การวิเคราะห์ทรามาดอลไฮโดรคลอไรด์และพาราเซตามอลพร้อมกันในยาเม็ดโดยแคปปิลารีอิเล็กโทรโฟรีซิส

Simultaneous Analysis of Tramadol Hydrochloride and Paracetamol in Tablets by Capillary Electrophoresis

สมศักดิ์ ศิริไชย[1] และ ขจัดภัย ทิพยผ่อง[2]
Somsak Sirichai[1] and Khajadpai Thipyapong[2]

Received: June 4, 2021
Revised July 20, 2021
Accepted August 2, 2021

บทคัดย่อ

งานวิจัยนี้ได้พัฒนาวิธีแคปปิลารีอิเล็กโทรโฟรีซิสสำหรับการวิเคราะห์ทรามาดอลไฮโดรคลอไรด์และพาราเซตามอลพร้อมกันในตัวอย่างยาเม็ด สภาวะที่เหมาะสมสำหรับการแยก คือ ความยาวของแคปปิลารี 32 เซนติเมตร บอเรตบัฟเฟอร์ความเข้มข้น 10 มิลลิโมลาร์ (pH 9.5) ศักย์ไฟฟ้าที่ใช้แยก 12 กิโลโวลต์ และฉีดสารที่ความดัน 50 มิลลิบาร์ เป็นเวลา 3 วินาที ตรวจวัดสารที่ความยาวคลื่น 215 นาโนเมตร ภายใต้สภาวะที่เหมาะสม การวิเคราะห์สามารถทำได้น้อยกว่า 2 นาที ไมเกรชันไทม์ของทรามาดอลไฮโดรคลอไรด์และพาราเซตามอลคือ 1.161 และ 1.615 นาที ตามลำดับ กราฟมาตรฐานเป็นเส้นตรงในช่วง 5.0-100.0 มิลลิกรัมต่อลิตร ด้วยค่า R2 มากกว่า 0.9996 ขีดจำกัดการตรวจวัดของทรามาดอลไฮโดรคลอไรด์และพาราเซตามอลเท่ากับ 1.05 และ 0.60 มิลลิกรัมต่อลิตร ตามลำดับ ขีดจำกัดการวิเคราะห์ปริมาณของทรามาดอลไฮโดรคลอไรด์และพาราเซตามอลเท่ากับ 3.50 และ 2.00 มิลลิกรัมต่อลิตร ตามลำดับ ร้อยละการได้กลับคืนอยู่ในช่วงร้อยละ 96.2-101.3 วิธีที่พัฒนานี้สามารถนำไปประยุกต์ใช้วิเคราะห์ ทรามาดอลไฮโดรคลอไรด์และพาราเซตามอลพร้อมกันในยาเม็ด

คำสำคัญ: แคปปิลารีอิเล็กโทรโฟรีซิส ทรามาดอลไฮโดรคลอไรด์ พาราเซตามอล การวิเคราะห์พร้อมกัน

[1]ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา
Assistant Professor, Department of Chemistry, Faculty of Science, Burapha University
E-Mail: sirichai@go.buu.ac.th
[2]ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา
Assistant Professor, Department of Chemistry, Faculty of Science, Burapha University
E-Mail: khajadpa@go.buu.ac.th

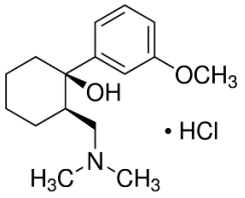
Abstract

In this paper, capillary electrophoresis method for simultaneous analysis of tramadol hydrochloride and paracetamol in tablets was developed. Optimal conditions for separation were capillary length of 32 cm, borate buffer of 10 mM (pH 9.5), applied voltage of 12 kV and injection at 50 mbar for 3 sec. Detection wavelength was set at 215 nm. Under the optimal conditions, the analysis was carried out in less than 2 min. Migration times of tramadol hydrochloride and paracetamol were 1.161 and 1.615 min, respectively. Calibration curves were linear over the concentration range 5.0-100.0 mg/L with R2 greater than 0.9996. Limits of detection for tramadol hydrochloride and paracetamol were 1.05 and 0.60 mg/L, respectively. Limits of quantitation for tramadol hydrochloride and paracetamol were 3.50 and 2.00 mg/L, respectively. Percent recoveries were in range 96.2-101.3%. The developed method could be applied to the simultaneous analysis of tramadol hydrochloride and paracetamol in tablets.

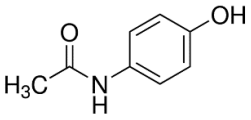
Keywords: Capillary electrophoresis, Tramadol hydrochloride, Paracetamol, Simultaneous analysis

1. บทนำ

อะเซตามิโนเฟน (Acetaminophen) ซึ่งรู้จักกันดีในชื่อพาราเซตามอล (Paracetamol) เป็นยาแก้ปวดที่นิยมใช้กันอย่างแพร่หลายในประเทศไทยเนื่องจากประชาชนสามารถหาซื้อพาราเซตามอลได้ตามร้านขายยาทั่วไปรวมไปถึงร้านสะดวกซื้อต่าง ๆ ไม่จำเป็นต้องมีใบสั่งแพทย์ ประกอบกับพาราเซตามอลมีราคาถูกและมีผลข้างเคียงของการใช้ยาน้อย ประชาชนใช้พาราเซตามอลสำหรับบรรเทาอาการปวด เช่น ปวดหัว และปวดกล้ามเนื้อ การระงับปวดของพาราเซตามอลทำโดยการยับยั้งการสร้างโพรสตาแกลนดิน (Prostaglandin) ซึ่งสารนี้เป็นตัวการของอาการปวด [1] ส่วนทรามาดอลไฮโดรคลอไรด์ (Tramadol Hydrochloride) เป็นยาแก้ปวดสังเคราะห์ในกลุ่มโอปิออยด์ (Opioid) ใช้บรรเทาอาการปวดระดับปานกลางถึงระดับรุนแรง อย่างไรก็ตามการรับประทานยาทรามาดอลไฮโดรคลอไรด์อย่างต่อเนื่องหรือในปริมาณมากเกินไปอาจทำให้เกิดการติดยาได้ [2] ปัจจุบันมีการผลิตยาที่มีองค์ประกอบของพาราเซตามอลและทรามาดอลไฮโดรคลอไรด์เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพลดอาการปวดในระดับปานกลางถึงรุนแรงและมีความปลอดภัยมากขึ้น [3] ดังนั้นจึงจำเป็นต้องมีวิธีวิเคราะห์สำหรับหาปริมาณพาราเซตามอลและทรามาดอลไฮโดรคลอไรด์พร้อมกันเพื่อควบคุมคุณภาพของยา โครงสร้างของพาราเซตามอลและทรามาดอลไฮโดรคลอไรด์แสดงดังรูปที่ 1



ทรามาดอลไฮโดรคลอไรด์



พาราเซตามอล

รูปที่ 1 โครงสร้างของทรามาดอลไฮโดรคลอไรด์และพาราเซตามอล

ปัจจุบันได้มีการรายงานเกี่ยวกับการวิเคราะห์ทรามาดอลไฮโดรคลอไรด์และพาราเซตามอลพร้อมกันหลายวิธี ได้แก่ แก๊สโครมาโทกราฟี (Gas Chromatography, GC) [4-5] โครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง (High Performance Liquid Chromatography, HPLC) [6-8] แคปปิลารีอิเล็กโทรโฟรีซิส (Capillary Eectrophoresis, CE) [9] และสเปกโทรโฟโตเมทรี (Spectrophotometry) [10-12] ซึ่งการวิเคราะห์โดยใช้วิธีแคปปิลารีอิเล็กโทรโฟรีซิสมีข้อดีหลายประการ เช่น ให้การแยกดี มีความเฉพาะเจาะจง ความแม่นและความเที่ยงสูง โดยเฉพาะอย่างยิ่งในเทอมความเป็นมิตรกับสิ่งแวดล้อม เนื่องจากการวิเคราะห์ด้วยวิธีแคปปิลารีอิเล็กโทรโฟรีซิสใช้ปริมาณสารตัวอย่างและสารเคมีต่าง ๆ น้อยเมื่อเทียบกับวิธีอื่น ๆ

แคปปิลารีอิเล็กโทรโฟรีซิสเป็นเทคนิคการแยกสารด้วยสนามไฟฟ้า หลักการแยกคืออาศัยความแตกต่างของความสามารถสารที่เคลื่อนภายใต้สนามไฟฟ้า การแยกเกิดขึ้นในแคปปิลารีซึ่งทำจากฟิวส์ซิลิกา (Fused Silica) ที่ภายในบรรจุด้วยสารละลายบัฟเฟอร์หรือสารละลายอิเล็กโทรไลต์ ความเร็วในการเคลื่อนที่ของสารภายใต้อิทธิพลของสนามไฟฟ้าขึ้นกับอัตราส่วนของมวลต่อประจุ (Mass-to-Charge Ratio) สารประจุบวกเคลื่อนที่ด้วยความเร็วสูงสุดไปยังขั้วแคโทด (ขั้วลบ) ซึ่งเป็นผลมาจากการไหลของอิเล็กโทรออสโมติก (Electroosmotic Flow) และแรงดึงดูดจากขั้วแคโทด สารที่เป็นกลางเคลื่อนที่ด้วยความเร็วเท่ากับความเร็วการไหลของอิเล็กโทรออสโมติก สำหรับสารที่มีประจุลบเคลื่อนที่ด้วยความเร็วต่ำสุด เนื่องจากมีแรงดึงดูดจากขั้วแอโนด (ขั้วบวก) ในทิศทางตรงข้ามกับการไหลของอิเล็กโทรออสโมติก การเคลื่อนที่ของสารภายใต้อิทธิพลของสนามไฟฟ้าขึ้นกับหลายปัจจัย เช่น ขนาดและประจุของสาร การแตกตัวเป็นไอออน ความหนืด อุณหภูมิ และศักย์ไฟฟ้า อย่างไรก็ตามตัวแปรที่เลือกมาศึกษาในงานวิจัยนี้ได้แก่ pH ของสารละลายบัฟเฟอร์ ความเข้มข้นของสารละลายบัฟเฟอร์ และศักย์ไฟฟ้าที่ใช้ในการแยก เนื่องจากเป็นตัวแปรที่สำคัญในการแยกด้วยวิธีแคปปิลารีอิเล็กโทรโฟรีซิส

2. วัตถุประสงค์

เพื่อพัฒนาเทคนิคแคปปิลารีอิเล็กโทรโฟรีซิสที่มีสภาพไว รวดเร็วและน่าเชื่อถือสำหรับวิเคราะห์ทรามาดอลไฮโดรคลอไรด์และพาราเซตามอลพร้อมกันในตัวอย่างยาเม็ด

3. วิธีดำเนินการวิจัย

เริ่มจากการศึกษาสภาวะที่เหมาะสม (Optimization) ในการแยกสารที่ต้องการวิเคราะห์ (Analytes) ทั้งสอง (ทรามาดอลไฮโดรคลอไรด์และพาราเซตามอล) โดยตัวแปรที่เลือกมาศึกษาในงานวิจัยนี้ ได้แก่ pH ของสารละลายบอเรตบัฟเฟอร์ (pH 8.5, 9.0 และ 9.5) ความเข้มข้นของสารละลายบอเรตบัฟเฟอร์ (5 และ 10 มิลลิโมลาร์) และศักย์ไฟฟ้าที่ใช้ในการแยก (10, 12 และ 14 กิโลโวลต์) แล้วทำการตรวจสอบความใช้ได้ของวิธี (Method Validation) และยืนยันความใช้ได้ของวิธีที่นำเสนอกับตัวอย่างยาเม็ดที่มีองค์ประกอบของทรามาดอลไฮโดรคลอไรด์และพาราเซตามอล

3.1 สารเคมีและสารละลาย

สารมาตรฐานทรามาดอลไฮโดรคลอไรด์ความบริสุทธิ์มากกว่า 98% จากบริษัท Sigma-Aldrich ประเทศสหรัฐอเมริกา สารมาตรฐานพาราเซตามอล ความบริสุทธิ์มากกว่า 98% จากบริษัท Tokyo Chemical Industry ประเทศญี่ปุ่น โซเดียมเตตระบอเรตเดคะไฮเดรตและโซเดียมไฮดรอกไซด์จากบริษัท Merck ประเทศเยอรมัน น้ำปราศจากไอออน 18 Mohm จากเครื่อง E-Pure Deionization System ของบริษัท Barnstead ประเทศเยอรมัน ใช้สำหรับเตรียมสารละลายทุกชนิด เครื่องวัด pH รุ่น ϕ 32 ของบริษัท Beckman ประเทศสหรัฐอเมริกา

สารละลายมาตรฐานเข้มข้น (Stock Standard Solution) ของทรามาดอลไฮโดรคลอไรด์และพาราเซตามอลเตรียมในน้ำปราศจากไอออนโดยเตรียมแยกกันเพื่อให้ได้ความเข้มข้นของพาราเซตามอล 500 มิลลิกรัมต่อลิตร และทรามาดอลไฮโดรคลอไรด์ 500 มิลลิกรัมต่อลิตร และเก็บในตู้เย็นที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส สารละลายมาตรฐานผสมของพาราเซตามอลและทรามาดอลไฮโดรคลอไรด์ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ เตรียมโดยการปิเปตปริมาตรที่เหมาะสมของแต่ละสารละลายมาตรฐานเข้มข้นลงในขวดวัดปริมาตรขนาด 10 มิลลิลิตร จากนั้นเจือจางด้วยน้ำปราศจากไอออน สารละลายที่ได้กรองผ่านไนลอนเมมเบรนขนาด 0.45 ไมครอน ก่อนนำไปวิเคราะห์ด้วยเครื่องแคปปิลารีอิเล็กโทรโฟรีซิส

3.2 เครื่องมือ

การวิเคราะห์ทรามาดอลไฮโดรคลอไรด์และพาราเซตามอลใช้เครื่องแคปปิลารีอิเล็กโทรโฟรีซิส รุ่น G1600AX ของบริษัท Agilent ประเทศเยอรมัน ตัวตรวจวัดชนิดไดโอดอาเรย์ (Diode Array Detector) ฟิวซ์ซิลิกาแคปปิลารี (ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางภายใน 100 ไมครอน และยาว 32 เซนติเมตร) จากบริษัท Polymicro Technology ประเทศสหรัฐอเมริกา ความยาวคลื่นสำหรับการตรวจวัดคือ 215 นาโนเมตร การฉีดสารเข้าสู่แคปปิลารีทำในโหมดความดัน โดยใช้ความดัน 50 มิลลิบาร์ เป็นเวลา 3 วินาที เมื่อเริ่มการทดลองแต่ละวัน มีการปรับสภาพผิวด้านในของแคปปิลารีด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ 0.1 โมลาร์ เป็นเวลา 10 นาที และสารละลายบอเรตบัฟเฟอร์ที่ใช้เป็นเวลา 5 นาที ระหว่างการวัดแต่ละครั้ง ปรับสภาพผิวด้านในของแคปปิลารีด้วยสารละลายบัฟเฟอร์เป็นเวลา 1 นาที การบันทึกและประมวลผลอิเล็กโทรเฟอโรแกรมใช้โปรแกรม ChemStation ของบริษัท Agilent ประเทศเยอรมัน

3.3 การเตรียมสารละลายตัวอย่าง

นำตัวอย่างยาเม็ดยี่ห้ออูลตราเซท (Ultracet) ของบริษัท Janssen ที่ระบุว่ามีปริมาณของพาราเซตามอล 325 มิลลิกรัม และ ทรามาดอลไฮโดรคลอไรด์ 37.5 มิลลิกรัมต่อเม็ด จำนวน 10 เม็ด มาบดให้ละเอียด จากนั้นชั่งตัวอย่างยาซึ่งบดเรียบร้อยแล้วให้ได้ปริมาณยาพาราเซตามอล 325 มิลลิกรัม และ ทรามาดอล 37.5 มิลลิกรัม ละลายด้วยอะซิโตไนไตรล์ จากนั้นเทสารละลายที่ได้ลงในขวดวัดปริมาตรขนาด 100 มิลลิลิตร เจือจางด้วยอะซิโตไนไตรล์ นำไปสกัดด้วยเครื่องอัลตรา โซนิค (Ultra Sonicator) เป็นเวลา 20 นาที ปั่นเหวี่ยง 10 นาที กรองด้วยเยื่อกรอง (Membrane Filter) ขนาด 0.45 ไมครอน และเจือจาง จากนั้นนำสารละลายที่ได้ไปวิเคราะห์ด้วยเครื่องแคปปิลารีอิเล็กโทรโฟรีซิสภายใต้สภาวะที่เหมาะสม

3.4 การตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์

วิธีแคปปิลารีอิเล็กโทรโฟรีซิสที่พัฒนาขึ้นสำหรับวิเคราะห์ทรามาดอลไฮโดรคลอไรด์และพาราเซตามอลพร้อมกันในยาเม็ด ได้ตรวจสอบความใช้ได้ของวิธี ในเทอมของความเป็นเส้นตรงของกราฟมาตรฐาน (linearity of Calibration Curve) ขีดจำกัดของการตรวจวัด (Limit of Detection, LOD) ขีดจำกัดการหาปริมาณ (Limit of Quantitation, LOQ) ความแม่น (Accuracy) และความเที่ยง (Precision) ภายใต้สภาวะที่เหมาะสม

การศึกษาความเป็นเส้นตรงของกราฟมาตรฐาน (5.0–100.0 มิลลิกรัมต่อลิตร) ทำโดยการเตรียมสารละลายมาตรฐานผสมที่ความเข้มข้นต่าง ๆ ของทรามาดอลไฮโดรคลอไรด์และพาราเซตามอลโดยการเจือจางจากสารละลายมาตรฐานเข้มข้น LOD และLOQ หาโดยการเจือจางสารละลายมาตรฐานจนได้อัตราส่วนสัญญาณของสารละลายมาตรฐานต่อสัญญาณรบกวน (Signal-to-Noise Ratio, S/N) เท่ากับ 3 และ 10 ตามลำดับ

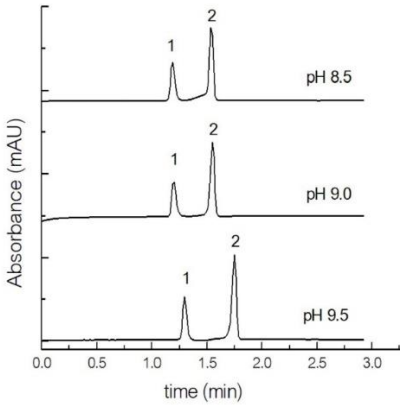
ความเที่ยงของวิธีวิเคราะห์บอกถึงความสามารถในการทำซ้ำแล้วได้ค่าใกล้เคียงค่าเดิมแสดงในเทอมของร้อยละค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ (Percent Relative Standard Deviation, %RSD) ความเที่ยงภายในวันและความเที่ยงระหว่างวันทำโดยการวิเคราะห์ความเข้มข้นของทรามาดอลไฮโดรคลอไรด์และพาราเซตามอลที่ความเข้มข้น 3 ระดับ (10.0, 30.0 และ 60.0 มิลลิกรัมต่อลิตร) ทำซ้ำความเข้มข้นละ 5 ครั้ง ผลของการศึกษาความเที่ยงแสดงในตารางที่ 2 ความแม่นของวิธีแสดงในเทอมของร้อยละการได้กลับคืน (Percent Recovery) โดยศึกษาที่ 3 ระดับความเข้มข้นเช่นเดียวกับความเที่ยง

4. ผลและอภิปรายผลการวิจัย

4.1 การศึกษาผลของ pH ของบัฟเฟอร์ต่อการแยกสารที่สนใจ

pH ของบัฟเฟอร์เป็นตัวแปรที่สำคัญสำหรับการวิเคราะห์โดยวิธีแคปปิลารีอิเล็กโทรโฟรีซิส เนื่องจากค่า pH ของบัฟเฟอร์มีผลกระทบต่อประจุที่ผิวด้านในของแคปปิลารี อิเล็กโทรออสโมติกโฟลว์ (Electroosmotic Flow, EOF) และประจุของสารที่วิเคราะห์ เมื่อพิจารณาค่า pKa ของทรามาดอลไฮโดรคลอไรด์ (9.41) และพาราเซตามอล (9.5) สารทั้งสองชนิดนี้สามารถแยกได้ในสารละลายบัฟเฟอร์ที่เป็นเบส ดังนั้นในการทดลอง

เบื้องต้น จึงทำการศึกษา pH ที่ 8.5, 9.0 และ 9.5 โดยใช้บอเรตบัฟเฟอร์ความเข้มข้น 5.0 มิลลิโมลาร์ ผลการทดลองแสดงดังรูปที่ 2 จากผลการทดลองเห็นได้ว่า เมื่อค่า pH ของบอเรตบัฟเฟอร์เพิ่มขึ้น ส่งผลทำให้ค่าไมเกรชันไทม์ (Migration Time) ของสารแต่ละชนิดเพิ่มขึ้น เนื่องจากประจุรวมบนสารที่ต้องการวิเคราะห์อัตราส่วนประจุต่อมวล (Mass-to-Charge Ratio) ขึ้นกับค่า pH ของบัฟเฟอร์ นอกจากนี้ยังพบว่าทุกค่า pH ของบัฟเฟอร์ที่ศึกษา ทรามาดอลไฮโดรคลอไรด์และพาราเซตามอลแยกกันอย่างสมบูรณ์ด้วยค่าการแยก (Resolution) มากกว่า 1.5 รูปร่างพีกดีขึ้นและสภาพไวของการวิเคราะห์โดยเฉพาะอย่างยิ่งพีกของพาราเซตามอลเพิ่มขึ้นเมื่อ pH เพิ่มขึ้น ดังนั้น จึงเลือกบอเรตบัฟเฟอร์ที่ pH 9.5 เป็นสภาวะที่เหมาะสมและใช้เป็นการศึกษาต่อไป



รูปที่ 2 ผลของ pH ของบัฟเฟอร์ที่ความเข้มข้น 5.0 มิลลิโมลาร์ต่ออิเล็กโทรเฟอโรแกรมของสารละลายมาตรฐานผสมของทรามาดอลไฮโดรคลอไรด์ (20 มิลลิกรัมต่อลิตร) และพาราเซตามอล (20 มิลลิกรัมต่อลิตร) ศักย์ไฟฟ้าที่ใช้แยกคือ 10 กิโลโวลต์ พีก 1 คือทรามาดอลไฮโดรคลอไรด์ พีก 2 คือพาราเซตามอล

4.2 การศึกษาผลของความเข้มข้นของบัฟเฟอร์ต่อการแยกสารที่สนใจ

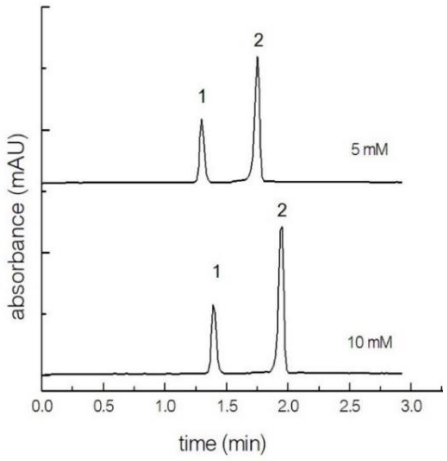
การศึกษาผลของความเข้มข้นของบัฟเฟอร์ต่อค่าไมเกรชันไทม์และการแยกทรามาดอลไฮโดรคลอไรด์และพาราเซตามอล เลือกศึกษาที่บอเรตบัฟเฟอร์ (pH 9.5) ความเข้มข้น 5 และ 10 มิลลิโมลาร์ ผลการทดลองแสดงดังรูปที่ 3 พบว่า เมื่อความเข้มข้นของบอเรตบัฟเฟอร์เพิ่มขึ้น ค่าไมเกรชันไทม์และค่าการแยกเพิ่มขึ้น เนื่องจากการเพิ่มความเข้มข้นของบัฟเฟอร์เป็นการเพิ่มความหนืดของบัฟเฟอร์ นอกจากนี้ยังพบว่าค่าสภาพไวของการวิเคราะห์เพิ่มขึ้นเมื่อความเข้มข้นของบัฟเฟอร์มากขึ้น พิจารณาในเทอมค่าสภาพไวและเวลาในการวิเคราะห์ จึงเลือกความเข้มข้นของบอเรตบัฟเฟอร์ที่ 10 มิลลิโมลาร์เป็นสภาวะที่เหมาะสมและใช้ในการศึกษาต่อไป

4.3 การศึกษาผลของศักย์ไฟฟ้าต่อการแยกสารที่สนใจ

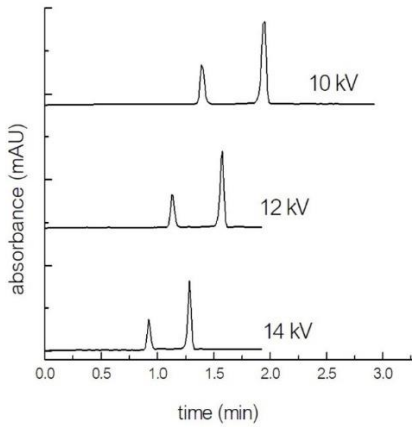
การศึกษาผลของศักย์ไฟฟ้าต่อการแยกสารที่สนใจ ทำที่ศักย์ไฟฟ้า 10, 12 และ 14 กิโลโวลต์ ผลการทดลองแสดงดังรูปที่ 4 ผลการทดลองแสดงให้เห็นว่า การเพิ่มค่าศักย์ไฟฟ้าที่ใช้แยก ส่งผลทำให้ค่าไมเกรชันไทม์ของสารและค่าการแยกลดลง เนื่องจากความเร็วในการเคลื่อนที่ของสารภายใต้สนามไฟฟ้าเป็นปฏิภาคโดยตรงกับความแรงของสนามไฟฟ้า การแยกทรามาดอลไฮโดรคลอไรด์และพาราเซตามอลเกิดอย่างสมบูรณ์ที่ทุกค่าศักย์ไฟฟ้าที่ศึกษา อย่างไรก็ตาม ในระหว่างการศึกษาพบว่า ที่ศักย์ไฟฟ้า 14 กิโลโวลต์ เกิดความไม่เสถียร

ของกระแสบ่อยครั้ง ซึ่งอาจเนื่องจากกระแสที่เกิดขึ้นระหว่างการแยกสาร ส่งผลทำให้เกิดความร้อนและเกิดฟองอากาศขึ้น

จากการศึกษาหาสภาวะที่เหมาะสมในการวิเคราะห์ทรามาดอลไฮโดรคลอไรด์และพาราเซตามอลโดยเทคนิคแคปปิลารีอิเล็กโทรโฟรีซิส พบว่าสภาวะที่เหมาะสม คือ บอเรตบัฟเฟอร์ความเข้มข้น 10 มิลลิโมลาร์ (pH 9.5) ศักย์ไฟฟ้าที่ใช้แยก 12 กิโลโวลต์ ฉีดสารที่ความดัน 50 มิลลิบาร์ เป็นเวลา 3 วินาที ตรวจวัดสารที่ความยาวคลื่น 215 นาโนเมตร ภายใต้สภาวะที่เหมาะสม ไมเกรชันไทม์ของทรามาดอลไฮโดรคลอไรด์และพาราเซตามอลคือ 1.161 และ 1.615 นาที ตามลำดับ เมื่อเปรียบเทียบสภาพไวของการวิเคราะห์สารที่ต้องการวิเคราะห์ทั้งสองชนิดภายใต้สภาวะที่เหมาะสม พบว่าวิธีที่พัฒนาขึ้นมานี้มีสภาพไวมากกว่าวิธีที่ได้มีการรายงานมาก่อนหน้านี้ [9]



รูปที่ 3 ผลของความเข้มข้นของบัฟเฟอร์ต่ออิเล็กโทรเฟอโรแกรมของสารละลายมาตรฐานผสมของทรามาดอลไฮโดรคลอไรด์ (20 มิลลิกรัมต่อลิตร) และพาราเซตามอล (20 มิลลิกรัมต่อลิตร) ศักย์ไฟฟ้าที่ใช้แยกคือ 10 กิโลโวลต์ พีก 1 คือทรามาดอลไฮโดรคลอไรด์ พีก 2 คือพาราเซตามอล



รูปที่ 4 ผลของศักย์ไฟฟ้าที่ใช้แยกต่ออิเล็กโทรเฟอโรแกรมของสารละลายมาตรฐานผสมของทรามาดอลไฮโดรคลอไรด์ (20 มิลลิกรัมต่อลิตร) และพาราเซตามอล (20 มิลลิกรัมต่อลิตร) พีก 1 คือทรามาดอลไฮโดรคลอไรด์ พีก 2 คือพาราเซตามอล

4.4 การตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์

การตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีเป็นกระบวนการยืนยันความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์ที่แสดงให้เห็นว่าวิธีการวิเคราะห์ที่พัฒนาขึ้นมานั้นให้ผลถูกต้องแม่นยำตามวัตถุประสงค์เพื่อนำไปใช้ในงานวิเคราะห์ได้อย่างน่าเชื่อถือ ผลการศึกษาความเป็นเส้นตรงของกราฟมาตรฐาน สมการเส้นตรงของกราฟมาตรฐาน LOD และ LOQ ของทรามาดอลไฮโดรคลอไรด์และพาราเซตามอลสรุปดังตารางที่ 1 ความเที่ยงของวิธีวิเคราะห์แสดงในตารางที่ 2 และความแม่นของวิธีแสดงในเทอมของร้อยละการได้กลับคืน (Percent Recovery) พบว่าร้อยละการได้กลับคืนของทรามาดอลไฮโดรคลอไรด์และพาราเซตามอลอยู่ในช่วงร้อยละ 98.7-101.3 และ 96.2-99.9 ตามลำดับ

ตารางที่ 1 สมการกราฟมาตรฐาน R2 LOD และ LOQ ของทรามาดอลไฮโดรคลอไรด์และพาราเซตามอล

สาร	สมการเส้นตรงของกราฟมาตรฐาน	R^2	LOD (มิลลิกรัมต่อลิตร)	LOQ (มิลลิกรัมต่อลิตร)
ทรามาดอลไฮโดรคลอไรด์	y = 1.0823x + 0.236	0.9997	1.05	3.50
พาราเซตามอล	y = 2.4876x + 0.701	0.9996	0.60	2.00

ตารางที่ 2 ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ (%RSD) ของพื้นที่พีกภายในวันเดียวกันและระหว่างวันของทรามาดอลไฮโดรคลอไรด์และพาราเซตามอล

สาร	ความเข้มข้น (มิลลิกรัมต่อลิตร)	% RSD ภายในวันเดียวกัน	% RSD ระหว่างวัน
ทรามาดอลไฮโดรคลอไรด์	10.0	1.8	2.2
	30.0	2.0	2.7
	60.0	1.7	2.9
พาราเซตามอล	10.0	1.5	3.0
	30.0	1.8	2.8
	60.0	1.9	2.6

4.5 การยืนยันความใช้ได้ของวิธี

เมื่อนำวิธีแคปิลารีอิเล็กโทรโฟรีซิสที่พัฒนาขึ้นมาวิเคราะห์ทรามาดอลไฮโดรคลอไรด์และพาราเซตามอลในตัวอย่างยาเม็ดซึ่งฉลากบนกล่องระบุปริมาณของทรามาดอลไฮโดรคลอไรด์และพาราเซตามอล 37.5 และ 325 มิลลิกรัมต่อเม็ด ตามลำดับ ด้วยวิธีการวิเคราะห์ภายใต้สภาวะที่เหมาะสมที่ศึกษาได้ คือ บอเรตบัฟเฟอร์ความเข้มข้น 10 มิลลิโมลาร์ (pH 9.5) ศักย์ไฟฟ้า 12 กิโลโวลต์ ฉีดสารที่ความดัน 50 มิลลิบาร์เป็นเวลา 3 วินาที ตรวจวัดสารที่ความยาวคลื่น 215 นาโนเมตร ผลการวิเคราะห์พบปริมาณของทรามาดอลไฮโดรคลอไรด์ 37.3 ± 0.3 มิลลิกรัมต่อเม็ด และพาราเซตามอล 324.6 ± 0.5 มิลลิกรัมต่อเม็ด ผลที่ได้มีค่าใกล้เคียงกับปริมาณที่รายงานไว้ในตัวอย่างยาเม็ดที่มีขายอยู่ในท้องตลาด

5. สรุปผลการวิจัย

งานวิจัยนี้ได้วิธีวิเคราะห์ปริมาณทรามาดอลไฮโดรคลอไรด์และพาราเซตามอลพร้อมกันที่มีความไวสูงขึ้น โดยการวิเคราะห์สารประกอบทั้งสองพร้อมกันสามารถทำได้ง่าย รวดเร็ว มีความเฉพาะเจาะจง ความแม่นและความเที่ยงดี และเป็นมิตรกับสิ่งแวดล้อม ภายใต้สภาวะที่เหมาะสม การวิเคราะห์สามารถทำได้ภายใน 2 นาที และวิธีการที่ได้สามารถนำไปใช้ในการควบคุมคุณภาพของยาสำหรับงานประจำได้

กิตติกรรมประกาศ

คณะผู้วิจัยขอขอบคุณภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา ที่สนับสนุนทุนวิจัยและห้องปฏิบัติการวิจัย

เอกสารอ้างอิง

[1] Schildknecht, S., Daiber, A., Ghisla, S., Cohen, R. A., & Bachschmid, M. M. (2008). Acetaminophen inhibits prostanoid synthesis by scavenging the PGHS-activator peroxynitrite. *The FASEB Journal*, *22*, 215-224.

[2] RajaSekhar, K. K., Shankarananth, V., SreenvisaCharan, A., NagaMallika, L., Narmada, D., & Padmavathamma, M. (2011). Kinetic spectrophotometric estimation of tramadol hydrochloride in bulk, tablet and capsule dosage forms. *Journal of Pharmacy Research*, *4(10)*, 3842-3844.

[3] McClellan, K., & Scott, L. J. (2003). Tramadol/paracetamol. *Drugs, 63(11)*, 1079-1086.

[4] Belal, T., Awad, T., & Clark, C. R. (2009). Determination of paracetamol and tramadol hydrochloride in pharmaceutical mixture using HPLC and GC-MS. *Journal of Chromatographic Science, 47*, 849-854.

[5] Sha, Y. F., Shen, S., & Duan, G. L. (2005). Rapid determination of tramadol in human plasma by headspace solid-phase microextraction and capillary gas chromatography-mass spectrometry. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, *37*, 143-147.

[6] Hemant, K. T., Krishna, P. C. K., Varaprasad, R. K., & Srinivasa, R. Y. (2019). RP-HPLC method for estimation of tramadol hydrochloride and paracetamol in pharmaceutical formulation. *GSC Biological and Pharmaceutical Sciences*, *8*(1), 89-97.

[7] Swamy, D. K., Sirisha, K., Dhanuja, G., & Adukondalu, D. (2018). New RP-HPLC method for the simultaneous estimation of paracetamol and tramadol hydrochloride in bulk and tablet dosage form. *International Research Journal of Pharmacy*, *9*(6), 82-86.

[8] Thomas, S. P., & Poomali, A. (2016). Development and validation of RP-HPLC method for simultaneous estimation of paracetamol and tramadol hydrochloride. *Indian Journal of Pharmacy and Pharmacology*, *3*(4), 169-172.

[9] Ciurba, A., Hancu, G., Cojocea, L.-M., Sipos, E., & Todoran, N. (2014). Development of new formulation and its evaluation by capillary electrophoresis of tables containing tramadol hydrochloride and paracetamol. *Pharmaceutical Development and Technology, 19(7)*, 833-838.

[10] Zarei, A. R., Mardi, K., & Chalavi, S. (2013). Simultaneous spectrophotometric determination of tramadol and acetaminophen in pharmaceutical formulations using H-point standard addition method. *Jordan Journal of Pharmaceutical Sciences*, *6*, 48-55.

[11] Shukla, R., Shivkumar, R., & Shivan, K. N. (2011). Development of UV-spectrophotometric method for the simultaneous determination of tramadol hydrochloride and paracetamol in bulk and marketed product. *Bulletin of Pharmaceutical Research*, *1*, 62-66.

[12] Sawant, R., Bhangale, L., Joshi, R., & Lanke, P. (2010). Validated spectrophotometric methods for simultaneous estimation of paracetamol, domperidone and tramadol HCl in pure and tablet dosage form. *Journal of Chemical Metrology*, *4*, 21-27.