บทที่ 1

ความรู้ทั่วไปเกี่ยวกับสตีรอยด์ฮอร์โมน

1.1 บทนำ

ในช่วง 20 ปีนี้ มีการนำสตีรอยด์ฮอร์โมน (steroid hormone) มาใช้เป็นยารักษาโรคกันมาก เนื่องจากมีการค้นพบสารประกอบสตีรอยด์และวิธีการสังเคราะห์สตีรอยด์ฮอร์โมนเพื่อผลิตในระดับอุตสาหกรรม โดยการนำสตีรอยด์หรือสตีรอยด์ฮอร์โมนที่สกัดได้จากธรรมชาติมาสังเคราะห์เพิ่มเติม เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพของตัวยาในการใช้รักษาโรค ปัจจุบันมีสตีรอยด์ฮอร์โมนทั้งสิ้นประมาณ 200 ชนิด และคิดเป็น 5-10% ของผลิตภัณฑ์ยาทั้งหมด ส่วนมากจะนำสตีรอยด์ฮอร์โมนมาใช้เป็นองค์ประกอบของยาคุมกำเนิดทั้งที่อยู่ในรูปของยาเม็ดและยาน้ำที่ใช้ฉีด การคุมกำเนิดโดยใช้สตีรอยด์ฮอร์โมนได้เป็นที่นิยมกันแพร่หลายของสตรีทั่วโลก และเป็นวิธีหนึ่งที่ใช้กันมากที่สุดในสตรีไทยด้วย ทั้งนี้เพราะว่า การใช้ยาเม็ดคุมกำเนิด เป็นวิธีคุมกำเนิดแบบชั่วคราวที่ให้ผลดีที่สุดวิธีหนึ่ง(1)

ปัจจุบันนี้ ยาฮอร์โมนที่ใช้คุมกำเนิดนั้นเตรียมมาจากสตีรอยด์สังเคราะห์ (synthetic steroid) และอาจมีผลข้างเคียง (side-effect) ต่อผู้ใช้ยาฮอร์โมนเหล่านี้ได้ โดยมีการเปลี่ยนแปลงบางอย่างเกิดขึ้นในร่างกายแตกต่างไปจากการเปลี่ยนแปลงที่เกิดจากฮอร์โมนที่ได้จากธรรมชาติซึ่งถือว่า เป็นการเปลี่ยนแปลงสรีรวิทยาของร่างกายตามปกติ(2) ด้วยเหตุนี้ จึงมีการศึกษาค้นคว้าเกี่ยวกับผลิตภัณฑ์ยาสำเร็จรูปที่มีจำหน่ายอยู่ทั่วไป คือ การควบคุมคุณภาพของผลิตภัณฑ์ยาเหล่านั้นโดยการวิเคราะห์ยาฮอร์โมนที่เตรียมขึ้น พิจารณาถึงปริมาณสารตัวยา สารตัวกลาง (intermediate) ต่างๆที่อาจเกิดขึ้นในระหว่างขั้นตอนการผลิต และผลิตภัณฑ์ที่เกิดจากการสลายตัว (degradation product) การวิเคราะห์ยาประเภทนี้มีความสำคัญคือ ศึกษาเสถียรภาพและควบคุมคุณภาพของยาที่เก็บไว้นานๆ และยาที่เตรียมใหม่ เนื่องจาก ยาสตีรอยด์เป็นยาที่ออกฤทธิ์แรง ขนาดยาที่ใช้แต่ละครั้งมีปริมาณสารน้อย ดังนั้นการวิเคราะห์ยาประเภทนี้จะต้องใช้วิธีที่จำเพาะปัจจุบันนี้ นิยมใช้เทคนิคโครมาโตกราฟีของเหลวแบบสมรรถนะสูงสำหรับแยกและ/หรือวิเคราะห์ยาสตีรอยด์ เพราะว่าเทคนิคนี้ทำได้ง่าย รวดเร็ว และให้ข้อมูลที่มีความถูกต้องและแม่นยำสูง ดังนั้น จึงมีการประยุกต์ใช้วิเคราะห์คุณภาพและหาปริมาณขององค์ประกอบตัวยาในผลิตภัณฑ์ยากันอย่างแพร่หลาย(3,4)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

1.2 โครงสร้างของสตีรอยด์ฮอร์โมน

สตีรอยด์ฮอร์โมนทุกชนิดทั้งที่เกิดขึ้นในธรรมชาติและที่ถูกสังเคราะห์ขึ้นจะมีโครงสร้างหลักเป็นแบบ Cyclopentanoperhydrophenanthrene ประกอบด้วยวง (ring)ต่อกัน 4 วง แต่ละวงมีอักษรกำกับคือ วง A วง B วง C และวง D สารประกอบสตีรอยด์นี้มีอะตอมคาร์บอนจำนวน 18-21 ตัว สตีรอยด์บางตัวจะมีเมทธิล กรุ๊ป (methyl group)อยู่ที่ C_{10} และ C_{13} และกำหนดให้เป็น C_{19} และ C_{18} ตามลำดับ และมี side-chain ต่างๆ เกาะอยู่ที่ C_{17} เป็นจุดสำคัญในการจัดกลุ่มสตีรอยด์ แหล่งสำคัญของสตีรอยด์ที่ได้จากธรรมชาติเช่น sterol, bile acid,sapogenin เป็นต้น(1,5)

1.3 การเตรียมสตีรอยด์ฮอร์โมน

ฮอร์โมนเป็นสารอินทรีย์ที่ผลิตขึ้นจากกลุ่มเซลของอวัยวะของพืชหรือสัตว์ มีหน้าที่ควบคุมการทำงานในสิ่งมีชีวิตให้เป็นไปอย่างสม่ำเสมอ สตีรอยด์ฮอร์โมนที่ได้จากสัตว์ถูกผลิตขึ้นในอัณฑะ รังไข่ และอะดรีนอล คอเทค (adrenal cortex) มีผลต่อพัฒนาการทางเพศ การสืบพันธุ์ และเมตาโบลิซึม (metabolism) ของร่างกาย เมื่อก่อนใช้ฮอร์โมนที่สกัดได้จากต่อม (gland) ในตัวสัตว์ และแยกให้บริสุทธิ์ได้ปริมาณน้อย ต่อมามีการประยุกต์ใช้ฮอร์โมนสังเคราะห์รักษาโรค และพบว่า ฮอร์โมนที่ออกฤทธิ์รุนแรงนั้นไม่จำเป็นต้องได้จากฮอร์โมนธรรมชาติ จึงได้มีการสังเคราะห์ดัดแปลงโครงสร้างและ side-chain ต่างๆในสารประกอบสตีรอยด์ที่ไม่มีอยู่ในธรรมชาติ ทำให้ฮอร์โมนสังเคราะห์เหล่านี้มีฤทธิ์แรงขึ้น และให้ผลที่จำเพาะ ปัจจุบันจึงหันมาใช้สตีรอยด์ฮอร์โมนสังเคราะห์รักษาโรคมากกว่าการใช้ฮอร์โมนที่ได้จากธรรมชาติทั้งในด้านจำนวนและปริมาณ(1,6)

1.4 การแบ่งกลุ่มของสตีรอยด์ฮอร์โมนในทางเภสัชกรรม

สตีรอยด์ฮอร์โมนที่เกี่ยวข้องกับการใช้รักษาโรคที่สำคัญมีดังนี้ (1,6)

1.4.1 ฮอร์โมนเอนโดรเจน (Androgenic hormone) เป็นกลุ่มของฮอร์โมนเพศชาย มีบทบาทสำคัญในการบอกลักษณะของเพศชาย ถูกผลิตขึ้นจากลูกอัณฑะเป็นส่วนใหญ่ พบในรังไข่ในปริมาณน้อยๆ ฮอร์โมนที่สำคัญในกลุ่มนี้ได้แก่ testosterone ซึ่งไม่ค่อยมีบทบาทสำคัญต่อการรักษาโรคในปัจจุบันมากนัก มีไฮดรอกซิล กรุ๊ป (hydroxyl group) ที่ C_{17} ถูกออกซิไดซ์ (oxidise) ได้ง่ายในร่างกาย กลายเป็นคีโตนกรุ๊ป (ketone group) และ

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ใช้เป็นยารับประทานไม่ได้ ชนิดที่ใช้รับประทานได้แก่ methyltestosterone และ fluoxymesterone

1.4.2 ฮอร์โมน เอสโตรเจน (Oestrogenic hormone) เป็นฮอร์โมนที่ผลิตขึ้นจากรังไข่เป็นส่วนใหญ่ มีหน้าที่ควบคุมลักษณะของเพศหญิง ฮอร์โมนชนิดนี้ตัวแรก คือ 17β - oestradiol มีรูปออกซิไดซ์เป็น oestrone และมี oestriol ในปริมาณน้อยๆ พบว่า 17β-oestradiol ทั้งที่ได้จากธรรมชาติและที่สังเคราะห์ขึ้นอาจมีรูป 17α-epimer ปนอยู่ด้วย และ active น้อยกว่ามาก นิยมใช้ฮอร์โมนเอสโตรเจนในการรักษาสภาวะที่รังไข่ขับเอสโตรเจนลดลง เช่น การมีรอบเดือนไม่สม่ำเสมอ ที่สำคัญคือ ใช้เป็นองค์ประกอบของยาเม็ดคุมกำเนิด (oral contraceptive) ฮอร์โมนเอสโตรเจนที่ได้จากธรรมชาติจะถูก in-activate ได้อย่างรวดเร็วในร่างกาย ดังนั้นจึงไม่สามารถใช้เป็นยารับประทานได้ส่วนมากที่ใช้รักษาจะอยู่ในสารละลายน้ำมันที่ใช้ฉีด (injectable oil solution) เช่น oestrone และ β -oestradiol และ/หรือเอสเทอร์ที่ C_{17} ซึ่งเป็นสารอนุพันธ์ (derivative) ของฮอร์โมนเอสโตรเจน

ส่วนสารประกอบสตีรอยด์ฮอร์โมนที่ได้จากการสังเคราะห์ คือ การเติมเอทธินิลกรุ๊ป (ethinyl group) ที่ C_{17} ได้แก่ ethinyl oestradiol และ mestrarol ซึ่งสารประกอบทั้งสองชนิดนี้จะ active มาก และใช้เป็นยารับประทานได้ รูปที่ 1 แสดงถึงโครงสร้างของฮอร์โมนเอสโตรเจนและสารอนุพันธ์ ชนิดต่างๆที่ใช้เป็นองค์ประกอบตัวยาในทางเภสัชกรรม

1.4.3 ฮอร์โมนโปรเจสโตเจน (Progestogenic hormone)

นอกจากกลุ่มของฮอร์โมนเอสโตรเจนแล้วยังมีฮอร์โมนที่สำคัญของรังไข่อีกชนิดหนึ่งคือ progesterone มีหน้าที่หลักในการเตรียมผนังมดลูกเพื่อรองรับไข่หลังจากการผสมแล้ว และหยุดการตกไข่ ครั้งแรกจะใช้ progesterone ในการควบคุมการขับรอบเดือนที่มาไม่สม่ำเสมอ เนื่องจากสารนี้มี potency ในการยับยั้งการตกไข่ ดังนั้น จึงนำมาใช้เป็นองค์ประกอบในยาเม็ดคุมกำเนิด ปกติแล้วจะใช้ progesterone ในรูปของยาฉีด (สารละลาย หรือ สารแขวนลอย) ไม่ใช้ในรูปของยาเม็ด เพราะว่าจะมี activity ต่ำเมื่อใช้รับประทาน ส่วนมากจะใช้ progesterone ร่วมกับกลุ่มของ oestradiol ester สาร

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ประกอบที่เป็นอนุพันธ์ของ progesterone ได้แก่ medroxy-progesterone acetate chlormadinone acetate และ megestrol acetate เป็นต้น

นอกจากนี้ มีสารประกอบที่มีโครงสร้างแตกต่างจาก progesterone ซึ่งสังเคราะห์ขึ้นมาใช้เป็นยาเม็ด ได้แก่ ethisterone dimethisterone และ allyloestrenol โดยเฉพาะอย่างยิ่ง allyloestrenol จัดเป็นกลุ่มสำคัญของยาเม็ดโปรเจสโตเจน ซึ่งเป็นสารอนุพันธ์ของ 19-nor derivative สารประกอบตัวแรกที่ใช้เป็นองค์ประกอบของยาเม็ดคุมกำเนิด คือ 19-nor-17α - ethinyl derivative ในบรรดายาเตรียมทั้งหลายจะมีส่วนผสมของโปรเจสโตเจน (0.5-5.0 มิลลิกรัม) และ เอสโตรเจน (0.05-0.10 มิลลิกรัม) สารประกอบที่เป็นอนุพันธ์ของ 19-nor derivative ethisterone คือ norethisterone (norethindrone) และมีสารประกอบอนุพันธ์อื่นๆ เช่น อยู่ในรูปของ acetate $\Delta^{5(10)}$ isomer (norethynodrel) 13-ethyl derivative (norgestrel) 3-deoxo derivative (lynoestrenol) และอยู่ในรูปของ diacetate (ethynodiol diacetate) ดังโครงสร้างแสดงในรูปที่ 2

1.5 <u>สตีรอยด์ฮอร์โมนที่ใช้คุมกำเนิด</u>

ยาฮอร์โมนคุมกำเนิดมีใช้ในรูปของยาเม็ด และยาฉีด ใช้ในการควบคุมการปฏิสนธิได้ผลดีมาก ในยาเม็ดประกอบด้วยสารสังเคราะห์ของพวกโปรเจสโตเจน และเอสโตรเจน ซึ่งมีในปริมาณน้อยๆ ฮอร์โมนเอสโตรเจน มีหน้าที่ช่วยควบคุมระยะเวลาของรอบเดือนและการขับประจำเดือน แม้ว่าสตีรอยด์ฮอร์โมนจากธรรมชาติจะมีผลต่อการคุมกำเนิดก็ตาม แต่ปัจจุบันนี้มีการศึกษาเกี่ยวกับสตีรอยด์ฮอร์โมนสังเคราะห์กันมากขึ้น และพบว่ามีสตีรอยด์สังเคราะห์หลายชนิดใช้คุมกำเนิดได้ผลดีโดยเฉพาะสตีรอยด์ที่ได้จากกลุ่มของ 19-nortestosterone และ 17α - hydroxyprogesterone [5] องค์ประกอบของสตีรอยด์ฮอร์โมนในยาเม็ดคุมกำเนิด โดยทั่วไปแล้วยาเม็ดคุมกำเนิดประกอบด้วยสารตัวยาที่เป็นองค์ประกอบหลัก 2 อย่าง คือ[1,2]

1.5.1 <u>สารประกอบเอสโตรเจน</u> ที่ใช้ในยาคุมกำเนิดเป็นเอสโตรเจนสังเคราะห์ มีฤทธิ์แรงกว่าพวกที่ได้จากธรรมชาติซึ่งสลายตัวได้ (ไม่มีฤทธิ์) เมื่อใช้รับประทาน มีการสังเคราะห์ขึ้นโดยขบวนการทางเคมี คือการใส่เอทธินิล กรุ๊ป ที่ C_{17} ของ oestradiol

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

เกิดเป็น ethinyloestradiol และเมทธิล อีเทอร์ (methyl ether) ที่ C_3 ของ ethinyloestradiol เกิดเป็น mestranol สารสังเคราะห์ทั้งสองชนิดนี้ใช้เป็นองค์ประกอบของยาเม็ดคุมกำเนิดกันมากในปัจจุบันนี้

1.5.2 สารประกอบโปรเจสโตเจน เป็นสตีรอยด์สังเคราะห์และใช้เป็นองค์ประกอบของยาเม็ดคุมกำเนิด แบ่งย่อยได้ 2 กลุ่ม ดังนี้

1.5.2.1 สารประกอบอนุพันธ์ของ 19-nortestosterone ที่สำคัญมี 5 ชนิด ได้แก่ norethynodrel,norethisterone (norethindrone),norethisterone acetate,lynoestrenol (ethinyl oestrenol),ethynodiol diacetate, norgestrel (d,l-norgestrel)และ d-norgestrel หรือ levonorgestrel

1.5.2.2 สารประกอบอนุพันธ์ของ 17 α-acetoxy progesterone สตีรอยด์ฮอร์โมนกลุ่มนี้ได้แก่ medroxyprogesterone acetate,megestrol acetate และ chlormadinone acetate

1.6 ชนิดของยาเม็ดคุมกำเนิด[2,6]

ยาเม็ดคุมกำเนิดที่นิยมใช้กันมากในปัจจุบันนี้ แบ่งได้ 4 ประเภท ดังนี้

1.6.1 ชนิดรวม (Combined pill) มีเอสโตรเจน และโปรเจสโตเจน รวมอยู่ในเม็ดเดียวกันและมีปริมาณตัวยาเท่ากันทุกเม็ด แผงละ 21-22 เม็ด หรือ 28 เม็ด มี 7 เม็ดหลังประกอบด้วยแลคโตส (lactose) หรือ ferrous fumerate ยาเม็ดคุมกำเนิดประเภทนี้เป็นที่นิยมกันมากที่สุดและให้ประสิทธิภาพเกือบ 100%

1.6.2 ชนิดเลียนแบบธรรมชาติ (Sequential) มีเอสโตรเจนอย่างเดียวใน 15-16 เม็ดแรกของแผง และ 5-6 เม็ดสุดท้ายของแผงมีเอสโตรเจน และโปรเจสโตเจน รวมอยู่ในเม็ดเดียวกัน ยาเม็ดชนิดนี้ให้ประสิทธิภาพประมาณ 98-99% ปัจจุบันเลิกใช้แล้ว เนื่องจากมีเอสโตรเจนในปริมาณสูงและมีผลข้างเคียงมาก

1.6.3 ชนิดที่มีฮอร์โมนอย่างเดียว (Single-entity) ที่มีขายอยู่ทั่วไปแบ่งย่อยได้ 2 อย่างคือ

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

1.6.3.1 Minipill หรือ Progestogen only pill ยาเม็ดคุมกำเนิดประเภทนี้ประกอบด้วยฮอร์โมนโปรเจสโตเจนอย่างเดียวเท่ากันทุกเม็ดแผงละ 35 เม็ด ไม่ค่อยนิยมใช้เนื่องจากให้ประสิทธิภาพในการคุมกำเนิดไม่ดีเท่ายาเม็ดชนิดรวมและพบว่ามีอาการข้างเคียงเกี่ยวกับความผิดปกติของประจำเดือนมากกว่ายาเม็ดชนิดรวม

1.6.3.2 Postcoital หรือ Morning-after pill ยาเม็ดคุมกำเนิดประเภทนี้ประกอบด้วยเอสโตรเจนเพียงอย่างเดียว เช่น Diethylstibestrol ซึ่งมีฤทธิ์คล้ายฮอร์โมนและใช้คุมกำเนิดได้ผลดีเช่นเดียวกัน

1.6.4 <u>ชนิดที่มีปริมาณฮอร์โมน 3 ขนาด</u> (Triphasic pill) ยาเม็ดคุมกำเนิดประเภทนี้เป็นชนิดใหม่ประกอบด้วยเอสโตรเจน และโปรเจสโตเจนรวมกันหรืออาจจัดเป็นยาเม็ดชนิดรวมก็ได้เพียงแต่มีขนาดของปริมาณฮอร์โมนต่างกัน 3 ระดับในแผงเดียวกัน

1.7 <u>ฤทธิ์ความแรงและผลข้างเคียงของยา</u> (Effective potency and Side effect)

สตีรอยด์ฮอร์โมนที่ใช้เป็นองค์ประกอบของยาเม็ดคุมกำเนิดมีฤทธิ์ความแรงแตกต่างกันตามชนิดของตัวยาฮอร์โมนที่ใช้เป็นองค์ประกอบในยาคุมกำเนิด การเลือกใช้ยาคุมอาจมีผลข้างเคียงเกิดขึ้น เนื่องจาก ยาที่ใช้มีปริมาณฮอร์โมนประเภทใดประเภทหนึ่งไม่เหมาะสม นอกจากจะมีผลข้างเคียงจากการใช้ฮอร์โมนสังเคราะห์ เช่น diethylstilbestrol ซึ่งนิยมใช้กันมากเพราะว่ามีราคาถูกและหาได้ง่ายและฮอร์โมนสังเคราะห์ประเภท progesterone หลายชนิดแล้ว สตรีผู้ใช้ยาคุมกำเนิดอาจมีผลข้างเคียงอีกหลายอย่างจากการเลือกใช้ยาคุมผิดประเภทและถ้าองค์ประกอบของสตีรอยด์ฮอร์โมนมีปริมาณของตัวยาไม่ตรงตามขนาดที่ระบุไว้ก็อาจเป็นอันตรายต่อผู้ใช้ยามากยิ่งขึ้น (2,7)

1.8 <u>การพัฒนาวิธีการวิเคราะห์สตีรอยด์ฮอร์โมน</u>

การวิเคราะห์สตีรอยด์ได้รับการพัฒนามากขึ้นเรื่อยๆ นักชีวเคมีได้ทำการศึกษาสตีรอยด์ใน biological media เป็นกลุ่มแรก วิธีนี้เรียกว่า Biological assay เริ่มต้นจากขั้นตอนการแยก (isolation) สตีรอยด์ฮอร์โมนที่มีอยู่ในอวัยวะของสัตว์และในน้ำปัสสาวะซึ่งมีความเข้มข้นของสารประกอบสตีรอยด์ในปริมาณน้อยๆ แล้วนำมาทำให้บริสุทธิ์ (purification) การศึกษาสตีรอยด์ฮอร์โมนในช่วงแรกๆ สามารถแบ่งวิธีการวิเคราะห์ได้ 3 กลุ่ม คือ (1)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

(ก) การวิเคราะห์สตีรอยด์ในทางชีวคลีนิค (bioclinical)

(ข) การวิเคราะห์สตีรอยด์ฮอร์โมนที่ใช้เป็นองค์ประกอบของยาและสตีรอยด์ในระดับอุตสาหกรรม และ

(ค) การพิสูจน์โครงสร้างของสตีรอยด์ (structure elucidation)

การวิเคราะห์ยาที่ประกอบด้วยสตีรอยด์ฮอร์โมนในระดับอุตสาหกรรมนั้น ได้ศึกษาทั้งทางด้านคุณภาพวิเคราะห์ (qualitative analysis) และด้านปริมาณวิเคราะห์ (quantitative analysis) เพื่อตรวจสอบหาปริมาณของสิ่งเจือปนต่างๆ (impurity) ผลิตภัณฑ์ที่เกิดจากการสลายตัวของตัวยาในตัวอย่างยาสำเร็จรูป เช่น วิเคราะห์หาสารตั้งต้น หรือ สารตัวกลาง ของสตีรอยด์ฮอร์โมนสังเคราะห์ เป็นต้น

งานวิจัยผลิตภัณฑ์ยาในทางเภสัชกรรมและอุตสาหกรรมการผลิตยาสำเร็จรูป มีจุดประสงค์ดังนี้(1)

- เพื่อผลิตสารที่มี functional group และสารตัวกลางชนิดใหม่ๆ ซึ่งมีปัญหาต่อการวิเคราะห์เมื่อก่อน
- เพื่อต้องการให้ผลิตภัณฑ์ยามีคุณภาพดีขึ้น เนื่องจากวิธีดั้งเดิม (classical method) ให้ผลการวิเคราะห์ไม่ดีเหมือนกับวิธีวิเคราะห์แบบใหม่ ทั้งในด้านความจำเพาะ และความถูกต้อง
- เพื่อต้องการวิเคราะห์หาสิ่งเจือปนต่างๆ ซึ่งมีในปริมาณน้อยๆ ได้ถูกต้องมากขึ้น
- เพื่อต้องการศึกษาถึงเสถียรภาพของส่วนผสมของยาสำเร็จรูปที่เก็บไว้นานๆ หรือที่เตรียมขึ้นใหม่

โดยทั่วไปแล้ว การวิเคราะห์สารประกอบสตีรอยด์ แบ่งออกได้ 2 ประเภทใหญ่ๆ ดังนี้

1.8.1 <u>การวิเคราะห์ทางคุณภาพของสตีรอยด์ฮอร์โมน</u> ในการศึกษาคุณภาพวิเคราะห์หรือการพิสูจน์เอกลักษณ์ (identification) จากการวิจัยสตีรอยด์ฮอร์โมนในช่วงแรกๆ (ปี 1930) จะเป็นการพิสูจน์โครงสร้างของสตีรอยด์ฮอร์โมน เริ่มจากการแยกและการทำ

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ให้บริสุทธิ์แล้วนำผลึกสารที่ได้มาพิสูจน์หาโครงสร้างโดยวิธีทางเคมี เช่น การสลายสาร (degradation) การนำมาสังเคราะห์เพิ่มเติม (semi-synthesis) หรือ การสังเคราะห์ขึ้นใหม่ (total synthesis) ในปี 1953 มีรายงานการพัฒนาวิธีทางกายภาพ (physical method) เช่น ultraviolet (UV) และ infrared spectroscopy (IR) ต่อมามีการพัฒนาเครื่องมือเพิ่มขึ้นและมีการนำเทคนิค mass spectrometry (MS) มาใช้วิเคราะห์หาโครงสร้างสารประกอบอินทรีย์และวิธีนี้ถือว่าเป็นวิธีที่สำคัญในการวิเคราะห์หาโครงสร้างของสารประกอบสตีรอยด์ นอกจากนี้มีเทคนิคอื่นๆ เช่น nuclear magnetic resonance spectrometry (NMR) และ X-ray diffraction เป็นต้น วิธีโครมาโตกราฟีแผ่นเคลือบบาง (thin-layer chromatography; TLC) จัดเป็นวิธีที่สำคัญอีกอย่างหนึ่งในการใช้ตรวจสอบคุณภาพวิเคราะห์สตีรอยด์ฮอร์โมน ตัวอย่างเช่น การนำผลึกของสารตัวอย่างหรือสารที่แยกได้จากวิธีโครมาโตกราฟี มาศึกษาโครงสร้างโดยใช้เทคนิคดังกล่าวแล้วนำข้อมูลทั้งหมดมาวิเคราะห์ร่วมกัน การวิเคราะห์ยาสตีรอยด์ฮอร์โมนในทางเภสัชกรรม สามารถทำได้ในลักษณะเดียวกัน(1)

1.8.2 <u>การวิเคราะห์หาปริมาณของสตีรอยด์ฮอร์โมน</u> ในปัจจุบันนี้ มีการใช้วิธีทางสเปคโตรโฟโตเมตรี (spectrophotometry) ในการวิเคราะห์หาปริมาณตัวยาฮอร์โมนกันอย่างแพร่หลาย เทคนิคที่นิยมใช้กันมากที่สุด คือวิธีอุลตราไวโอเลท-วิซิเบิล (ultraviolet-visible) โดยอาศัย ปฏิกิริยาทางเคมี (chemical reactions) ต่อมาได้มีการพัฒนาวิธีวิเคราะห์ให้มีความจำเพาะมากขึ้น เช่น การใช้วิธีสเปคโตรโฟโตเมตรี หรือ คัลลอริเมตรี (colorimetry) ร่วมกับเทคนิคการแยกทางโครมาโตกราฟี เป็นต้น นอกจากนี้มีการใช้เทคนิคทางแสง (optical technique) และเทคนิคทางเคมีไฟฟ้า (electrochemical technique) เช่น วิธีฟลูออริเมตรี และวิธีโพลาโรกราฟี ตามลำดับ

เทคนิคโครมาโตกราฟีได้รับการพัฒนามากขึ้นเรื่อยๆ และมีการประยุกต์ใช้วิเคราะห์หาปริมาณสตีรอยด์ฮอร์โมนในผลิตภัณฑ์ยา เช่น วิธีโครมาโตกราฟีก๊าซ (Gas Chromatography; GC) หรือโครมาโตกราฟีของเหลว (Liquid Chromatography;LC) โดยเฉพาะอย่างยิ่ง วิธีโครมาโตกราฟีของเหลวแบบสมรรถนะสูง (High Performance Liquid Chromatography ; HPLC)(1) ดังจะกล่าวถึงรายละเอียดเกี่ยวกับหลักการ เครื่องมือ และการประยุกต์ใช้วิเคราะห์คุณภาพและปริมาณสตีรอยด์ฮอร์โมนบางชนิดในตัวอย่าง

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ยาเม็ดคุมกำเนิดในบทต่อไป

1.9 การวิเคราะห์สตีรอยด์ฮอร์โมนโดยวิธีต่างๆ

จากการตรวจเอกสารในด้านการวิเคราะห์หาปริมาณตัวยาสตีรอยด์หรือ ยาฮอร์-โมนชนิดต่างๆ ในตัวอย่างยาเตรียมและยาคุมกำเนิด โดยใช้เทคนิคต่างๆหลายวิธี ซึ่งแต่ละวิธีมีทั้งข้อดีและข้อจำกัดต่างกัน การเลือกใช้วิธีวิเคราะห์ที่เหมาะสมนั้นขึ้นอยู่กับลักษณะของงานวิจัยและปริมาณสารที่จะวิเคราะห์รวมถึงความพร้อมของเครื่องมือและทุนทรัพย์ในงานวิจัยนั้นๆด้วย ในที่นี้จะนำเสนอวิธีวิเคราะห์หาปริมาณสตีรอยด์ฮอร์โมนต่างๆ โดยย่อดังต่อไปนี้

1.9.1 วิธีกราวิเมตรี (Gravimetric method)

มีการใช้วิธีกราวิเมตรีวิเคราะห์หาสตีรอยด์ฮอร์โมน เช่น การวิเคราะห์หา ketosteroid โดยการตกตะกอนกับ 2,4 -dinitrophenylhydrazine หรือ semicarbazone วิธีนี้ใช้เวลาวิเคราะห์นาน (time-consuming) และใช้สารตัวอย่างปริมาณมากกว่าวิธีอื่น ปัจจุบันไม่ใช้วิธีนี้วิเคราะห์สตีรอยด์ฮอร์โมน เนื่องจากมีการพัฒนาเทคนิคอื่นๆ ที่ให้ผลดีกว่า[1]

1.9.2 วิธีไตตริเมตรี (Titrimetric method)

มีการศึกษาเอทธินิลสตีรอยด์ โดยใช้วิธี argento-acidimetric titration และมีการไตเตรทหาคาร์บอนิล (carbonyl) และเอมีน กรุ๊ป (amine group) ในโครงสร้างของสตีรอยด์[1] มีการวิเคราะห์สตีรอยด์ฮอร์โมนบางชนิดโดยการใช้ copper picrate ทำให้เกิดสารประกอบเชิงซ้อน[8] และมีการไตเตรทหาออกโซสตีรอยด์ฮอร์โมน (oxosteroid hormone)บางชนิด โดยการเปลี่ยนสตีรอยด์เหล่านี้ให้อยู่ในรูปออกซิม (oximes)[9] อย่างไรก็ตามวิธีนี้ไม่ค่อยนิยมใช้วิเคราะห์สตีรอยด์ในด้านชีวคลีนิค เนื่องจากสตีรอยด์ฮอร์โมนและสารตัวกลางที่เจือปนอยู่นั้นไม่มี functional group ที่เหมาะสมกับวิธีการไตเตรทโดยตรง (direct titration) และต้องใช้สารตัวอย่างในปริมาณมากๆ อีกด้วย ดังนั้น วิธีนี้จึงไม่มีบทบาทสำคัญในการวิเคราะห์สตีรอยด์ฮอร์โมนในยาเตรียม

1.9.3 วิธีการใช้สารรังสีเคมี (Radiochemical method)

จากการพัฒนาวิธีวิเคราะห์สตีรอยด์ฮอร์โมนในด้านชีวคลีนิคโดยใช้สาร

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

radioactive isotope จัดเป็นวิธีที่ค่อนข้างใหม่และให้ผลการวิเคราะห์ที่มีความไวสูงวิธีหนึ่ง สามารถวิเคราะห์ได้ต่ำถึง 0.00005 ไมโครกรัม อาจเรียกว่า ultramicro - scale[1] และใช้วิเคราะห์เสถียรภาพขององค์ประกอบในยาเตรียมได้ผลดี มีรายงานการใช้วิธีนี้วิเคราะห์หาปริมาณสตีรอยด์ฮอร์โมนกันมาก โดยเฉพาะงานวิจัยทางการแพทย์ เช่น Stoner et al. ได้ใช้วิธี radio immunoassay (RIA) วิเคราะห์หาอะดรีนอล สตีรอยด์ (adrenal steroid) หลังจากผ่านขั้นตอนทำให้บริสุทธิ์ด้วยคอลัมน์โครมาโตกราฟีก่อน เปรียบเทียบผลการทดลองที่ได้จากวิธี HPLC[10]

1.9.4 <u>วิธีวัดค่าการดูดกลืนแสงอุลตราไวโอเลทโดยตรง</u>[1] (Direct ultraviolet spectrophotometry)

วิธี UV เป็นเทคนิคหนึ่งที่นิยมใช้กันมากในการพิสูจน์เอกลักษณ์และหาปริมาณสตีรอยด์ฮอร์โมนทั้งที่อยู่ในส่วนผสมของยาเตรียมและสารตัวกลางที่เกิดขึ้นในขบวนการผลิต วิธีนี้มีข้อดีคือ ทำได้ง่าย ให้ข้อมูลจากการอ่านค่าการดูดกลืนแสง (absorbance) โดยตรง และใช้เครื่องมือที่มีราคาถูก แต่มีข้อเสียที่ว่าให้ผลที่ไม่จำเพาะและมีความไวต่ำ รวมทั้งต้องผ่านขั้นตอนการแยก หรือทำให้บริสุทธิ์ก่อนนำมาวัด เทคนิคนี้อาศัยหลักการพื้นฐานของการดูดกลืนแสง UV ของ functional group ที่มีอยู่ในโครงสร้างของสตีรอยด์และศึกษาค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่นสูงสุด (maximum wavelength; λ_{max}) ของสารนั้นๆ โดยใช้ความเข้มของแสงและค่า absorptivity (ε) เป็นตัวกำหนด ในกรณีที่สตีรอยด์ไม่ดูดกลืนแสง UV ก็สามารถวิเคราะห์ได้โดยทำให้อยู่ในรูปของสารประกอบอนุพันธ์ของสารประกอบที่ดูดกลืนแสง UV ได้ก่อน อย่างไรก็ตามการวิเคราะห์หาปริมาณสารโดยวิธีวัดค่าการดูดกลืนแสง UV โดยตรงนี้มักไม่ค่อยนิยมทำกันมากนัก แต่จะใช้วิเคราะห์ด้านคุณภาพมากกว่า

1.9.5 <u>วิธีคัลลอริเมตรี</u> [1] (Colorimetric method)

มีการตรวจสอบและหาปริมาณสารโดยใช้ปฏิกิริยาการเกิดสี (colour reaction) เพื่อวิเคราะห์หาสตีรอยด์ฮอร์โมนในยาตัวอย่างโดยเทคนิคคัลลอริเมตรี โดยใช้สารตัวอย่างทำปฏิกิริยากับกรดเข้มข้นหรือฮาไลด์ของโลหะต่างๆ (metal halide) แล้วเกิดเป็นผลิตภัณฑ์ที่มีสีหรือเรืองแสงได้ เช่น การวิเคราะห์หา lynoestrenol ในยาเม็ด โดยใช้รีเอเจนท์ (reagent) ที่เป็นส่วนผสมของ H_2SO_4: H_2O(4:1,v/v) หลังจากที่แยกสตีรอยด์โดยวิธี TLC แล้วนำมาละลายในกรดอะซิติกและวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ λ_{max} 515nm

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

มีการใช้ triphenyl tetrazolium chloride เป็นรีเอเจนท์วิเคราะห์หา diethyl stilbestrol ซึ่งเป็นฮอร์โมนที่มีโครงสร้างไม่เป็นสตีรอยด์ (nonsteroidal hormones) และใช้ 4- hydrazinobenzene sulfonic acid เป็นรีเอเจนท์วิเคราะห์หา ethinyloestradiolในตัวอย่างยาสำเร็จรูปและมีการใช้ diazotized sulfathiazole หรือ sulfanilic acid เป็นรีเอเจนท์วิเคราะห์หา ethinyloestradiol โดยทำให้เกิดเป็นสารผลิตภัณฑ์ที่มีสี[11] เนื่องจากเทคนิคคัลลอริเมตรีเป็นการทำให้เกิดสีโดยเฉพาะ Kober reaction ซึ่งใช้วิเคราะห์หาสารประกอบเอสโตรเจน ให้ผลที่มีความไวค่อนข้างต่ำ และเหมาะสำหรับการวิเคราะห์สารตัวอย่างที่มีปริมาณมากๆ(มิลลิกรัม) ส่วนการวิเคราะห์สารประกอบโปรเจสโตเจน เช่น norethisterone โดยใช้สารตัวอย่างทำปฏิกิริยากับ isonicotinic acid hydrazide อย่างไรก็ตามเทคนิคคัลลอริเมตรีมีปัญหาสำคัญคือ ยังขาดความจำเพาะในสภาพที่มีสตีรอยด์อื่นๆปนอยู่[12,13]

1.9.6 <u>วิธีฟลูออริเมตรี</u> (Fluorimetric method)

เทคนิคฟลูออริเมตรี คือ การวัดความเข้ม และสเปกตรัมของแสงเรืองแสง (fluorescence) สามารถใช้วิเคราะห์ทั้งทางคุณภาพและหาปริมาณ ต่อมาเทคนิคนี้ได้รับการพัฒนาเครื่องมือให้มีความจำเพาะ และความไวมากขึ้นเรียกว่าวิธีสเปคโตรฟลูออริเมตรี (spectrofluorimetric method) ซึ่งสามารถวิเคราะห์หาปริมาณสารได้ต่ำถึง 0.01 ไมโครกรัม มีการประยุกต์เทคนิคนี้ใช้วิเคราะห์หาเอสโตรเจนให้แสงเรืองในช่วง UV ในสภาพที่มีตัวทำละลายที่เหมาะสมและนำมาวิเคราะห์หาสตีรอยด์ที่เป็นองค์ประกอบของยาเตรียม เช่น ethinyloestradiol และ mestranol ได้ผลการวิเคราะห์มีความไวสูงกว่าวิธีสเปคโตรโฟโตเมตรีถึง 2-3 เท่า และเป็นข้อดีของเทคนิคนี้ในการใช้วิเคราะห์องค์ประกอบในยาเม็ดซึ่งมีสารตัวยา (ingredient) ในปริมาณน้อยๆ[1] James วิเคราะห์หา ethinyloestradiol ในยาเม็ดโดยใช้วิธีของ Lieberman-Burchard (λ_{ex} 324 nm , λ_{em} 400 nm)[13] Miller และ Duguid วิเคราะห์หาเอสโตรเจนในยาเม็ดคุมกำเนิดโดยใช้ hydroquinone 0.2% ใน H_2SO_4-EtOH (70:30,v/v) เป็นรีเอเจนท์ และวัดที่ λ_{ex} 542 nm และ λ_{em} 560 nm [14] Hirai <u>et al</u>. วิเคราะห์หา ethinyloestradiol ในสภาพที่มี norethindrone ปนอยู่โดยใช้ NaOH 4% ใน EtOH+ H_2SO_4 80% เป็นรีเอเจนท์ และวัดที่ λ_{ex} 460 nm และ λ_{em} 490 nm [15]

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

นอกจากนี้มีการวิเคราะห์หาโปรเจสโตเจน เช่น การวิเคราะห์หา norgestrel โดยใช้ H_2SO_4 85%(v/v) เป็นรีเอเจนท์เพื่อทำให้เกิด fluorophore และวัดแสงเรืองหลังจากเจือจางด้วยน้ำเป็น 38%[16] อย่างไรก็ตามวิธีฟลูออริเมตรีไม่สามารถใช้วิเคราะห์ส่วนผสมทั้งโปรเจสโตเจน และเอสโตรเจนได้พร้อมกัน เนื่องจากสารประกอบโปรเจสโตเจนจะยับยั้ง (inhibit) หรือบดบัง (quench) การเกิดแสงเรือง[12] วิจิตรรัก ได้ใช้เทคนิคสเปคโตรฟลูออริเมตรีวิเคราะห์หา ethinyloestradiol ในยาเม็ดคุมกำเนิด โดยใช้ ferric sulfate เข้มข้น 10 ppm. ใน H_2SO_4 65% เป็นรีเอเจนท์ และวัดความเข้มของแสงที่ λ_{em} 525 nm หลังจากที่ใช้ λ_{ex} 468 nm และสามารถวิเคราะห์สารได้ต่ำถึง 0.04 ppm [17]

1.9.7 <u>วิธีโพลาโรกราฟี</u> (Polarographic method)

มีการประยุกต์ใช้วิธีโพลาโรกราฟีวิเคราะห์สตีรอยด์ Sartori และ Bianchi ได้วิเคราะห์ ethisterone และ methyl testosterone ในยาสตีรอยด์เป็นครั้งแรก[1] เทคนิคนี้มีหลักการพื้นฐานที่ว่า สตีรอยด์ที่มีคีโตน กรุ๊ปจะถูกรีดิวซ์ (reduce) ที่หยด ปรอท เช่น สารประกอบที่มี α,β -unsaturated ketone เป็นต้น มีการวิเคราะห์หาโปรเจสโตเจนในยาเม็ดคุมกำเนิดโดยวิธี differential pulse polarography (DPP) หลังจากสกัด norethisterone หรือที่อยู่ในรูปของเกลืออะซิเตต (acetate) หรือ dimethisterone และ norgestrel ด้วย EtOH 95% แล้วปรับ pH ให้เหมาะสมและบันทึกโพลาโรแกรม (polarogram) ที่ -1.0 ถึง -1.95 โวลท์ vs SCE[18] นอกจากนี้มีการใช้ DPP วิเคราะห์หาปริมาณ norgestrel และ norethisterone และสตีรอยด์-ฮอร์โมนอื่นๆในตัวอย่างยาเตรียม โดยไม่ถูกรบกวนจากสิ่งเจือปนอื่นๆในเม็ดยา (excipients) แต่อย่างใด แม้ว่าจะวิเคราะห์สารที่มีปริมาณน้อยๆก็ตาม อย่างไรก็ตามเทคนิคนี้ยังต้องการใช้สารตัวอย่างปริมาณเป็นมิลลิกรัม เนื่องจากมีความไวยังไม่สูงพอและผ่านขั้นตอนการสกัด การทำให้บริสุทธิ์ขึ้น เช่น การตกตะกอน การใช้วิธี ultrafiltration ในการเตรียมสารตัวอย่าง (sample treatment) ซึ่งต้องใช้เวลานานและมีขั้นตอนการทดลองยุ่งยากมากขึ้น[11,19]

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

1.9.8 เทคนิคทางโครมาโตกราฟี[1] (Chromatographic technique)

มีการประยุกต์ใช้วิธีโครมาโตกราฟีวิเคราะห์ผลิตภัณฑ์ยากันอย่างแพร่หลาย โดยเฉพาะในงานด้านการวิเคราะห์ยาสตีรอยด์ฮอร์โมน ใช้พิสูจน์เอกลักษณ์ของสารและใช้วิเคราะห์หาปริมาณของสตีรอยด์ที่มีโครงสร้างคล้ายๆกัน และแตกต่างกันเฉพาะ configuration ของ substituent เท่านั้น สามารถใช้ตรวจสอบความบริสุทธิ์ของผลิตภัณฑ์และสารตัวกลาง

เทคนิคทางโครมาโตกราฟี ซึ่งใช้วิเคราะห์หาปริมาณสตีรอยด์ฮอร์โมนแบ่งออกได้ดังนี้

1.9.8.1 โครมาโตกราฟีคอลัมน์แบบพาร์ติชั่น และแบบใช้เจล[1]

(Partition column and Gel chromatography)

Wu ใช้วิธีโครมาโตกราฟีคอลัมน์แบบพาร์ติชั่น เพื่อแยก ethinyloestradiol ออกจากสารประกอบโปรเจสโตเจนในยาเม็ดคุมกำเนิด และมีรายงานการแยก mestranol ออกจาก ethynodiol diacetate โดยใช้ dimethyl sulphoxide formamide เป็น stationary phase จะได้ ethynodiol diacetate แยกออกมาก่อนโดยใช้ n-heptane แล้วตามด้วย mestranol จากนั้นนำฮอร์โมนเอสโตรเจนนี้มาวิเคราะห์ต่อโดยวิธีคัลลอริเมตรี

Fernandez และ Noceda ได้ใช้ Sephadex LH-20 เพื่อแยกหาปริมาณโปรเจสโตเจน และเอสโตรเจนในยาเม็ดคุมกำเนิดร่วมกับวิธีอุลตราไวโอเลท สเปคโตรโฟโตเมตรี

1.9.8.2 โครมาโตกราฟีกระดาษและแผ่นเคลือบบาง (Paper and Thin-layer chromatography)

มีการประยุกต์ใช้วิธีโครมาโตกราฟีกระดาษแยกสตีรอยด์น้อยกว่าวิธีอื่นเนื่องจากมีปัญหาเกี่ยวกับการเตรียม stationary phase บนแผ่นกระดาษที่ใช้ และสตีรอยด์มีคุณสมบัติเป็น lipophilic มากเกินไปจึงไม่เหมาะที่จะนำมาแยกด้วยวิธี PC ส่วนวิธี TLC ยังเป็นที่นิยมกันมาก เนื่องจากเป็นวิธีที่ทำได้ง่ายและรวดเร็วใช้เครื่องมือและอุปกรณ์ที่มีราคาถูก และยังสามารถประยุกต์ใช้งานร่วมกับเทคนิคอื่นๆ ได้ อย่างไรก็ตามวิธี TLC ก็มีข้อจำกัด คือให้ความไวต่ำและต้องใช้ปริมาณสารที่สนใจหรือปริมาณสิ่งเจือปนต่างๆ ในระดับ 1-2% จึงจะ

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ใช้วิธีนี้ตรวจสอบได้ อีกทั้งการวิเคราะห์หาปริมาณให้ผลไม่ละเอียดเท่ากับวิธีอื่น[1] ปัจจุบันวิธี TLC ได้รับการพัฒนามากขึ้น ทั้งระบบ adsorption และ reversed-phase TLC และ high-performance thin-layer chromatography(HPTLC) ในการประยุกต์ใช้วิเคราะห์สตีรอยด์ เช่น การแยกสตีรอยด์ที่ปะปนอยู่ใน chlormadinone acetate และ oestriol มีการใช้ HPTLC แยกและหาปริมาณสตีรอยด์ฮอร์โมนชนิดต่างๆและกล่าวถึงขั้นตอนของการสกัดและวิธีใช้แยก รวมทั้งข้อดีของวิธีนี้ เช่น เวลา ความไว และความจำเพาะเป็นต้น มีการใช้วิธี TLC ระบบต่างๆเพื่อศึกษาพฤติกรรมการสลายตัว (degradation behavior) ของสาร ethinyloestradiol และยาชนิดอื่นๆ พบว่าการใช้แผ่นซิลิกา (silica plate) ที่มี calcium carbonate ปนอยู่จะให้ผลการวิเคราะห์ดีที่สุด[19] และมีการใช้ densitometric detection ร่วมกับวิธี TLC เพื่อวิเคราะห์หา ethinyl-oestradiol[20]

1.9.8.3 โครมาโตกราฟีก๊าซ (Gas chromatography)

มีวิธีการนำเทคนิคโครมาโตกราฟีก๊าซ-ของเหลว (gas-liquid chromatography;GLC) มาใช้วิเคราะห์โปรเจสโตเจน และเอสโตรเจนในยาเม็ดคุมกำเนิดมานานแล้ว โดยทำให้เกิดเป็นสารอนุพันธ์ หรือได้จากการสกัดโดยตรงจากตัวอย่างยาเม็ดคุมกำเนิด แต่เทคนิค GLC มีข้อจำกัดคือมีการเกิดการสลายตัวโดยความร้อน (thermal decomposition) เช่น oestradiol สลายตัวกลายเป็น oestrone และการแยกโปรเจสโตเจน และเอสโตรเจนออกจากกันได้ค่อนข้างยาก โดยเฉพาะเมื่อสตีรอยด์ทั้งสองชนิดมีความเข้มข้นต่างกันเพียง 10-20 เท่าในยาเม็ดคุมกำเนิด[21] อย่างไรก็ตาม การวิเคราะห์สตีรอยด์ฮอร์โมนโดยวิธี GLC ก็ยังมีข้อดีเหนือกว่าวิธีทางเคมีแบบอื่นๆ คือทำได้รวดเร็ว มีความไวสูง และมีความจำเพาะสูง เนื่องจากวิธีทางเคมีแบบเก่าที่ใช้วิเคราะห์สตีรอยด์ฮอร์โมนมีขั้นตอนการวิเคราะห์ยุ่งยากและใช้เวลาวิเคราะห์นานกว่าทำให้การวินิจฉัยโรคล่าช้าได้[22] มีการใช้วิธี GC/MS วิเคราะห์หาปริมาณ esterified และ conjugated oestrogen ในยาเม็ดหลังจากทำ fluoracetyl derivative นอกจากนี้มีนักวิจัยหลายกลุ่มได้ใช้วิธี GC วิเคราะห์สตีรอยด์ฮอร์โมน ในยาเม็ดคุมกำเนิด เช่น การวิเคราะห์หา lynoestrenol เป็นต้น[15]

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

1.9.8.4 <u>โครมาโตกราฟีแบบแรงเหวี่ยง</u> (Centrifugal chromatography)

มีการใช้แรงเหวี่ยงร่วมกับวิธีโครมาโตกราฟีเพื่อแยกสตีรอยด์ฮอร์โมนซึ่งมีซิลิกาเจล (silica gel) เป็นตัวดูดซับแล้วตรวจสอบสตีรอยด์ที่แยกได้โดยการอุ่นในกรดซัลฟูริคและตรวจวัดด้วยแสง UV(366 nm)วิธีนี้ทำได้ง่ายและให้ผลเชื่อถือได้ เครื่องมือที่ใช้แยกระบบนี้ เรียกว่า "Centri-chrom" (23)

1.9.8.5 <u>การวิเคราะห์หาปริมาณสตีรอยด์ฮอร์โมนโดยวิธีโครมาโตกราฟีของเหลวแบบสมรรถนะสูง</u> (Analysis of steroid hormone by HPLC)

ในช่วง 10 ปีที่ผ่านมา มีการนำวิธีโครมาโตกราฟีของเหลวในรูปแบบใหม่ๆมาใช้ในห้องปฏิบัติการเพื่อวิเคราะห์สารตัวอย่างกันมาก(24) โดยเฉพาะอย่างยิ่งวิเคราะห์สารประกอบทางชีวเคมี(25) การวิเคราะห์ตัวยาใน biological sample วิธีวิเคราะห์แบบดั้งเดิม ซึ่งมีขั้นตอนหลายอย่าง เช่นการผสมให้เป็นเนื้อเดียวกัน (homogenisation) การสกัดด้วยตัวทำละลาย (solvent extraction) การทำให้บริสุทธิ์ การทำให้เข้มข้นขึ้น (concentration) การทำให้เกิดสี (colorisation) หรือการทำให้อยู่ในรูปสารอนุพันธ์แล้วตรวจวัดโดยใช้วิธีอุลตราไวโอเลท-วิซิเบิล สเปคโตรโฟโตเมตรี หรือวิธีสเปคโตรฟลูออริเมตรี แต่ถ้าใช้วิธี HPLC แล้วจะมีขั้นตอนแทนการวิเคราะห์เหล่านี้ ขั้นตอนการเตรียมสารตัวอย่างดังกล่าว และมีข้อดีของวิธี HPLC สำหรับการวิเคราะห์ biological sample หรือใช้ในการควบคุมคุณภาพของผลิตภัณฑ์ยา คือทำได้รวดเร็วในการแยกสารผสมออกจากกันได้ดี ประยุกต์ใช้วิเคราะห์สารตัวอย่างได้กว้างขวางและมีขั้นตอนการทำ pre - treatment สารตัวอย่างได้ง่าย เช่น การกรอง (filtration) การเหวี่ยงใส (centrifugation) แล้วฉีดสารตัวอย่างเข้าเครื่อง HPLC โดยตรง ส่วนมากแล้วมักจะใช้วิเคราะห์ยาซึ่งตัวยาไม่เกาะแน่นกับองค์ประกอบอื่นในสารตัวอย่าง (sample matrix)(26) ปัจจุบันนี้จึงนิยมใช้วิธี HPLC วิเคราะห์หาปริมาณสตีรอยด์ฮอร์โมนกันมาก เนื่องจากมีตัวยาในปริมาณน้อยๆ ระดับมิลลิกรัมถึงไมโครกรัม และวิธี HPLC สามารถวิเคราะห์แยกสารที่สนใจหลายๆตัวได้พร้อมๆกันในเวลาอันรวดเร็ว เมื่อก่อนใช้วิธี RIA ซึ่งให้ผลการวิเคราะห์ถูกต้องแม่นยำวิธีหนึ่งแต่อาจจะไม่มีความจำเพาะเสมอไป เนื่องจากสารที่จะวิเคราะห์อาจเกิดปฏิกิริยา

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

กับสตีรอยด์อื่นๆได้ (cross-reat) และเสียเวลาในการวิเคราะห์[10]

จากการตรวจเอกสารพบว่ามีการประยุกต์ใช้วิธี HPLC วิเคราะห์หาปริมาณสาร และศึกษาพฤติกรรมการแยก (chromatographic behavior) ของสตีรอยด์ฮอร์โมนหรือสตีรอยด์กลุ่มอื่นๆ ทั้งที่เป็นสตีรอยด์จากธรรมชาติและสตีรอยด์สังเคราะห์แนวทางของงานวิเคราะห์สตีรอยด์ทั้งหลาย ส่วนมากจะเกี่ยวข้องกับการพัฒนาวิธีการแยกและชนิดของสตีรอยด์ที่ต้องการศึกษา เป็นต้นว่า การเลือกใช้คอลัมน์ที่เหมาะสม ชนิดของเครื่องตรวจวัดและชนิดของสาร ตัวอย่างที่มีสารที่จะวิเคราะห์ปนอยู่มีการศึกษาวิธีการแยกสตีรอยด์ฮอร์โมนที่มีโครงสร้างคล้ายคลึงกัน 4 กลุ่มคือ เอนโดรเจน เอสโตรเจน โปรเจสโตเจน และอะดรีนอล คอร์ติโคสตีรอยด์ (adrenal corticosteroid)[27] Henry et al. ได้วิเคราะห์สตีรอยด์และสารอนุพันธ์ของสตีรอยด์[28] และมีการใช้ dansyl derivative ในการวิเคราะห์เอสโตรเจนในยาเม็ดและยาฉีดโดยวิธี HPLC ร่วมกับ fluorescence detector[29-30] Roos ได้ศึกษาพฤติกรรมการแยกเอสโตรเจนชนิดต่างๆ ที่ได้จากธรรมชาติจำนวน 9 ชนิดโดยใช้ทั้งระบบ normal phase และ reversed-phase partition HPLC ซึ่งแยกด้วยคอลัมน์ต่างชนิดกัน 5 แบบ และตรวจสอบสารที่แยกได้ด้วย UV detector และรายงานว่า reversed-phase LC ใช้แยกสารดังกล่าวได้ดีกว่า[31]

Cochran et al. ได้รายงานการพัฒนาเทคนิค HPLC เพื่อใช้วิเคราะห์หาปริมาณ testosterone ในระดับนาโนกรัมจาก biological sample เปรียบเทียบผลที่ได้กับเทคนิค GLC และเสนอว่าวิธีนี้ใช้วิเคราะห์สารได้รวดเร็วให้ผลถูกต้องแม่นยำ ไม่ต้องใช้ความชำนาญมากและมีความจำเพาะต่อการวิเคราะห์อีกด้วย[32] มีการวิเคราะห์ esterified estrogen ใน bulk mixture และยาเตรียมโดยใช้วิธี HPLC เปรียบเทียบผลที่ได้กับวิธีคัลลอริเมตรี[33] และวิเคราะห์ diethylstilbestrol และสิ่งเจือปนอื่นๆในยาเม็ดโดยใช้วิธี reversed-phase HPLC เปรียบเทียบผลที่ได้กับวิธีสเปคโตรโฟโตเมตรี[34]

O'Hare et al. ได้ศึกษาพฤติกรรมการแยกโดยใช้ reversed และ normal phase HPLC วิเคราะห์ 18-hydroxylated steroids และสตีรอยด์ที่อยู่ในรูปอนุพันธ์จาก biological sample[35] และ Hoeven ทำการแยกสารที่เป็น metabolite

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ของ hydroxy testosterone จากสารตัวอย่างลักษณะเดียวกันนี้โดยใช้วิธี HPLC ระบบ reversed-phase[36]

Lin และ Heftmann วิเคราะห์เอสโตรเจนที่ได้จากธรรมชาติจำนวน 24 ชนิดเพื่อศึกษาพฤติกรรมการแยกโดยการเปรียบเทียบการใช้วิธี HPLC ทั้งระบบ adsorption และ reversed-phase partition ต่อมาในปี 1982 ได้ตีพิมพ์งานวิเคราะห์แยกสารประกอบเอนโดรเจนทั้งหมด 69 ชนิดเพื่อเปรียบเทียบพฤติกรรมการแยกโดยใช้วิธี HPLC ทั้ง 2 ระบบ[37] Walters et al. ได้แยก progesterone และ metabolite ของมันโดยวิธี gradient และตามด้วยวิธี isocratic phase HPLC[38]

Asmus และ Landis ได้วิเคราะห์สตีรอยด์ในผลิตภัณฑ์ยารวม (bulk pharmaceutical) โดยใช้วิธี LC ร่วมกับ light scattering detector ทั้งระบบ LSC และ LLC เปรียบเทียบผลที่ได้กับ UV detector (254 nm) และรายงานว่าเครื่องตรวจวัดแบบใหม่นี้เหมาะสมสำหรับการวิเคราะห์หาสิ่งเจือปนต่างๆในผลิตภัณฑ์ยา และมีขีดต่ำสุดของการตรวจวัด (detection limit) ประมาณ 0.5 ไมโครกรัม[39] เมื่อเร็วๆนี้มีรายงานของ Stoner et al. เกี่ยวกับการวิเคราะห์อะดรีนอลสตีรอยด์ จากตัวอย่างเลือดโดยวิธี HPLC เปรียบเทียบผลที่ได้กับวิธี RIA โดยการใช้เครื่องมือ HPLC ประกอบด้วยคอลัมน์แบบ reversed-phase Novapak C_{18} (10 cm. x 8 mm.i.d,5 µm.)ซึ่งเป็นแบบ radial compression และใช้ pre-column ชนิด µBondapak C_{18} Corasil ของบริษัท Waters Associates และพบว่าผลการวิเคราะห์หาปริมาณ 17-hydroxy-progesterone จาก 2 วิธีนี้มีค่า correlation ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญแต่อย่างใด[10]

มีรายงานหลายฉบับที่เกี่ยวข้องกับการวิเคราะห์ตัวยาสำคัญในตัวอย่างยาเตรียมที่มีจำหน่ายอยู่ทั่วไปที่จะนำเสนอในที่นี้คือ การใช้วิธี HPLC วิเคราะห์และ/หรือ แยกสารประกอบสตีรอยด์ฮอร์โมนในตัวอย่างยาเม็ดคุมกำเนิดหรือผลิตภัณฑ์ยาที่เกี่ยวข้อง เริ่มจากผลงานของ Bagon และ Hammond ซึ่งวิเคราะห์หาปริมาณ ethinyloestradiol ในยาเม็ดคุมกำเนิดและศึกษาการแยกสารนี้ออกจากสตีรอยด์อื่นๆ อีก 19 ชนิดตรวจสอบสารที่แยกได้ด้วย UV detector ที่ความยาวคลื่น 212 นาโนเมตร ใช้ Spherisorb S5 ODS เป็นคอลัมน์

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

แบบ reversed-phase ร่วมกับ mobile phase ที่ประกอบด้วยส่วนผสมของเมทานอลกับน้ำ (70 : 30,v/v) และสามารถวิเคราะห์ปริมาณ ethinyloestradiol ได้ต่ำสุดถึง 10 ไมโครกรัม[40] Gluck และ Shek ได้ศึกษาพฤติกรรมการแยก ethinyloestradiol ออกจาก norethisterone ในตัวอย่างยาเม็ดคุมกำเนิดใช้คอลัมน์แบบ reversed-phase 3 ชนิด เปรียบเทียบผลการทดลองโดยพิจารณาตัวแปรทางโครมาโตกราฟี เช่น capacity factor (k') และ selectivity factor(α) จากการใช้ระบบ binary solvent และระบบ ternary solvent และได้สรุปว่าคอลัมน์ที่ผลิตจากบริษัทต่างๆ กันจะแสดงพฤติกรรมการแยกแตกต่างกัน[21]

Johnston รายงานการใช้วิธี HPLC วิเคราะห์หาปริมาณสตีรอยด์ฮอร์โมนที่เป็นองค์ประกอบในตัวอย่างยาเม็ดคุมกำเนิดที่มีขายอยู่ทั่วไปในประเทศออสเตรเลีย จำนวน 32 ชนิด โดยใช้ระบบ normal phase ซึ่งประกอบด้วยคอลัมน์ ที่บรรจุด้วยอนุภาค μ Porasil silica (30 cm. x 3.9 mm. i.d., 10 μm.) ของบริษัท Waters Associates และใช้ส่วนผสมของ cyclohexane กับ 2-propanol เป็น mobile phase ร่วมกับการใช้ UV detector ที่ความยาวคลื่น 213 และ 240 นาโนเมตร เพื่อตรวจสอบโปรเจสโตเจน และใช้ fluorescence detector ที่ λ_{ex} 280 nm และ λ_{em} 310 nm เพื่อตรวจสอบเอสโตรเจน[12]

Carignan et al. ใช้วิธี HPLC วิเคราะห์หาปริมาณ ethynodiol diacetate และ ethinyloestradiol/mestranol ในยาเม็ดคุมกำเนิดโดยใช้คอลัมน์ RP-2 (250 x 3.2 mm.i.d.) และใช้ 38% อะซิโตไนไตรในน้ำเป็น mobile phase ตรวจสอบสารที่แยกได้โดยใช้ UV detector ที่ความยาวคลื่น 210 และ 280 นาโนเมตร ตามลำดับ[41] Gupta ได้พัฒนาวิธีการแยกโดยใช้ reversed-phase HPLC เพื่อวิเคราะห์หาปริมาณของ hydroxyprogesterone caproate, medroxy-progesterone acetate และ progesterone ที่อยู่ในตัวอย่างยาน้ำและยาเม็ดชนิดต่างๆ[42] Strusiak et al. ได้วิเคราะห์หา ethinyloestradiol ที่อยู่ในรูปของตัวอย่างของแข็ง (solid dosage form) โดยใช้วิธี HPLC ที่ใช้คอลัมน์แบบ reversed-phase (Li Chrosorb RP-8, 25 cm. x 4.6 mm.i.d.) และใช้ 0.05M.aqueous KH_2PO_4- MeOH (2:3, v/v) เป็น mobile phase ร่วมกับ

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

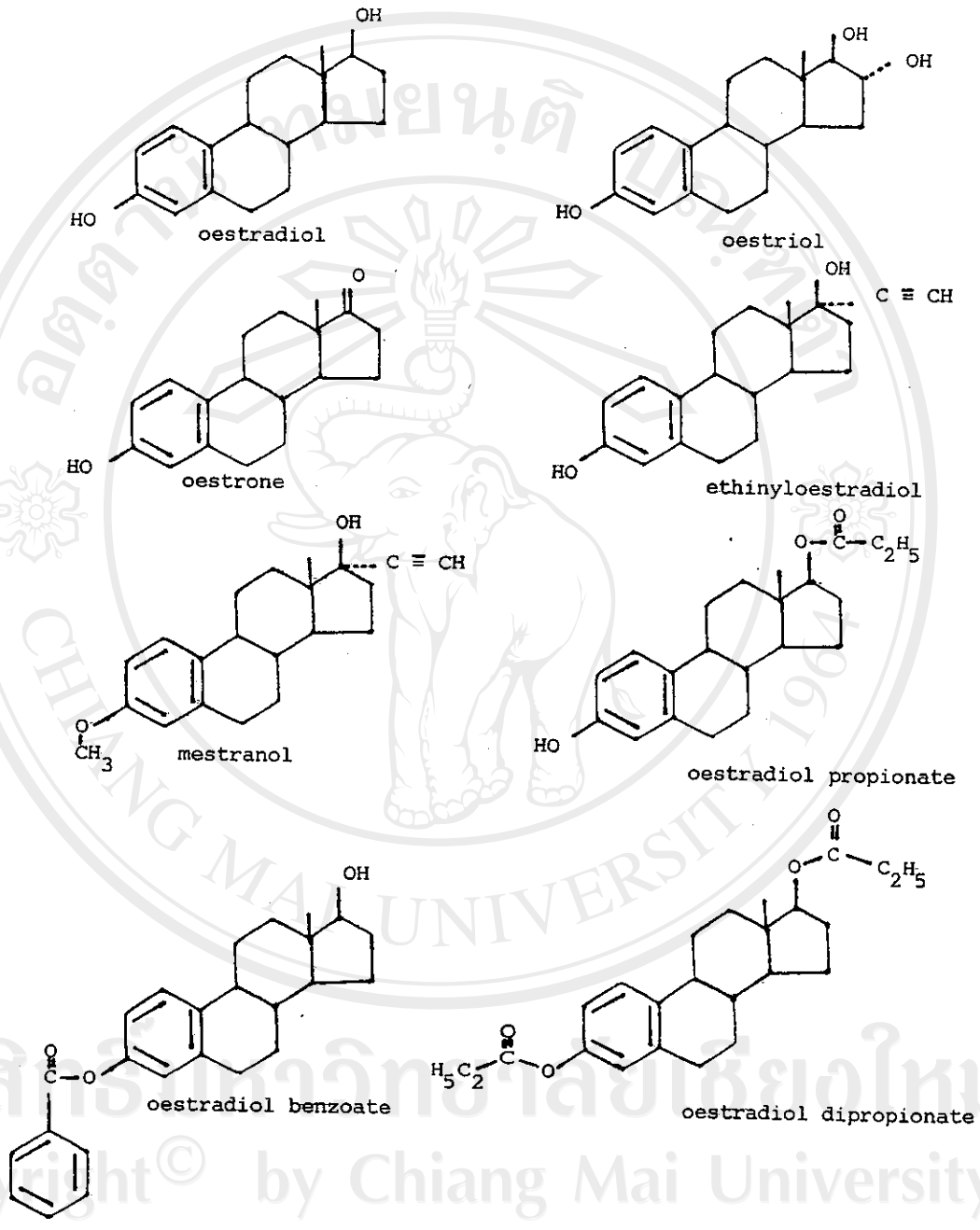
fluorescence detector (λ_{ex} 280 nm และ λ_{em} 330 mn)[43]

เมื่อเร็วๆนี้ มีรายงานการวิเคราะห์สตีรอยด์ฮอร์โมนในตัวอย่างยาเม็ดคุมกำเนิด ซึ่งตีพิมพ์ใน Journal of Chromatography ปี 1984 อีก 2 ฉบับคือ ผลงานของ Carignan et al. เป็นการหาสภาวะที่เหมาะสมในการใช้เทคนิค HPLC ระบบ reversed-phase ซึ่งประกอบด้วยคอลัมน์ Zorbax ODS (250 x 4.6 mm., 5-6 µm.)และใช้ UV detector ที่ความยาวคลื่น 210 nm. มีส่วนผสมของอะซิโตไนไตรกับน้ำเป็น mobile phase[44]และอีกฉบับหนึ่งเป็นผลงานวิเคราะห์ของ Bond et al. ซึ่งใช้วิธี reversed-phase HPLC เช่นเดียวกันแต่ลักษณะของคอลัมน์นั้นต่างจากงานวิจัยของคนอื่นๆ คือ การใช้คอลัมน์แบบ µ Bondapak C_{18} cartridge รวมกับ radial compression module (RCM) ของบริษัท Waters Associates ต่อเข้ากับ UV detector 2 ตัว ซึ่งปรับความยาวคลื่นที่ 212 และ 280 นาโนเมตร และวิเคราะห์แยกฮอร์โมนดังกล่าวโดยใช้ระบบตัวทำละลาย 2 ระบบ คือ ส่วนผสมของ MeOH/H_2O(v/v) และ MeOH/H_2O/THF (v/v/v)[45]

1.10 วัตถุประสงค์ของงานวิจัย

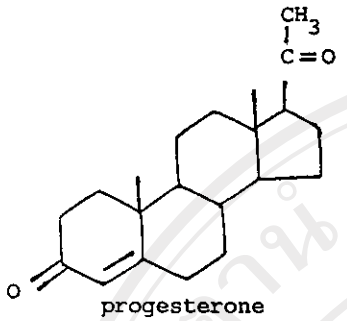
เพื่อศึกษาและปรับปรุงวิธีการวิเคราะห์ที่เหมาะสมและรวดเร็วในการวิเคราะห์หาปริมาณสตีรอยด์ฮอร์โมนบางชนิดในยาเม็ดคุมกำเนิดโดยวิธีโครมาโตกราฟีของเหลวแบบสมรรถนะสูง

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

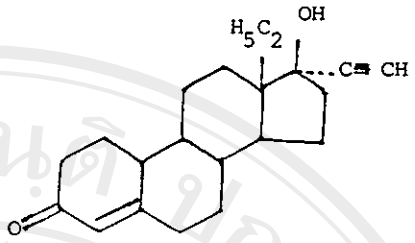


รูปที่ 1 โครงสร้างของฮอร์โมนเอสโตรเจนและสารอนุพันธ์

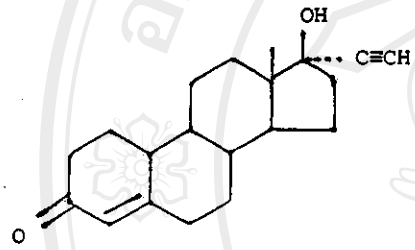
ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved



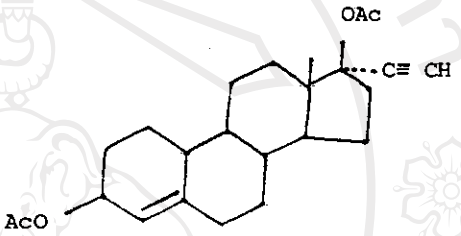
progesterone



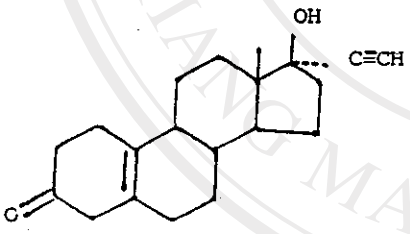
norgestrel



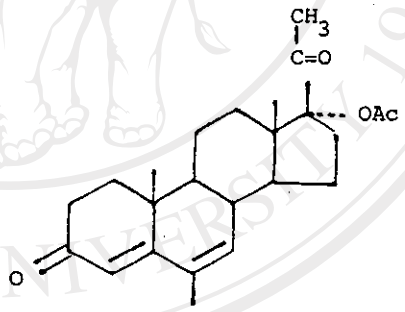
norethindrone



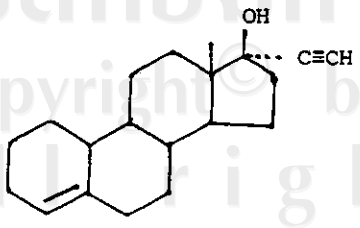
ethynodiol diacetate



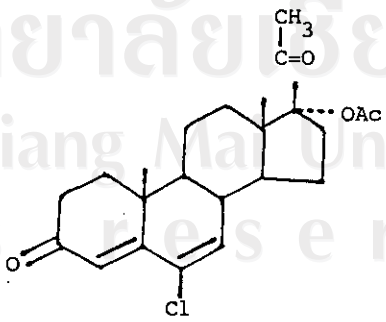
norethynodrel



megestrol acetate



ethinyloestrenol
(lynoestrenol)



chlormadinone acetate

รูปที่ 2 โครงสร้างของฮอร์โมนโปรเจสโตเจนและสารอนุพันธ์

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved