) โดยการหาค่าร้อยละการคืนกลับ (% recovery) มีวิธีการดังนี้

เตรียม water standard ซึ่งให้มีน้ำหนักที่ถูกต้องอย่างน้อย 3 determinations ไทเทรตด้วย Karl Fischer reagent ในระบบที่มีตัวทำละลายในสถานะที่ปราศจากน้ำ ไทเทรตจนถึงจุดสมมูล คำนวณค่าร้อยละการคืนกลับ (r) ดังนี้

$$r = 100 \times W_2 / W_1$$

โดย r = ร้อยละการคืนกลับ

W₁ = ปริมาณน้ำที่เติม (mg)

W₂ = ปริมาณน้ำที่พบ (mg)

คำนวณค่าเฉลี่ยของค่าร้อยละการคืนกลับ เกณฑ์การยอมรับที่เหมาะสมอยู่ระหว่าง 97.5% และ 102.5%

8. การเตรียมตัวอย่างเพื่อวิเคราะห์

ซึ่งตัวอย่าง (ความละเอียดอย่างน้อย 0.1 mg) โดยคำนวณว่าจะมีน้ำอยู่ประมาณ 2 – 250 mg โดยปริมาณน้อยสุดของตัวอย่างที่ซึ่ง สามารถประมาณได้จากการคำนวณดังนี้

$$FCV / KF$$

โดย F = water equivalent factor (mg/mL)

C = ปริมาตร KF reagent ที่ใช้ คิดเป็น % ของความจุ burette โดยทั่วไปควรมีค่าระหว่าง 30% ถึง 100% สำหรับการไทเทรตด้วยมือ และมีค่าระหว่าง 10% ถึง 100% สำหรับการไทเทรตที่มีการหาค่าสมมูลด้วยเครื่องไทเทรตอัตโนมัติ

V = ปริมาตรความจุ burette (mL)

KF = ข้อกำหนดของปริมาณน้ำในตัวอย่าง (%)

[ข้อแนะนำ: ผลคูณของ FCV ที่สมควรค่ามากกว่าหรือเท่ากับ 200 เพื่อมั่นใจได้ว่า ปริมาณน้ำน้อยที่สุดที่วิเคราะห์ได้นั้นมากกว่าหรือเท่ากับ 2 mg]

การเตรียมตัวอย่างยารูปแบบต่าง ๆ มีดังนี้

- 1) ยาเม็ด ซึ่งผงยา (ซึ่งอย่างละเอียด) ที่บดละเอียดแล้วจากตัวอย่างไม่น้อยกว่า 4 เม็ด ในสภาวะบรรยากาศที่ควบคุมอุณหภูมิและความชื้นไม่ให้เกิดผลกระทบต่อกระบวนการวิเคราะห์
- 2) ยาแคปซูล ใช้ผงยาจากยาแคปซูลไม่น้อยกว่า 4 แคปซูลที่ผสมกันดีแล้ว ซึ่งอย่างละเอียด
- 3) ยาสำหรับฉีดพ่น เก็บตัวอย่างใน freezer เป็นเวลาไม่น้อยกว่า 2 ชั่วโมง นำออกมาและเปิดทันที บีบเปิดออกมา 10.0 มิลลิลิตรของตัวอย่างที่ผสมให้เข้ากันแล้ว นำไปไทเทรตที่อุณหภูมิประมาณ 10°C หรือสูงกว่า
- 4) หากมอโนกราฟระบุว่า เป็นผงยาที่ดูดความชื้นง่าย (hygroscopic) ได้แก่ lyophilized product หรือผงยาที่บรรจุใน vial ให้ระมัดระวังเพื่อป้องกันตัวอย่างดูดความชื้นจากบรรยากาศ ซึ่งตัวอย่างทั้งภาชนะบรรจุอย่างละเอียด ใช้ syringe และเข็มฉีดยาที่แห้ง ดูด anhydrous methanol หรือสารละลายอื่นที่เหมาะสมปริมาตรแน่นอน ฉีดลงไปในภาชนะบรรจุตัวอย่างและเขย่าเพื่อละลายตัวอย่าง ใช้ syringe เดิมดูดสารละลายตัวอย่างออกมาและฉีดลงไปใน titration vessel ในระบบที่ปราศจากน้ำ ล้างภาชนะบรรจุตัวอย่างด้วย anhydrous methanol หรือสารละลายอื่นที่เหมาะสม ปริมาตรแน่นอน ถ้ายรวมในภาชนะ ไทเทรตทันที ทำ blank โดยไทเทรต anhydrous methanol หรือสารละลายอื่นที่เหมาะสม ปริมาตรเท่ากับที่ละลายตัวอย่างและล้างตัวอย่างจนถึงจุดสมมูล นำค่าที่ได้นี้ไปหักออกจากการไทเทรตกับตัวอย่าง อบภาชนะบรรจุตัวอย่างให้แห้งที่ 100°C เป็นเวลา 3 ชั่วโมง ทิ้งให้เย็นใน desiccator และชั่งน้ำหนักภาชนะเปล่า คำนวณหาน้ำหนักของผงยาจากผลต่างของน้ำหนักเริ่มต้นและน้ำหนักของภาชนะเปล่า

9. บทสรุป

Karl Fischer Titration เป็นวิธีมาตรฐานในการวิเคราะห์หาปริมาณน้ำตามข้อกำหนดของตำรายา สามารถวิเคราะห์ปริมาณน้ำทั้งในและนอกโมเลกุลสาร ไทเทรนต์ที่ใช้คือ KF reagent ซึ่งประกอบด้วย สารละลายที่ปราศจากน้ำของ sulfur dioxide และ iodine ที่ละลายอยู่ในส่วนผสมของเบสเช่น pyridine และ methanol KF reagent บรรจุในภาชนะป้องกันแสงและความชื้น ค่าสมมูลหรือ Water equivalent factor (F) ของ KF reagent จะลดลงเรื่อยๆ ต้อง standardize ก่อนการใช้งาน โดยค่าสมมูลที่ได้ไม่ควรน้อยกว่า 80% ของที่ระบุไว้บนฉลาก การทวนสอบเพื่อหาค่าความแม่นยำ โดยการหาค่าร้อยละการคืนกลับเป็นการตรวจสอบความเหมาะสมของระบบไทเทรชัน ปัจจุบันเครื่องมือ KF Titrator ถูกพัฒนาให้เป็นเครื่องไทเทรตแบบอัตโนมัติที่มีประสิทธิภาพสูงขึ้น การไทเทรตเป็นระบบปิด (close system) เพื่อป้องกันน้ำจากบรรยากาศ ห้องปฏิบัติการ ต้องควบคุมอุณหภูมิและความชื้น ปริมาณตัวอย่างที่ใช้วิเคราะห์ การเลือกใช้ KF reagent ที่มีความเข้มข้น สัมพัทธ์ต่างๆ ปริมาตรไทเทรนต์ที่ใช้ และเทคนิค มีผลต่อความถูกต้องของผลการวิเคราะห์และ reproducibility

10. บรรณานุกรม

1. The United States Pharmacopeial Convention. <921> Water Determination. The United States Pharmacopeia – The National Formulary. USP 42 - NF 37. 2019. Baltimore, MD: United Book Press, Inc.; 2019. p. 7092.
2. British Pharmacopoeia Commission. Appendix IX C. Determination of Water. British Pharmacopoeia. 2019. London: The Stationery Office on behalf of the Medicines and Healthcare products Regulatory Agency; 2019. p. V-A335.
3. European Directorate for the Quality of Medicines & HealthCare. PA/PH/OMCL (07) 108 R6 – OMCL Guideline on automatic titrators (Annex 5) [Internet]. 2016 [cited 2019 November 1]. Available from: https://www.edqm.eu/sites/default/files/medias/fichiers/OMCL/Quality_Management_Documents/omcl_qualification_of_equipment_annex_5_qualification_of_automatic_titrators_august_2016.pdf
4. Mettler Toledo. Karl Fischer Titration for Water Determination [Internet]. 2562 [cited 2019 November 2]. Available from: https://www.mt.com/th/th/home/library/know-how/lab-analytical-instruments/moisture_determination_by_karl_fischer.html