วารสารวิทยาศาสตร์บูรพา ปีที่ 27 (ฉบับที่ 1) มกราคม – เมษายน พ.ศ. 2565
BURAPHA SCIENCE JOURNAL Volume 27 (No.1) January – April 2022 บทความวิจัย

วิธีโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูงสำหรับการหาปริมาณของพาราเซตามอลและทรามาดอลพร้อมกันในยาเม็ดโดยใช้คอลัมน์โครโมลิท C_{18}

High-Performance Liquid Chromatography Method for Simultaneous Determination of Paracetamol and Tramadol in Tablet Using Chromolith C_{18} Column

ขจัดภัย ทิพยผ่อง และ สมศักดิ์ ศิริไชย*

Khajadpai Thipyapong and Somsak Sirichai*

ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา

Chemistry Department, Faculty of Science, Burapha University

Received : 14 May 2021

Revised : 21 June 2021

Accepted : 3 August 2021

บทคัดย่อ

งานวิจัยนี้ได้พัฒนาและหาสภาวะที่เหมาะสมของวิธีโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูงที่ง่ายและรวดเร็วสำหรับการหาปริมาณของพาราเซตามอลและทรามาดอลพร้อมกันในยาเม็ด การแยกทางโครมาโทกราฟีทำบนคอลัมน์โครโมลิท C_{18} ยาว 25 มิลลิเมตร เส้นผ่านศูนย์กลางภายใน 3 มิลลิเมตร โดยใช้ฟอสเฟตบัฟเฟอต์ 10 มิลลิโมลาร์ (pH 3.0)-อะซิโตไนไตรล์ (95:5 โดยปริมาตร) ใช้การชะแบบเกรเดียนที่อัตราการไหลของเฟสเคลื่อนที่ 1.5 มิลลิลิตรต่อนาทีและตรวจวัดที่ 215 นาโนเมตร ภายใต้สภาวะที่เหมาะสม เวลาในการวิเคราะห์น้อยกว่า 1 นาที โดยใช้เวลาการปรับสภาพคอลัมน์ก่อนฉีดตัวอย่างถัดไปประมาณ 0.5 นาที กราฟมาตรฐาน (5.0 – 200.0 มิลลิกรัมต่อลิตร) มีความสัมพันธ์เป็นเส้นตรง ($r^2 > 0.998$) ในช่วง 5.0 ถึง 200.0 มิลลิกรัมต่อลิตร ขีดจำกัดการตรวจวัดของพาราเซตามอลและทรามาดอลเท่ากับ 0.03 และ 0.05 มิลลิกรัมต่อลิตร ตามลำดับ ขีดจำกัดการวิเคราะห์ปริมาณของพาราเซตามอลและทรามาดอลเท่ากับ 0.10 และ 0.15 มิลลิกรัมต่อลิตร ตามลำดับ ความเที่ยงในเทอมของร้อยละค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์อยู่ในช่วงร้อยละ 1.1 ถึง 2.9 และความแม่นอยู่ระหว่างร้อยละ 98.4 และ 101.1 วิธีที่เสนอนี้สามารถประยุกต์ใช้หาปริมาณของพาราเซตามอลและทรามาดอลพร้อมกันในตัวอย่างยาเม็ด

คำสำคัญ : โครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง ; พาราเซตามอล ; ทรามาดอล ; โครโมลิท C_{18}

Abstract

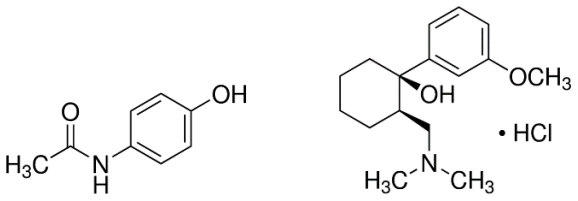
In this work, a simple and rapid high-performance liquid chromatography was developed and optimized for simultaneous determination of paracetamol and tramadol in tablets. The chromatographic separations were carried out on Chromolith C_{18} (25 mm × 3 mm i.d.) using a 10 mM phosphate buffer (pH 3.0)-acetonitrile (95:5, v/v) in a gradient elution mobile phase at the flow rate of 1.5 mL/min and detection of 215 nm. Under the optimal conditions, the analysis time was less than 1 min with re-equilibration time of approximately 0.5 min. The calibration curve (5.0 – 200.0 mg/L) was found to have a linear relationship (r^2 > 0.998) over the analytical range of 5.0 to 200.0 mg/L. The detection limits of paracetamol and tramadol were 0.03 and 0.05, respectively. The quantitation limits of paracetamol and tramadol were 0.10 and 0.15 mg/L, respectively. Precision in terms of percent relative standard deviation ranged from 1.1% to 2.9%, and accuracy was between 98.4% and 101.1%. The proposed method was successfully applied to the determination of paracetamol and tramadol in tablets.

Keywords : high performance liquid chromatography ; paracetamol ; tramadol ; chromolith C_{18}

***Corresponding author. E-mail :** sirichai@buu.ac.th

บทนำ

พาราเซตามอล (paracetamol, PAR) หรืออะเซตามิโนเฟน (acetaminophen) เป็นยาที่นิยมใช้กันอย่างแพร่หลายในประเทศไทยเนื่องจากสามารถหาซื้อได้ตามร้านขายยาทั่วไปและร้านสะดวกซื้อต่าง ๆ โดยไม่จำเป็นต้องมีใบสั่งแพทย์ นอกจากนี้ พาราเซตามอลมีราคาถูกและมีผลข้างเคียงของการใช้ยาน้อย โดยทั่วไปใช้พาราเซตามอลเพื่อบรรเทาอาการปวด เช่น ปวดหัว ปวดกล้ามเนื้อ และปวดท้องเป็นต้น และใช้เพื่อบรรเทาไข้ การออกฤทธิ์ระงับปวดทำโดยการยับยั้งการสร้างโพรสตาแกลนดิน (prostaglandin) ซึ่งเป็นตัวการของอาการปวด (Schildknecht *et al*., 2008) ทรามาดอล (tramadol, TRD) หรือทรามาดอลไฮโดรคลอไรด์ (tramadol hydrochloride) เป็นยาแก้ปวดในกลุ่มโอปิออยด์ (opioid) ใช้บรรเทาอาการปวดระดับปานกลางถึงระดับรุนแรง การรับประทานทรามาดอลอย่างต่อเนื่องหรือในปริมาณที่มากเกินไปสามารถทำให้เกิดการติดยาได้ (Naga *et al*., 2010) ปัจจุบันมีการนำพาราเซตามอลและทรามาดอลมารวมกันเพื่อเพิ่มประสิทธิภาพลดอาการปวดในระดับปานกลางถึงรุนแรงและมีความปลอดภัยมากขึ้น (Clellan & Scott, 2003) ดังนั้น จึงจำเป็นต้องมีวิธีวิเคราะห์สำหรับหาปริมาณพาราเซตามอลและทรามาดอลพร้อมกันเพื่อควบคุมคุณภาพของยา โครงสร้างของพาราเซตามอลและทรามาดอลแสดงดังภาพที่ 1



(1) (2)

ภาพที่ 1 โครงสร้างของพาราเซตามอล (1) และทรามาดอล (2)

วิธีวิเคราะห์หาปริมาณของพาราเซตามอลและทรามาดอลพร้อมกันมีการรายงานอยู่หลายวิธี ได้แก่ แก๊สโครมาโทกราฟี (gas chromatography หรือ GC) (Belal *et al*., 2009; Sha *et al*., 2005) โครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง (high performance liquid chromatography หรือ HPLC) (Hemant *et al*., 2019; Hemant *et al*., 2019; Swamy *et al*., 2018; Thomas & Poomali, 2016) แคปิลารีอิเล็กโทรโฟริซิส (capillary electrophoresis หรือ CE) (Ciurba *et al*., 2014) และสเปกโทรโฟโตเมทรี (spectrophotometry) (Zarei *et al*., 2013; Shukla *et al*., 2011; Sawant *et al*., 2010) ในจำนวนงานวิจัยที่ได้มีการรายงาน วิธีโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูงเป็นวิธีที่นิยมใช้เพื่อวิเคราะห์พาราเซตามอลและทรามาดอลพร้อมกันเมื่อเทียบกับวิธีอื่น ๆ การวิเคราะห์พาราเซตามอลและทรามาดอลด้วยวิธีโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูงมีข้อเสียคือใช้ปริมาณของเฟสเคลื่อนที่ค่อนข้างมาก ซึ่งเป็นผลเนื่องมาจากเวลาที่ใช้ในการวิเคราะห์นาน แต่ข้อดีของวิธีนี้คือ ให้การแยกดี มีความเฉพาะเจาะจง มีความแม่นและความเที่ยง และค่าใช้จ่ายต่ำ อย่างไรก็ตาม ยังไม่พบว่ามีการรายงานการวิเคราะห์ยาเม็ดที่มีพาราเซตามอลและทรามาดอลพร้อมกันบนคอลัมน์โครโมลิท C_{18}

จุดประสงค์ของงานวิจัยนี้เป็นการเพื่อพัฒนาเทคนิคโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูงบนคอลัมน์โครโมลิท C_{18} สำหรับวิเคราะห์ปริมาณพาราเซตามอลและทรามาดอลพร้อมกันในยาเม็ด ข้อดีที่โดดเด่นของการใช้คอลัมน์โครโมลิท C18 คือ เวลาการวิเคราะห์สั้น เนื่องจากในงานวิจัยนี้สามารถใช้อัตราการไหลที่สูงได้ (1.5 มิลลิลิตรต่อนาที) ซึ่งเป็นอัตราการไหลที่สามารถทำได้ในคอลัมน์ที่เป็นซิลิกา (silica-base column) นอกจากนี้เทคนิคที่พัฒนานี้ทำได้ง่าย และมีความน่าเชื่อถือ

วิธีดำเนินการวิจัย

1. สารเคมีและสารละลาย

สารมาตรฐานพาราเซตามอล (ความบริสุทธิ์มากกว่า 98%) จากบริษัท Tokyo Chemical Industry ประเทศญี่ปุ่น สารมาตรฐานทรามาดอลไฮโดรคลอไรด์ (ความบริสุทธิ์มากกว่า 98%) จากบริษัท Sigma-Aldrich ประเทศสหรัฐอเมริกา อะซิโตไนไตรล์และเมทานอลเกรด HPLC จากบริษัทเมอร์ค ประเทศเยอรมัน โปแตสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟตและไดโซเดียมไฮโดรเจนฟอสเฟตจากบริษัท VWR Chemicals BDH ประเทศสหรัฐอเมริกา กรดออโทฟอสฟอริกจากบริษัท Merck ประเทศเยอรมัน น้ำปราศจากไอออน (18 MΩ) จากเครื่อง E-pure Deionization system ของบริษัท Barnstead ประเทศเยอรมัน ใช้สำหรับการเตรียมสารละลายทุกชนิด

สารละลายมาตรฐานเข้มข้น (standard stock solution) ของสารประกอบทั้งสองชนิดเตรียมในอะซิโตไนไตรล์และเตรียมแยกกันเพื่อให้ได้ความเข้มข้นพาราเซตามอล 500 มิลลิกรัมต่อลิตรและทรามาดอล 500 มิลลิกรัมต่อลิตร และเก็บในตู้เย็นที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส สารละลายมาตรฐานผสมของพาราเซตามอลและทรามาดอลที่ความเข้มข้นต่าง ๆ เตรียมจากสารละลายมาตรฐานเข้มข้นโดยการปิเปตปริมาตรที่เหมาะสมของแต่ละสารละลายมาตรฐานเข้มข้นลงในขวดวัดปริมาตรขนาด 10 มิลลิลิตร จากนั้นเจือจางด้วยน้ำปราศจากไอออน สารละลายที่ได้กรองผ่านไนลอนเมมเบรนขนาด 0.20 ไมครอน ก่อนนำไปวิเคราะห์ด้วยเครื่อง HPLC

2. เครื่องมือ

การวิเคราะห์พาราเซตามอลและทรามาดอลใช้เครื่อง HPLC รุ่น 1260 Infinity II ของบริษัท Agilent ประเทศสหรัฐอเมริกา ประกอบด้วยปั๊มชนิดระบบผสมตัวทำละลายได้สี่ชนิด (G7111A quaternary pump) ระบบไล่แก๊สแบบออนไลน์ (online degasser) และตัวตรวจวัดชนิดไดโอดอาร์เรย์ (G7115A diode array detector) การแยกสารเกิดขึ้นในคอลัมน์ชนิดรูพรุนสูง (Chromolith Flash RP-18e) ขนาด 25 มิลลิเมตร × 3 มิลลิเมตร ของบริษัท Merck ประเทศเยอรมัน ปริมาตรที่ฉีดเข้าคอลัมน์คือ 20 ไมโครลิตร คอลัมน์และระบบ HPLC ทำงานที่อุณหภูมิห้อง (25 องศาเซลเซียส) ความยาวคลื่นที่ใช้ตรวจวัดคือ 215 นาโนเมตร ระบบโครมาโทกราฟีควบคุมด้วย OpenLab CDs Chemstation เวอร์ชัน C.01.04 บริษัท Agilent การวิเคราะห์เชิงคุณภาพทำโดยการเปรียบเทียบช่วงอัลตร้าไวโอเลต (ultraviolet spectra) และรีเทนชันไทม์ (retention time) ของสารมาตรฐาน เครื่องวัด pH รุ่น ϕ 32 ของบริษัท Beckman ประเทศสหรัฐอเมริกา

3. การเตรียมสารละลายตัวอย่าง

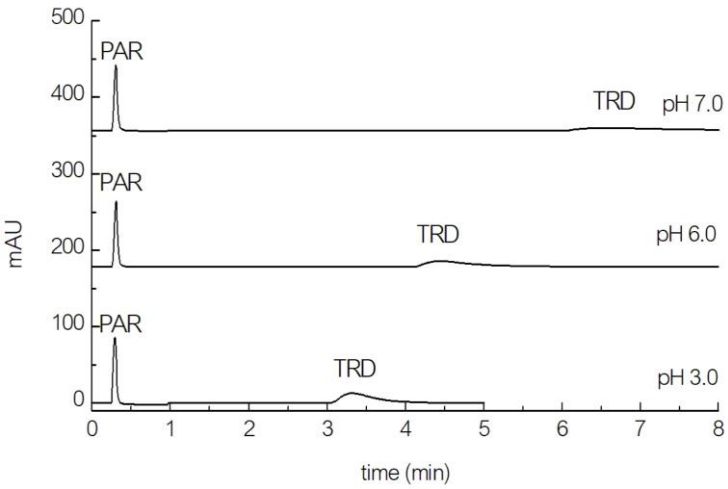
สำหรับการวิเคราะห์ยา นำตัวอย่างยาเม็ดยี่ห้ออูลตราเซทที่ระบุว่ามีปริมาณของพาราเซตามอล 325 มิลลิกรัมและทรามาดอล 37.5 มิลลิกรัมต่อเม็ด จำนวน 10 เม็ด มาบดให้ละเอียด จากนั้นชั่งตัวอย่างยาที่บดแล้วให้ได้ปริมาณยาพารา

เซตามอล 325 มิลลิกรัมและทรามาดอล 37.5 มิลลิกรัม ละลายด้วยอะซิโตไนไตรล์ จากนั้นถ่ายสารละลายที่ได้ลงในขวดวัดปริมาตรขนาด 100 มิลลิลิตร เจือจางด้วยอะซิโตไนไตรล์ นำไปสกัดด้วยเครื่องอัลตราโซนิค (ultra sonicator) เป็นเวลา 20 นาที ปั่นเหวี่ยง 10 นาที ปิเปตสารละลายตัวอย่างที่ได้ 500 ไมโครลิตรลงในขวดวัดปริมาตรขนาด 10 มิลลิลิตรและปรับปริมาตรด้วยน้ำปราศจากไอออน กรองด้วยเยื่อกรอง (membrane filter) ขนาด 0.20 ไมโครเมตรก่อนนำไปวิเคราะห์ด้วยเครื่อง HPLC

ผลการวิจัย

1. ศึกษาการแยกพาราเซตามอลและทรามาดอลโดยใช้การชะแบบไอโซเครติก

ในการศึกษาการแยกพาราเซตามอลและทรามาดอลพร้อมกันโดยใช้การชะแบบไอโซเครติก จะเป็นการศึกษาผลของ pH ของฟอสเฟตบัฟเฟอร์ องค์ประกอบของเฟสเคลื่อนคือฟอสเฟตบัฟเฟอร์ ความเข้มข้น 10 มิลลิโมลาร์ (95%, v/v) ที่ pH ต่าง ๆ และอะซิโตไนไตรล์ (5%, v/v) อัตราการไหลของเฟสเคลื่อนที่คือ 1.5 มิลลิลิตรต่อนาที สารละลายมาตรฐานผสมพาราเซตามอล ความเข้มข้น 10.0 มิลลิกรัมต่อลิตรและทรามาดอล 20.0 มิลลิกรัมต่อลิตรใช้เพื่อศึกษาสภาวะของโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง ผลของ pH ของฟอสเฟตบัฟเฟอร์ในเฟสเคลื่อนที่ต่อการแยกพาราเซตามอลและทรามาดอลแสดงดังภาพที่ 2



ภาพที่ 2 ผลของ pH ของฟอสเฟตบัฟเฟอร์ในเฟสเคลื่อนที่ต่อการแยกสารละลายมาตรฐานผสมของพาราเซตามอลและทรามาดอล

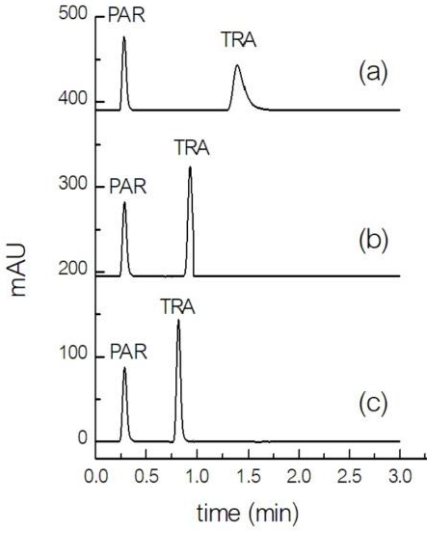
2. ศึกษาการแยกพาราเซตามอลและทรามาดอลโดยใช้การชะแบบเกรเดียน

จากผลการศึกษาการแยกพาราเซตามอลและทรามาดอลพร้อมกันด้วยการชะแบบไอโซเครติก พบว่า เมื่อใช้องค์ประกอบของเฟสเคลื่อนที่ซึ่งประกอบด้วยฟอสเฟตบัฟเฟอร์ ความเข้มข้น 10 มิลลิโมลาร์ (pH 3.0) และอะซิโตไนไตรล์ที่

อัตราส่วนเท่ากับ 95:5 (v/v) การวิเคราะห์สารประกอบทั้งสองสามารถทำได้ภายใน 4 นาที เพื่อให้การวิเคราะห์สามารถทำได้เร็วขึ้น จึงได้มีการศึกษาการชะแบบเกรเดียน โดยใช้ตัวชะ (eluent) 2 ชนิด ได้แก่ ตัวชะ A คืออะซิโตไนไตรล์ และตัวชะ B คือ ฟอสเฟสบัฟเฟอร์ ความเข้มข้น 10 มิลลิโมลาร์ (pH 3.0) อัตราการไหลของเฟสเคลื่อนที่ คือ 1.5 มิลลิลิตรต่อนาที สารละลายมาตรฐานผสมพาราเซตามอล ความเข้มข้น 10.0 มิลลิกรัมต่อลิตรและทรามาดอล 20.0 มิลลิกรัมต่อลิตรใช้เพื่อศึกษาสภาวะของโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง สภาวะของการชะแบบเกรเดียนแสดงดังตารางที่ 1 ผลการศึกษาโดยใช้สภาวะการชะแบบเกรเดียนแบบต่าง ๆ ต่อโครมาโทแกรมของการแยกสารละลายมาตรฐานผสมของพาราเซตามอลและทรามาดอลแสดงดังภาพที่ 2

ตารางที่ 1 สภาวะเกรเดียนที่ใช้ศึกษาการแยกพาราเซตามอลและทรามาดอล

สภาวะที่	**เวลา (นาที)**	**ตัวชะ A (%)**	**ตัวชะ B (%)**
1	0.0	5	95
	0.3	10	90
	3.0	10	90
2	0.0	5	95
	0.3	20	80
	3.0	20	80
3	0.0	5	95
	0.3	30	70
	3.0	30	70



ภาพที่ 2 ผลการการชะแบบเกรเดียนต่อการแยกสารละลายมาตรฐานผสมของพาราเซตามอลและทรามาดอล

วิจารณ์ผลการวิจัย

1. ศึกษาการแยกพาราเซตามอลและทรามาดอลโดยใช้การชะแบบไอโซเครติก

ในการพัฒนาการวิเคราะห์ปริมาณพาราเซตามอลและทรามาดอลพร้อมกันโดยวิธีโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง การศึกษาเริ่มจากการใช้การชะแบบไอโซเครติก องค์ประกอบของเฟสเคลื่อนที่ประกอบด้วยฟอสเฟตบัฟเฟอร์ ความเข้มข้น 10 มิลลิโมลาร์ที่ pH ต่าง ๆ และอะซิโตไนไตรล์ เนื่องจาก pH ของเฟสเคลื่อนที่เป็นหนึ่งปัจจัยสำคัญซึ่งกระทบต่อการแยกสาร โดยเฉพาะอย่างยิ่งจำพวกยา ด้วยเหตุนี้จึงได้ทำการศึกษา pH ของฟอสเฟตบัฟเฟอร์ในช่วง 3.0-7.0 จากผลการทดลองพบว่าในช่วง pH ที่ศึกษา เมื่อค่า pH ของเฟสเคลื่อนที่เพิ่มขึ้น ส่งผลทำให้ค่ารีเทนชันไทม์ของสารเพิ่มขึ้น เนื่องจากสารทั้งสองสามารถแตกตัวเป็นไอออนได้ โดยมีค่า pK_a ของพาราเซตามอลและทรามาดอลเท่ากับ 9.5 และ 9.41 ตามลำดับ การเพิ่มค่า pH ของเฟสเคลื่อนจาก 3.0 ถึง 7.0 ทำให้โมเลกุลของสารลดความเป็นประจุและเกิดการพาร์ติชันกับเฟสคงที่มากขึ้น นอกจากนี้ยังเห็นได้ว่า การเพิ่มค่า pH ของเฟสเคลื่อนที่ทำให้สภาพไวของการวิเคราะห์ลดลงโดยเฉพาะอย่างยิ่งกับสารทรามาดอล ดังนั้น จึงเลือกเฟสเคลื่อนที่ที่ประกอบด้วยฟอสเฟตบัฟเฟอร์ ความเข้มข้น 10 มิลลิโมลาร์ (pH 3.0) และอะซิโตไนไตรล์เป็นสภาวะเริ่มสำหรับการศึกษาต่อไป

2. ศึกษาการแยกพาราเซตามอลและทรามาดอลโดยใช้การชะแบบเกรเดียน

เพื่อลดเวลาในการวิเคราะห์พาราเซตามอลและทรามาดอลให้สั้นลง จึงได้มีการศึกษาการชะแบบเกรเดียน การหาสภาวะที่เหมาะสมของสภาวะเกรเดียนในการแยกสารประกอบทั้งสอง ทำโดยใช้ตัวชะ (eluent) 2 ชนิด คือ อะซิโตไนไตรล์ (ตัวชะ A) และฟอสเฟตบัฟเฟอร์ ความเข้มข้น 10 มิลลิโมลาร์ (ตัวชะ B) อัตราการไหลของเฟสเคลื่อนที่คือ 1.5 มิลลิลิตรต่อนาที จากการศึกษาสภาวะการชะแบบเกรเดียนทั้ง 3 สภาวะ (ตารางที่ 1) โดยใช้เวลาการปรับสภาพคอลัมน์ก่อนฉีดตัวอย่างถัดไป (re-equilibration time) ประมาณ 0.5 นาที พบว่า เมื่อเพิ่มเปอร์เซ็นต์ของอะซิโตไนไตรล์ในทุกสภาวะ ส่งผลทำให้เวลาในการวิเคราะห์ของผสมพาราเซตามอลและทรามาดอลลดลง เนื่องจากการเพิ่มเปอร์เซ็นต์ของอะซิโตไนไตรล์เป็นการลดความมีขั้วของเฟสเคลื่อนที่ ทำให้การพาร์ติชันของสารกับเฟสคงที่ลดลง จากผลการทดลองที่ได้จากสภาวะเกรเดียนทั้ง 3 สภาวะ การวิเคราะห์พาราเซตามอลและทรามาดอลสามารถทำได้ภายในเวลาน้อยกว่า 1 นาที จากรายงานบทความวิจัยที่ได้มีการรายงาน พบว่า การวิเคราะห์พาราเซตามอลและทรามาดอลด้วยวิธีโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูงใช้เวลาการวิเคราะห์รวม 2 นาทีหรือมากกว่า (Thomas & Poomali, 2016) และด้วยวิธีเทคนิคแคปิลารีอิเล็กโทรโฟริซีสใช้เวลาในการวิเคราะห์น้อยกว่า 1 นาที (Ciurba *et al*., 2014)

3. ศึกษาความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์

กระบวนการศึกษาความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์ (validation method) ทำเพื่อตรวจสอบประสิทธิภาพของวิธีที่พัฒนาขึ้นก่อนนำไปใช้วิเคราะห์กับตัวอย่างยา เทอมที่ศึกษาได้แก่ความเป็นเส้นตรงของกราฟมาตรฐาน (calibration curve) ขีดจำกัดการตรวจวัด (limit of detection หรือ LOD) ขีดจำกัดการหาปริมาณ (limit of quantification หรือ LOQ) ความแม่น (accuracy) และความเที่ยง (precision) การศึกษาความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์ทำภายใต้สภาวะที่เหมาะสม คือ ใช้การชะแบบเกรเดียน เริ่มจากอะซิโตไนไตรล์ 5%(v/v) และฟอสเฟตบัฟเฟอร์ ความเข้มข้น 10 มิลลิโมลาร์ (pH 3.0) 95%(v/v) จากนั้น

ความเข้มข้นของอะซิโตไนไตรล์เพิ่มขึ้นเป็น 30%(v/v) ในเวลา 0.3 นาที และคงที่ถึงเวลา 3.0 นาที อัตราการไหลของเฟสเคลื่อนที่คือ 1.5 มิลลิลิตรต่อนาที ความยาวคลื่นตรวจวัดคือ 215 นาโนเมตร

ในการศึกษาความเป็นเส้นตรงของกราฟมาตรฐาน ทำโดยเตรียมสารละลายมาตรฐานผสมของพาราเซตามอลและทรามาดอลในช่วงความเข้มข้น 5.0 ถึง 200.0 มิลลิกรัมต่อลิตร LOD และ LOQ พิจารณาจากความเข้มข้นของสารที่ต้องการวิเคราะห์ที่ให้อัตราส่วนของสัญญาณของสารละลายมาตรฐานต่อสัญญาณรบกวน (signal-to-noise ratio) เท่ากับ 3 และ 10 ตามลำดับ ความเป็นเส้นตรงของกราฟมาตรฐาน LOD และ LOQ ของพาราเซตามอลและทรามาดอลแสดงดังตารางที่ 2

ตารางที่ 2 ความเป็นเส้นตรงของกราฟมาตรฐาน LOD และ LOQ ที่ได้จากการวิเคราะห์ภายใต้สภาวะที่เหมาะสม

สาร	สมการเส้นตรงของกราฟมาตรฐาน	R^2	LOD (มิลลิกรัมต่อลิตร)	LOQ (มิลลิกรัมต่อลิตร)
พาราเซตามอล	$y = 23.198x + 46.547$	0.9989	0.03	0.10
ทรามาดอล	$y = 19.935x + 34.306$	0.9999	0.05	0.15

ความเที่ยงของวิธีแสดงถึงความใกล้กันของผลการวิเคราะห์ซ้ำของวิธีที่พัฒนาขึ้นมา ความเที่ยงภายในวันศึกษาโดยการวิเคราะห์ความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐานของพาราเซตามอลและทรามาดอลที่ 3 ระดับความเข้มข้น (10.0, 50.0 และ 150.0 มิลลิกรัมต่อลิตร) โดยทำการฉีดซ้ำ 5 ครั้ง และความเที่ยงระหว่างวันศึกษาโดยการวิเคราะห์ความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐานของพาราเซตามอลและทรามาดอลที่ 3 ระดับความเข้มข้น (10.0, 50.0 และ 150.0 มิลลิกรัมต่อลิตร) ทำการวิเคราะห์ซ้ำเป็นเวลา 5 วัน แต่ละวันวิเคราะห์ซ้ำ 5 ครั้ง ผลการศึกษาความเที่ยงของวิธีที่พัฒนาขึ้นมาแสดงดังตารางที่ 3

ตารางที่ 3 ความเที่ยงภายในวันและความเที่ยงระหว่างวันของวิธีที่เสนอที่ได้จากการวิเคราะห์ภายใต้สภาวะที่เหมาะสม

สารที่วิเคราะห์	ความเข้มข้น (มิลลิกรัมต่อลิตร)		
	10.0	50.0	150.0
ความเที่ยงภายในวัน %R.S.D			
พาราเซตามอล	1.4	1.3	1.1
ทรามาดอล	1.7	1.5	1.2
ความเที่ยงระหว่างวัน %R.S.D			
พาราเซตามอล	2.5	2.3	2.1
ทรามาดอล	2.9	2.5	2.2

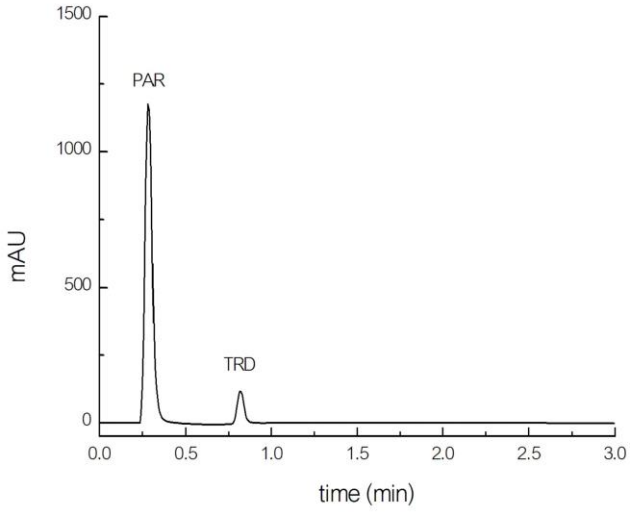
ความแม่นของวิธีวิเคราะห์สามารถแสดงได้ในเทอมของร้อยละการได้กลับคืน (percent recovery) ทำโดยการเติมสารละลายมาตรฐานผสมของพาราเซตามอลและทรามาดอลที่ 3 ระดับความเข้มข้นลงในตัวอย่างยา ผลของการศึกษาความแม่นของวิธีที่พัฒนาขึ้นมาแสดงดังตารางที่ 4

ตารางที่ 4 ความแม่นของวิธีที่พัฒนาขึ้นมาที่ได้จากการวิเคราะห์ภายใต้สภาวะที่เหมาะสม (n = 5)

สารที่วิเคราะห์	ร้อยละการได้กลับคืน		
	10.0 มิลลิกรัมต่อลิตร	50.0 มิลลิกรัมต่อลิตร	100.0 มิลลิกรัมต่อลิตร
พาราเซตามอล	101.1 ± 0.2	100.4 ± 0.1	99.8 ± 0.2
ทรามาดอล	98.4 ± 0.3	99.3 ± 0.3	99.7 ± 0.2

4. การวิเคราะห์พาราเซตามอลและทรามาดอลในตัวอย่างยา

นำวิธีโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูงภายใต้สภาวะที่เหมาะสมไปประยุกต์ใช้กับการวิเคราะห์หาปริมาณของพาราเซตามอลและทรามาดอลในตัวอย่างยาที่มีส่วนผสมของสารประกอบ ซึ่งฉลากบนกล่องระบุปริมาณของพาราเซตามอลและทรามาดอล 325 และ 37.5 มิลลิกรัมต่อเม็ด ตามลำดับ ผลการวิเคราะห์ตัวอย่างยาพบปริมาณของพาราเซตามอล 324.1 ± 0.3 มิลลิกรัมต่อเม็ดและทรามาดอล 37.2 ± 0.2 มิลลิกรัมต่อเม็ด โครมาโทแกรมที่ได้จากการวิเคราะห์ตัวอย่างยาแสดงดังภาพที่ 3



ภาพที่ 3 โครมาโทแกรมที่ได้จากการวิเคราะห์ตัวอย่างยา สภาวะของโครมาโทกราฟี คือ การชะแบบเกรเดียน เริ่มจากอะซิโตไนไตรล์ 5%(v/v) และฟอสเฟตบัฟเฟอร์ ความเข้มข้น 10 มิลลิโมลาร์ (pH 3.0) 95%(v/v) จากนั้นความเข้มข้นของอะซิโตไนไตรล์เพิ่มขึ้นเป็น 30%(v/v) ในเวลา 0.3 นาที และคงที่ถึงเวลา 3.0 นาที อัตราการไหลของเฟสเคลื่อนที่คือ 1.5 มิลลิลิตรต่อนาที ความยาวคลื่นตรวจวัดคือ 215 นาโนเมตร

สรุปผลการวิจัย

งานวิจัยนี้ได้พัฒนาวิธีโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูงโดยใช้คอลัมน์โครโมลิท C_{18} สำหรับการวิเคราะห์หาปริมาณพาราเซตามอลและทรามาดอลพร้อมกันในตัวอย่างยาเม็ด เมื่อเปรียบเทียบกับวิธีการวิเคราะห์โครมาโทกราฟีที่มีการรายงาน วิธีที่พัฒนานี้เป็นวิธีที่ง่าย มีความแม่นและความเที่ยงสูง และเป็นวิธีวิเคราะห์ที่มีความเร็วสูง ทำให้วิเคราะห์สารตัวอย่างปริมาณมาก (high-throughput analysis method) และใช้เวลาในการวิเคราะห์พาราเซตามอลและทรามาดอลพร้อมกันโดยใช้เวลาน้อยกว่า 1 นาที นอกจากนี้ยังสามารถนำไปประยุกต์ใช้ในการควบคุมคุณภาพของยาสำหรับงานประจำ

เอกสารอ้างอิง

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.

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.

Clellan, M., & Scott, L. (2003). Tramadol, paracetamol fixed dose combination. *Drugs*, *63*(11), 1079-1086.

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.

Naga, L., Mallika, D., Narmada, D., & Padmavothamma, M. (2010). Kinetic spectrophotometric estimation of tramadol hydrochloride in bulk tablet and capsule dosage form. *Journal Pharmaceutical Research*, *4*(10), 3842-3844.

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.

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.

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.

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.

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.

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.

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.