

การทดลองหาสภาวะที่เหมาะสมของการแยกสตีรอยด์ฮอร์โมนโดยวิธี HPLC

เนื่องจากวิธี HPLC เป็นเทคนิคที่ประกอบด้วยส่วนสำคัญ 2 ส่วน คือ ส่วนที่ใช้แยกและส่วนที่ใช้ตรวจวัด โดยมีขบวนการแยกเกิดผ่านระบบทั้งสองส่วนนี้ได้อย่างต่อเนื่อง ได้กล่าวถึงการพัฒนาวิธีแยกสตีรอยด์ฮอร์โมน โดยระบบ HPLC แล้วในบทที่ 2 ข้อ 2.1 ดังนั้นงานทดลองส่วนแรกคือการพิจารณาคุณภาพของการแยก องค์ประกอบสตีรอยด์ฮอร์โมน มาตรฐานที่สนใจพร้อมทั้งศึกษาตัวแปรต่างๆ ทางโครมาโตกราฟีและจะกล่าวถึงรายละเอียดในบทนี้ ส่วนงานทดลองส่วนที่สอง คือ การใช้สภาวะที่เหมาะสมที่ได้ เพื่อวิเคราะห์หาปริมาณสตีรอยด์ฮอร์โมนบางชนิดในตัวอย่างยาเม็ดคุมกำเนิด ซึ่งจะเสนอผลการทดลองและวิจารณ์ในบทที่ 4

3.1 การทดลอง

3.1.1 เครื่องมือ HPLC

- เครื่องปั๊มรุ่น 510 ของบริษัท Waters Associates
- ระบบ radial compression (Z-module) ของบริษัท Waters Associates
- คอลัมน์แบบ Radial-Pak μ Bondapak C₁₈ (10 cm. x 8 mm. i.d., 10 μ m.) และ Guard-Pak cartridge C₁₈ ของบริษัท Waters Associates
- ระบบฉีดสาร (injector) รุ่น U6K ของบริษัท Waters Associates
- Syringe ขนาด 25 ไมโครลิตร รุ่น 700 ของบริษัท Waters Associates
- เครื่องตรวจวัดอุลตราไวโอเลตสเปกโตรโฟโตมิเตอร์รุ่น Jasco UVIDEC-100-IV ของบริษัท Jasco Spectroscopic Co.Ltd.
- เครื่องบันทึกสัญญาณ แบบ OmniScribe ของบริษัท Houston Instrument

3.1.2 อุปกรณ์และเครื่องแก้ว

- ชุดกรองตัวทำละลาย (filter apparatus) ของบริษัท Waters Associates ประกอบด้วย ground joint flask ขนาด 1 ลิตร funnel ขนาด 300 มิลลิลิตร(มล.) และ tubulated base
- เครื่องปั๊มสุญญากาศ (air motor compressor vacuum pump) ของบริษัท Waters Associates
- ชุดกรองสารตัวอย่าง (sample clarification) ของบริษัท Waters Associates ประกอบด้วย glass syringe ขนาด 10 มล. swinny filter holder cannula No. 17 prefilter disc (AP 25)
- กระดาษกรอง (filter membrane) ตัวทำละลายชนิด HA pore size 0.45 ไมโครเมตรของบริษัท Waters Associates
- เครื่องอัลตราโซนิค (ultrasonic)
- เครื่องเหวี่ยงใส่ (centrifuge) ของบริษัท Griffin & George Ltd.
- หลอดเหวี่ยงใส่ ขนาด 16 × 100 มิลลิเมตร (มม.)
- เครื่องปั่นแบบ Super-Mixer ของบริษัท Lab-Line Instruments.Inc.
- ถังบรรจุก๊าซไนโตรเจน บริสุทธิ์ 99.9%

3.1.3 สารเคมีที่ใช้

1. 17 α -Ethinylloestradiol	ผลิตโดย	Sigma
2. Mestranol	"	"
3. Norethindrone	"	"
4. Norethynodrel	"	"
5. Progesterone	"	"
6. Testosterone	"	"
7. 17 α -Oestradiol	"	"
8. 17 β -Oestradiol	"	"
9. Oestriol บริสุทธิ์ 98%	"	"

10. 17 α -Hydroxyprogesterone	ผลิตโดย	Fluka
11. Oestrone	"	"
12. Lynoestrenol (Ethinylloestrenol)		
13. Methanol (MeOH) A.R. grade	ผลิตโดย	Merck
14. Methanol for spectroscopy	บริสุทธิ์ 99.7%	
15. Acetonitrile (ACN) A.R grade	ผลิตโดย	Fisher Scientific
16. Acetonitrile for HPLC	"	Fluka
17. Diethyl ether A.R. grade	"	Merck
18. Di-isopropyl ether A.R grade	"	"
19. Tetrahydrofuran (THF)	"	May & Baker
20. D(+) - Lactose	"	May & Baker
21. Placabo starch A.R. grade		
22. Carboxymethylcellulose (CMC)	ผลิตโดย	Sigma
23. Magnesium stearate	"	BDH chemicals
24. Talc	"	H & W

3.1.4 การเตรียมสารละลาย

3.1.4.1 การเตรียม mobile phase

วางตัวทำละลายที่ต้องการใช้ให้ใกล้ส่วนของตัวทำละลายแต่ละอย่างในส่วนผสมตามต้องการ เติลงในขวดใส่สารขนาด 500 มล. หรือ 1 ลิตร (ใช้สารเกรด A.R. และน้ำกลั่นที่ผ่านขบวนการกำจัดไอออน (de-ionised water)) ปิดฝาเขย่าให้เข้ากันดี นำมากรองผ่านกระดาษกรอง ซึ่งมีขนาดรูพรุนเท่ากับ 0.45 ไมโครเมตร โดยใช้ชุดกรองสารละลาย และปั๊มสูญญากาศ ของบริษัท waters Associates จากนั้นนำมาไลกาซโดยการพ่นก๊าซไนโตรเจนลงในตัวทำละลายนานประมาณ 5 นาที แล้วนำมาแช่ในเครื่องอุลตราโซนิกอีกประมาณ 20 นาที และเก็บไว้ที่อุณหภูมิห้อง (21-22° C)

3.1.4.2 การเตรียมสารละลายมาตรฐานฮอร์โมนสำหรับการวิเคราะห์

คุณภาพ

เตรียม Stock solution ของสารละลายมาตรฐานฮอร์โมน ความเข้มข้น 1,000 พี พี เอ็ม (ppm) โดยการชั่งสารมาตรฐานฮอร์โมนอย่างละเอียด 25 มิลลิกรัม (มก.) ละลายด้วยเมทานอล (ใช้ spectroscopic grade) ในขวดปริมาตรขนาด 25 มล. เก็บสารละลายมาตรฐานไว้ในตู้เย็นทุกครั้งหลังจากที่ใช้แล้ว

3.1.5 การปฏิบัติต่อเครื่องมือ HPLC

เนื่องจากวิธี HPLC เป็นเทคนิคการแยกที่ใช้วิเคราะห์สารตัวอย่างที่มีปริมาณน้อยๆ และต้องการความละเอียดถูกต้องสูง ในการทดลองแต่ละครั้ง จะต้องเดินเครื่องอย่างระมัดระวังตามขั้นตอนของการใช้เครื่องมือ และตรวจสอบความบริสุทธิ์ ของตัวทำละลายทุกตัวที่ใช้ หรือสิ่งสกปรกที่ปนอยู่จะต้องไม่รบกวนการวิเคราะห์ หรือเป็นผลเสียต่อระบบการทำงานของเครื่องมือ HPLC เป็นการตรวจสอบ reproducibility ของการทดลอง และความปกติของเครื่องมือ และสภาพคอลัมน์ที่ใช้แยก (column condition) เช่นพิจารณา retention time ค่า resolution ยังเหมือนเดิม และมี baseline ที่เสถียร เป็นต้น⁽⁴⁹⁾

การเริ่มใช้ใหม่ (Pump priming)⁽⁷⁹⁾ เมื่อเริ่มใช้เครื่องมือ HPLC จะเป็นที่ต้องการเริ่มใช้ใหม่ก่อน เนื่องจากในตัวปั๊มอาจมีฟองอากาศแทรกอยู่ในช่องว่างต่างๆ ได้ เลือกใช้ตัวทำละลายที่เหมาะสม ปกติจะใช้เมทานอลในการ flush เครื่อง มีขั้นตอนดังนี้

- (1) สอดปลายเข็มของ syringe ที่ไล่อากาศออกหมดแล้ว เข้าที่ท่อเทฟลอน (teflon) ของตัวปั๊ม
- (2) เปิดท่อ draw-off valve โดยหมุนทวนเข็มนาฬิกา 2-3 รอบ
- (3) ดูดฟองอากาศออกจาก solvent supply line
- (4) ปิดท่อ draw-off valve (โดยปฏิบัติตามขั้นตอนนี้จนกระทั่งฟองอากาศหมด)

- (5) ให้สอด syringe ที่มีแคติวทำละลายเข้าที่ท่อเพ็ลลอนใหม่อีก และเปิดท่อ draw-off valve
- (6) หมุนสวิทช์ไปที่ตำแหน่ง outlet ของปั๊ม และใช้ปั๊มเกอร์รองรับตัวทำละลาย ที่จะไหลออกจากตัวปั๊ม
- (7) ปรับอัตราการไหลที่ 0.00 มล.ต่อนาที และเปิด power switch ไปที่ตำแหน่ง ON
- (8) ปรับอัตราการไหลเป็น 9.9 มล.ต่อนาที แล้วฉีดตัวทำละลายเข้าไปในตัวปั๊ม 2 ครั้งๆละ ประมาณ 5 มล. สังเกตคูฟองอากาศ และการไหลของตัวทำละลายออกจาก outlet tube
- (9) เมื่อตัวทำละลายที่ไหลออกมาในไม่มีฟองอากาศ ให้ปิดท่อ draw-off valve แล้วดึง syringe ออก และปรับอัตราการไหลใหม่ให้เป็น 0.00 มล.ต่อนาที

การที่มีฟองอากาศอยู่ในช่องว่างภายในตัวปั๊ม (pumping chamber) จะทำให้การไหลของตัวทำละลายในลูกสูบเคลื่อนที่ไม่สม่ำเสมอเมื่อใช้ความดันสูงๆ และทำให้ระบบมี pulse เกิดขึ้น

3.2 ผลการทดลอง

3.2.1 การหาสภาวะที่เหมาะสมของการ แยกสตีรอยคัสอร์โมน

จากแนวทางการพัฒนาวิธีการแยก สตีรอยคัสอร์โมนโดยวิธี HPLC ได้เลือกใช้ reversed-phase HPLC (RP-HPLC) โดยใช้คอลัมน์แบบ Radial-Pak μ Bondapak C₁₈ (10 cm. x 8 mm.i.d., 10 μ m.) ใช้ Guard-Pak C₁₈ cartridge และใช้เครื่องตรวจวัดแบบอูลตราไวโอเลต สเปคโตรโฟโตมิเตอร์

ตัวแปรที่สำคัญที่ใช้ศึกษาพฤติกรรมของการแยกคือ

- การหา mobile phase ที่เหมาะสม
- การหาอัตราการไหลของตัวทำละลายที่เหมาะสม
- การเลือกใช้ความยาวคลื่นที่เหมาะสม

ในการศึกษาพฤติกรรมของการแยกสาร ได้เลือกใช้อัตราการไหลเท่ากับ 2.0 มล.ต่อนาที และ

ใช้ความยาวคลื่น 213 นาโนเมตร เป็นสภาวะการทดลอง (conditions) คงที่ไว้แล้ว เปลี่ยนแปลง ส่วนประกอบของ mobile phase ชนิดต่างๆ ความไว (sensitivity) ของเครื่องตรวจวัดปริมาตรที่ฉีด และความเร็วของกระดาษบันทึกสัญญาณ (chart speed) ตามความเหมาะสม ดังรายละเอียดที่จะอภิปรายในลำดับต่อไป

3.2.1.1 การทดลองหา mobile phase ที่เหมาะสม

การแยกสารในระบบ RP-HPLC จะเลือกใช้ mobile phase ที่เป็นส่วนผสมของเมทานอล หรืออะซิโตนในไตรก้าน้ำ ในอัตราส่วนต่างๆ ขึ้นกับสภาพที่ต้องการ โดยทั่วไปแล้วจะเลือกใช้ระบบ binary solvent ก่อนโดยใช้เมทานอล หรืออะซิโตนในไตร เป็นสารอินทรีย์ปรับสภาพ (organic modifier) ในน้ำแล้วพิจารณาพฤติกรรมของการแยกสารผสมสตีรอยด์ฮอร์โมนในเทอมของค่า retention time (t_r) หรือค่า capacity factor (k') ในงานวิจัยนี้ ศึกษาหา binary solvent 2 ระบบ คือ ระบบของ MeOH/H₂O และระบบของ ACN/H₂O ตามแนวทางการหา mobile phase ที่เหมาะสม ดังที่อภิปรายไว้แล้วในข้อ 2.1.2

(ก) การใช้ระบบ MeOH/H₂O เป็น mobile phase ได้ศึกษาพฤติกรรม การแยกสตีรอยด์ฮอร์โมนโดยการ เปลี่ยนแปลงสัดส่วนของเมทานอลกับน้ำ ได้ผลการทดลอง แสดงในตารางที่ 1 และกราฟรูปที่ 11 และ 12 และได้ทดลองแยกสารผสมของ progesterone, mestranol และ lynoestrenol ออกจากกัน โดยการเปลี่ยนแปลงองค์ประกอบของ mobile phase อย่างละเอียดจาก 85-90% ของเมทานอลในน้ำ ได้ผลการทดลอง แสดงในตารางที่ 2

(ข) การใช้ระบบ ACN/H₂O เป็น mobile phase ได้ศึกษาพฤติกรรม การแยกสตีรอยด์ฮอร์โมน โดยการ เปลี่ยนแปลงสัดส่วนของอะซิโตนในไตรกับน้ำ ได้ผลการทดลอง แสดงในตารางที่ 3 และกราฟรูปที่ 13 และ 14

3.2.1.2 การทดลองหาอัตรา การไหลของตัวทำละลายที่เหมาะสม

เนื่องจากอัตรา การไหลของตัวทำละลาย มีผลต่อสมรรถนะของคอลัมน์มากพอสมควร ในทางปฏิบัติแล้ว คอลัมน์จะใช้งานได้ดีที่อัตรา การไหลที่เหมาะสม สามารถแยกสารผสมออกจากกันได้ภายในเวลาสั้นที่สุด และใช้ตัวทำละลายน้อยที่สุด ในระบบโครมาโตกราฟีของเหลว

นั้น การแยกจะเกิดขึ้นได้ดีที่อัตราการไหลต่ำ และมีจำนวนแผ่นทางทฤษฎีมาก ค่าของตัวแปรต่าง ๆ ที่เกี่ยวข้อง คือ linear velocity (U) จำนวนไคจากสมการ (3) จำนวนแผ่นทางทฤษฎี (N) จำนวนไคจากสมการ (5) และความสูงของแผ่นทางทฤษฎี (H) จำนวนไคจากสมการ (7)

(ก) การเปลี่ยนแปลงอัตราการไหลของระบบที่ใช้ MeOH/H₂O(85:15, v/v) เป็น mobile phase และศึกษาค่าตัวแปรต่างๆ ในการสร้างกราฟ HETP เทียบกับ U ไคผลการทดลองแสดงในตารางที่ 4 และกราฟรูปที่ 15 และได้หาความสัมพันธ์ระหว่าง $\frac{H}{U}$ เทียบกับ U เพื่อพิจารณาถึงผลของ mobile phase velocity ที่มีต่อค่า retention time โดยใช้ ethinyl oestradiol เป็นตัวแทนกลุ่มของสตรีรอยด์ฮอร์โมนที่ศึกษาได้ผลการทดลอง แสดงในตารางที่ 5 และกราฟรูปที่ 16

(ข) การเปลี่ยนแปลงอัตราการไหลของระบบที่ใช้ ACN/H₂O(80:20, v/v) เป็น mobile phase และศึกษาค่าตัวแปรต่างๆ ในการสร้างกราฟ HETP เทียบกับ U ไคผลการทดลอง แสดงในตารางที่ 6 และกราฟรูปที่ 17 และได้หาความสัมพันธ์ระหว่าง $\frac{H}{U}$ เทียบกับ U เพื่อพิจารณาถึงผลของ mobile phase velocity ที่มีต่อค่า retention time ของ ethinyl oestradiol เป็นตัวแทนกลุ่มของสตรีรอยด์ฮอร์โมนที่ศึกษา แสดงข้อมูลในตารางที่ 7 และกราฟรูปที่ 18

(ค) การเปลี่ยนแปลงอัตราการไหลของ mobile phase ที่เป็นส่วนผสมของอะซิโตนไนไตร 3 ระบบ คือ ACN/H₂O(80:20, v/v) ACN/H₂O(85:15, v/v) และ ACN/H₂O(90:10, v/v) ที่อัตราการไหล 3 ค่า คือ 1.0 1.5 และ 2.0 มล.ต่อนาที ไคผลการทดลองแสดงในตารางที่ 8

(ง) การศึกษาค่า Resolution ของการแยกสารผสมสตรีรอยด์ฮอร์โมน 3 ชนิด โดยใช้ ACN/H₂O(80:20, v/v) เป็น mobile phase ที่อัตราการไหลต่างๆ ไคผลการทดลอง แสดงในตารางที่ 9

ตัวอย่างการคำนวณค่าตัวแปรต่างๆ ทางโครมาโตกราฟี

การคำนวณค่า k' ใช้สูตรในสมการ(2) ได้ใช้วิธีการฉีดเมทานอล (A.R. grade) หรืออะซิโตนไนไตร (HPLC grade) เมื่อใช้ระบบของ MeOH/H₂O (v/v)

หรือ ระบบของ ACN/H₂O(v/v) เป็น mobile phase เพื่อหาค่า retention time ของสารที่ไม่ถูกรึเทน หรือค่า t₀ และพบว่า binary solvent ทั้งสองระบบให้ค่าเท่ากัน คือ 1.8 นาที เช่น การคำนวณ ค่า k' เมื่อใช้ MeOH/H₂O (55:45,v/v) เป็น mobile phase ที่อัตราการไหลเท่ากับ 2.0 มล.ต่อนาที ในการแยก norethisterone ซึ่งมีค่า t_r เท่ากับ 19.8 นาที

$$\begin{aligned} \text{จาก } k' &= (t_r - t_0) / t_0 \\ \text{แทนค่า} &= \frac{19.8 - 1.8}{1.8} \\ &= 10.0 \end{aligned}$$

การคำนวณหาค่าตัวแปรต่างๆ เมื่อใช้ MeOH/H₂O(85:15, v/v) เป็น mobile phase แยกสารผสม ethinyloestradiol, progesterone, mestranol และ lynoestrenol ที่อัตราการไหลเท่ากับ 0.5 มล.ต่อนาที วัตถุประสงค์ค่า t₀ เท่ากับ 258.0 วินาที

$$\begin{aligned} \text{คำนวณค่า } U & \\ \text{จาก } U &= \frac{L}{t_0} \quad \text{เมื่อ } L = \text{ความยาวคอลัมน์} \\ &= 100 \text{ มม.} \\ \text{แทนค่า} &= \frac{100.0}{258.0} \end{aligned}$$

$$= 0.39 \text{ มม.ตอวินาที}$$

$$\text{คำนวณหาค่า } N$$

$$\text{จาก } N = 16 \left[\frac{t_r}{w_t} \right]^2$$

$$\text{แทนค่า} = 16 \left[\frac{696.0}{90.0} \right]^2$$

เมื่อ t_r = retention time
ของ ethinyloestradiol

$$= 696.0 \text{ วินาที}$$

w_t = ความกว้างที่ฐานพีคของ
ethinyloestradiol

$$= 90.0 \text{ วินาที}$$

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

Copyright © Chiang Mai University

All rights reserved

= 957 แพน

จำนวนทาคา H (ของ ethinyloestradiol)

$$\begin{aligned} \text{จาก } H &= \frac{L}{N} \\ \text{แทนค่า} &= \frac{100}{957} \\ &= 0.1045 \text{ มม. หรือ } 104.5 \text{ ไมโครเมตร} \end{aligned}$$

จำนวนค่า R_s

ค่า resolution จำนวนใดจากสูตรในสมการ (8) ตัวอย่างเช่น การหาค่า R_s ระหว่างพีคที่แยกออกมาซีกกันของ ethinyloestradiol กับ levonorgestrel ที่อัตราการไหลเท่ากับ 4.0 มล.ต่อนาที

$$\text{จากสูตร } R_{s \text{ EE,LNT}} = \frac{t_{r_2} - t_{r_1}}{\frac{1}{2}(w_1 + w_2)}$$

เมื่อ t_{r_1} = retention time ของ ethinyloestradiol มีค่าเท่ากับ 79.80 วินาที

t_{r_2} = retention time ของ levonorgestrel มีค่าเท่ากับ 100.50 วินาที

w_1 = ความกว้างที่ฐานพีค ของ ethinyloestradiol มีค่าเท่ากับ 13.20 วินาที

w_2 = ความกว้างที่ฐานพีค ของ levonorgestrel มีค่าเท่ากับ 16.50 วินาที

$$\begin{aligned} \text{แทนค่า } R_{s \text{ EE,LNT}} &= \frac{100.50 - 79.80}{\frac{1}{2}(13.20 + 16.50)} \\ &= \frac{20.70}{14.85} \\ &= 1.39 \end{aligned}$$

3.2.1.3 การเลือกใช้ความยาวคลื่นที่เหมาะสม

สตีรอยด์ฮอร์โมน เป็นสารประกอบอินทรีย์ซึ่งมี chromophore group อยู่ในโมเลกุล ในช่วง far UV chromophore เหล่านี้สามารถดูดกลืนแสง UV ได้โดยทั่วไปแล้ว สารประกอบอินทรีย์ส่วนมากจะดูดกลืนแสง UV ที่ความยาวคลื่น 254 นาโนเมตร และเครื่องมือ HPLC แบบเก่า ที่ใช้ร่วมกับ UV detector มักจะออกแบบใช้ตรวจวัดสารที่ 254 นาโนเมตร อย่างไรก็ตาม UV detector รุ่นใหม่ จะเป็นแบบเลือกปรับความยาวคลื่นได้ทั้งในช่วงแสง UV และวิซิเบิล หรือบางเครื่องสามารถปรับได้ถึงช่วง far UV (180-210 nm.) ทำให้การวิเคราะห์มีความจำเพาะมากขึ้น คือสามารถเลือกใช้ความยาวคลื่นของสารประกอบที่สนใจมีค่า ϵ สูงสุดได้ตามความต้องการ (51,83)

จากการตรวจเอกสารการวิเคราะห์สตีรอยด์ฮอร์โมนโดยวิธี HPLC ร่วมกับ UV detector พบว่าทั้งสตีรอยด์ฮอร์โมนสังเคราะห์และสตีรอยด์ฮอร์โมนจากธรรมชาติ มีค่า ϵ แตกต่างกันที่ความยาวคลื่น 213, 254 และ 280 นาโนเมตร ดังนั้นในงานวิจัยนี้ได้ศึกษาความไวของสารที่สนใจที่ความยาวคลื่นดังกล่าวโดยพิจารณาสัญญาณตอบสนองที่ได้จากการวัดความสูงของพีคโดยให้สภาวะการทดลองอื่นๆคงที่ได้ทดลองหาความไวของสตีรอยด์ฮอร์โมนโดยใช้ MeOH/H₂O(75:15, v/v) เป็น mobile phase ได้ผลการทดลองแสดงในตารางที่ 10 และได้ทดลองหาความไวของสตีรอยด์ฮอร์โมน เพื่อสนับสนุนผลที่ได้ดังกล่าว โดยใช้ ACN/H₂O (80:20, v/v) เป็น mobile phase ที่ความยาวคลื่น 213, 254 และ 280 นาโนเมตรและแสดงข้อมูลโดยใช้ peak height ratios ในตารางที่ 11

3.2.2 การศึกษาพฤติกรรมการแยกสตีรอยด์ฮอร์โมนจากธรรมชาติบางชนิด

สตีรอยด์ฮอร์โมนที่มีอยู่ในธรรมชาติมีแหล่งกำเนิดมาจากพืชและสัตว์ เมื่อก่อนมีการใช้สตีรอยด์ฮอร์โมนเหล่านี้เป็นตัวยาสำคัญในการรักษาโรคนั้นมาก แต่ปัจจุบันนี้หันมาใช้สตีรอยด์ฮอร์โมนที่ได้จากการสังเคราะห์ขึ้นเพราะว่ามีฤทธิ์ยาแรงกว่า สะดวกต่อการใช้และเตรียมขึ้นได้ง่ายกว่า ในข้อ 3.2.1 ได้กล่าวถึงการแยกสตีรอยด์ฮอร์โมนสังเคราะห์ที่ใช้เป็นองค์ประกอบในยาเม็ดคุมกำเนิด ในที่นี้ได้ทำการศึกษาพฤติกรรมการแยกสตีรอยด์ฮอร์โมนจากธรรมชาติ เพื่อเป็นแนวทางในการศึกษาสตีรอยด์ฮอร์โมนที่มีอยู่ในธรรมชาติต่อไป

(ก) โททคลองไซเมทานอล และอะซีโตไนไตรเป็นตัวทำละลาย ปรับสภาพ
ขั้วของ mobile phase เพื่อแยกสตีรอยด์ฮอร์โมนทั้งหมด 7 ชนิด โดยใช้อัตราการไหลเท่า
กับ 2.0 มล.ต่อนาที ได้ผลการทดลอง แสดงในตารางที่ 12 และ 13 และกราฟแสดงความ
สัมพันธ์ระหว่างค่า capacity factor (k') และเปอร์เซ็นต์ของเมทานอล และอะซีโตไนไตร
ในน้ำ ในรูปที่ 19 และ 20 ตามลำดับ

(ข) โททคลองไซระบบของ mobile phase ที่เป็นส่วนผสมของ organic
modifier ชนิดต่างๆ เพื่อแยกสารผสมสตีรอยด์ฮอร์โมนจากธรรมชาติได้ผลการทดลองแสดง
ในตารางที่ 14 และกราฟรูปที่ 21

(ค) โททคลองไซ ternary solvent ของส่วนผสมของ MeOH/H₂O/DEE
เพื่อแยกสารผสมสตีรอยด์ฮอร์โมนจากธรรมชาติ ได้ผลการทดลอง แสดงในตารางที่ 15 และ
กราฟรูปที่ 22

3.2.3 การศึกษาพฤติกรรมของการแยกสตีรอยด์ฮอร์โมนสังเคราะห์บางชนิด

ได้กล่าวถึงการหาสภาวะที่เหมาะสมในการแยกสตีรอยด์ฮอร์โมนสังเคราะห์
ซึ่งใช้เป็นองค์ประกอบในยาเม็ดคุมกำเนิดมาแล้วในข้อ 3.2.1 ในกรณีที่มีสารประกอบสตีรอยด์-
ฮอร์โมนมาตรฐานอยู่จำนวนหนึ่งและจะต้องหาสภาวะที่เหมาะสมในการแยกสารผสมเหล่านี้
จากตารางที่ 1 และ 3 จะเห็นว่า ทั้งเมทานอลและอะซีโตไนไตรในน้ำที่สัดส่วนใดๆ ก็ไม่
สามารถแยก levonorgestrel ออกจาก norethynodrel ได้ ลักษณะของโครงสร้าง
ของสตีรอยด์ทั้งสองชนิดนี้ต่างกันที่ตำแหน่งของ double bond และ alkyl group
ที่ C₁₈ ทำให้มีสภาพขั้วใกล้เคียงกันมาก หากจะพิจารณาถึง norethisterone กับ
norethynodrel ซึ่งมีโครงสร้างต่างกันเฉพาะที่ alkyl group ที่ C₁₈ เท่านั้น แต่มี
สภาพขั้วต่างกันพอสมควรและสามารถแยกออกจากกันได้ด้วยระบบตัวทำละลายดังกล่าว ด้วย
เหตุนี้จึงได้ทำการศึกษาพฤติกรรมของการแยกสตีรอยด์ฮอร์โมนเหล่านี้โดยการปรับสภาพขั้วของ
mobile phase ด้วย organic modifier เช่นไดเอทิล อีเทอร์ ไดไอโซโพรพิล
อีเทอร์ หรือ เตตระไฮโดรฟูราน เป็นต้น

(ก) การเลือกใช้นิโคของอีเทอร์ เป็น organic modifier ชนิดของอีเทอร์ที่เลือกใช้ศึกษาพฤติกรรมการแยกระบบนี้ ได้แก่ ไดเอทิล อีเทอร์ (DEE) ไดไอโซโพรพิล อีเทอร์ (DPE) และเตตระไฮโดรฟูราน (THF) โดยเติมลงในระบบของ binary solvent ในระดับต่างกัน ได้ข้อมูลแสดงในตารางที่ 16 และกราฟรูปที่ 23

(ข) การใช้ไดเอทิล อีเทอร์ เป็น organic modifier ได้ทดลองเปลี่ยนแปลงปริมาณของเมทานอลในน้ำ แต่กำหนดให้ปริมาณไดเอทิล อีเทอร์คงที่ที่ 10% ได้ผลการแยกแสดงในตารางที่ 17 และกราฟรูปที่ 24

(ค) การใช้ไดไอโซโพรพิล อีเทอร์ เป็น organic modifier ได้ทดลองศึกษาพฤติกรรมการแยกสตีรอยด์กลุ่มนี้ โดยใช้ไดไอโซโพรพิล อีเทอร์ เป็น organic modifier ในปริมาณต่างๆ และที่เปอร์เซ็นต์ของเมทานอลกับน้ำระดับต่างๆด้วย เริ่มจากการใช้ไดไอโซโพรพิล อีเทอร์ ที่ 2% และ 5% เติมลงในระบบของ MeOH/H₂O ดังผลการทดลอง แสดงในตารางที่ 18 และ 19 และในกราฟรูปที่ 25 และ 26 ตามลำดับ และได้ทดลองใช้ ternary solvent ที่เป็นส่วนผสมของ MeOH/H₂O/DPE ในสัดส่วนต่างๆ เพื่อแยกสตีรอยด์ฮอร์โมน 5 ชนิด ได้ผลการทดลองแสดงในตารางที่ 20 และกราฟรูปที่ 27 พร้อมทั้งได้ทดลองเปลี่ยนแปลงปริมาณของไดไอโซโพรพิล อีเทอร์ จาก 1-10% ใน binary solvent ของ MeOH/H₂O(54:46, v/v) เพื่อแยกสตีรอยด์ฮอร์โมน 4 ชนิด ได้ผลการทดลองแสดงในตารางที่ 21 และกราฟรูปที่ 28

3.3 วิจารณ์ผลการทดลอง

3.3.1 ผลของ solvent strength ที่มีต่อ retention time

ได้ทดลองหาสภาวะที่เหมาะสมในการแยกสตีรอยด์ฮอร์โมนทั้ง 7 ชนิดโดยเลือกใช้เมทานอล และอะซิโตนในไตรเป็นตัวแทนละลาย เพื่อปรับสภาพขั้วของตัวชะ

(ก) ระบบของเมทานอลกับน้ำ จากการเปลี่ยนแปลงปริมาณของเมทานอลของ mobile phase ตั้งแต่ 55-90% ในน้ำและใช้อัตราการไหลที่ 2.0 มล.ต่อนาที พบว่า สตีรอยด์ฮอร์โมนเหล่านี้แสดงพฤติกรรมการแยกแตกต่างกันตามคุณสมบัติของสภาพขั้วพิจารณาจากข้อมูลในตารางที่ 1 และกราฟรูปที่ 11 ซึ่งแสดงค่า k' ของสตีรอยด์ฮอร์โมนเทียบกับสภาพขั้วของตัวชะ โดยศึกษาการเปลี่ยนแปลงของ t_R (นาที) เมื่อสภาพขั้วของ

mobile phase เปลี่ยนแปลงไป จะเห็นว่าการเปลี่ยนแปลงของ k' เทียบกับสภาพขั้วของตัว
ชะเป็นแบบ exponential ค่า k' ของสตีรอยด์ลดลงเมื่อความเข้มข้นของเมทานอลเพิ่มขึ้น

การใช้ระบบเมทานอลกับน้ำ เป็น mobile phase เพื่อแยกสตีรอยด์ฮอร์โมนที่เป็นองค์ประกอบในยาเม็ดคุมกำเนิดจำนวน 6 ชนิด และมี progesterone เป็น internal standard (I.S.) พบว่า เมื่อใช้เมทานอลต่ำกว่า 65% ในน้ำจะเห็นพฤติกรรม การแยกสตีรอยด์เหล่านี้ออกเป็น 2 กลุ่มอย่างคร่าวๆ คือ กลุ่มของ norethisterone , levonorgestrel, norethynodrel และ ethinyloestradiol และอีกกลุ่มหนึ่ง คือ progesterone mestranol และ lynoestrenol นั่นคือสตีรอยด์กลุ่มแรกมีสภาพขั้ว มากกว่า กลุ่มที่สอง โดยมี norethisterone มีสภาพขั้วมากที่สุด mestranol มีสภาพขั้ว มากกว่า lynoestrenol ประมาณ 2 เท่าของค่า k' และ lynoestrenol มีสภาพขั้ว ค่ำสุด และถูกรีเทนอยู่ในคอลัมน์นานที่สุด แต่เมื่อใช้เมทานอลมากขึ้นจาก 70-90% ในน้ำ พบว่า กลุ่มสตีรอยด์ที่ศึกษามีค่า k' ค่ำลงและอยู่ในช่วงที่เหมาะสมกับการวิเคราะห์โดยวิธี HPLC ($0 < k' < 15$)⁽⁷⁴⁾ เช่นที่ 75% เมทานอลในน้ำมีค่า $k' = 16.77$ และสามารถ แยกสตีรอยด์ฮอร์โมนที่มีสภาพขั้วต่างๆ เช่น progesterone mestranol และ lynoes- trenol ออกจากกันได้ แต่ไม่แยกกลุ่มสตีรอยด์ฮอร์โมนกลุ่มแรก ซึ่งมีสภาพขั้วสูงกว่า ในทาง ปฏิบัติแล้วช่วงของค่า k' ควรจะอยู่ในช่วง 2-6 จะช่วยย่นเวลาในการวิเคราะห์ ระบบของ การแยกที่ดีนั้น ควรได้ resolution ที่ดี และใช้เวลาแยกสั้นที่สุด⁽⁴⁶⁾ ดังนั้นจะต้องเลือก ใช้ mobile phase ให้เหมาะสมกับลักษณะของสารผสมที่จะแยก ในที่นี้ สตีรอยด์ฮอร์โมนที่เป็นองค์ประกอบสำคัญในยาเม็ดคุมกำเนิดส่วนมากประกอบด้วยฮอร์โมนเอสโตรเจน และฮอร์- โมนโปรเจสตินผสมกันอยู่เป็นคู่ๆ ในกราฟรูปที่ 12 แสดงค่า k' เทียบกับปริมาตรของ เมทานอลในน้ำ ตั้งแต่ 70-90% เป็นการแยกสารผสมของ ethinyloestradiol mestranol lynoestrenol และ progesterone (I.S.) พบว่าสภาวะของการแยกที่ เหมาะสมของฮอร์โมนกลุ่มนี้ คือ 85% เมทานอลในน้ำ ที่อัตราการไหลเท่ากับ 2.0 มล.ต่อนาที ใช้เวลาวิเคราะห์ประมาณ 9.6 นาทีต่อการแยก 1 ครั้ง เมื่อใช้เมทานอลต่ำกว่า 85% ในน้ำ ก็สามารถใช้แยกสารกลุ่มนี้ได้แต่ใช้เวลาการแยกนานเกินไป ยกเว้นที่ 90% เมทานอลในน้ำ ไม่ สามารถแยกสารกลุ่มนี้ให้ได้ baseline resolution

ได้ทดลองเปลี่ยนแปลงสัดส่วนของ เมทานอล ในน้ำจาก 85-90% อย่างละเอียด (ตารางที่ 2) พบว่า progesterone และ mestranol มีค่า k' เปลี่ยนแปลงไปเพียงเล็กน้อย แต่ lynoestrenol มีค่า k' ลดลงเกือบ 2 เท่า ที่ 88% เมทานอลในน้ำยังสามารถแยกสารผสม 3 ตัวนี้ออกจากกันได้ดีมากและใช้เวลาวิเคราะห์ประมาณ 8 นาที อย่างไรก็ตาม การใช้ปริมาณของเมทานอลในช่วงดังกล่าวสามารถใช้แยกคู่ออร์โมน mestranol และ lynoestrenol ในตัวอย่างยาเม็ดคุมกำเนิดได้ แต่คู่ออร์โมน ethinyloestradiol กับ lynoestrenol ยังมีปัญหาเนื่องจากพีคของ ethinyloestradiol อยู่ใกล้พีคของตัวทำละลายมากเกินไปอาจทำให้การวิเคราะห์ปริมาณสารตัวอย่างผิดพลาดได้

ในที่นี้ได้เลือกใช้ระบบ MeOH/H₂O (85:15, v/v) เป็น mobile phase ที่อัตราการไหลเท่ากับ 2.0 มล. ต่อ นาที ใช้เวลาแยกประมาณ 9.6 นาที ซึ่งถือว่าเวลาในการวิเคราะห์ไม่ต่างกันมากนัก ทั้งยังสามารถแยกคู่ออร์โมน ethinyloestradiol กับ lynoestrenol โดยมี progesterone เป็น I.S. ได้ด้วย และสามารถประยุกต์ใช้แยกคู่ออร์โมน ethinyloestradiol กับ lynoestrenol และ mestranol กับ lynoestrenol ในสารตัวอย่างได้ในเวลาเดียวกันโดยไม่ต้องเปลี่ยน mobile phase ระบบใหม่

(ข) ระบบของอะซิโตนไทรกับน้ำ ตารางที่ 3 แสดงการเปลี่ยนแปลงปริมาณของอะซิโตนไทรใน mobile phase ตั้งแต่ 35-90% ในน้ำจะเห็นการเปลี่ยนแปลงค่า k' ของสตรอยด์ฮอร์โมนทุกตัวลดลงแบบ exponential เหมือนกันกับระบบเมทานอลกับน้ำ พบว่า levonorgestrel และ norethynodrel มีค่า k' เท่ากันทุก ๆ เบอร์เซ็นต์ของอะซิโตนไทร หรือ เมทานอลในน้ำ ในระบบของเมทานอลกับน้ำ เป็นที่สังเกตว่า ethinyloestradiol และ levonorgestrel แยกออกจากกันได้เมื่อใช้เมทานอลต่ำกว่า 65% แต่ที่ 85% เมทานอลในน้ำไม่สามารถแยกคู่ออร์โมน ethinyloestradiol และ levonorgestrel เนื่องจากสตรอยด์ฮอร์โมนคู่นี้ นิยมใช้เป็นตัวยาคำคัญในยาเม็ดคุมกำเนิดด้วยเหตุนี้จึงต้องหา mobile phase ที่เหมาะสมเพื่อใช้แยกสตรอยด์ฮอร์โมนดังกล่าว เมื่อใช้ระบบของอะซิโตนไทรกับน้ำ เป็น mobile phase พบว่าสตรอยด์ฮอร์โมนทุกตัวมีพฤติกรรมแยกเหมือนกันกับระบบของเมทานอลกับน้ำ ที่ 60% อะซิโตนไทรในน้ำ สามารถแยก ethinyloestradiol และ levonorgestrel โดยมี progesterone เป็น I.S. และใช้เวลาแยกเพียง 9.2 นาที เท่านั้น ที่อัตราการไหลเท่ากับ 2.0 มล. ต่อ นาที

แต่ถ้าแยกคู่ของ ethinyloestradiol และ levonorgestrel เท่านั้นจะแยกได้ภายใน เวลา 6.0 นาที อย่างไรก็ตาม เมื่อเพิ่มปริมาณของอะซีโตไนไตรซินเรื่อยๆ จนกระทั่งถึง 90% ก็ยังสามารถแยกคู่ของ ethinyloestradiol และ levonorgestrel ได้เช่นเดียวกัน กราฟรูปที่ 13 และ 14 แสดงค่า k' และ t_R ของสตรีรอยคัสอร์โมนเทียบกับปริมาณของอะซีโตไนไตรซินในน้ำจาก 35-60% และ 55-90% ตามลำดับ เมื่อพิจารณาถึงสตรีรอยคัสอร์โมนที่จะหาปริมาณในตัวอย่างยาเม็ดคุมกำเนิดโดยใช้ mobile phase ระบบนี้ พบว่า ตั้งแต่ 75-85% อะซีโตไนไตรซินในน้ำ สามารถใช้แยก ethinyloestradiol levonorgestrel progesterone หรือ mestranol และ lynoestrenol ออกจากกันได้ และใช้เวลาแยกในช่วงเวลา 6-10 นาที ที่อัตราการไหลเท่ากับ 2.0 มล.ต่อนาที แต่ใช้ progesterone เป็น I.S. ไม่ได้ เพราะว่ามีค่า k' ใกล้เคียงกันกับค่า k' ของ mestranol

3.3.2 ผลของอัตราการไหลที่มีต่อ retention time

ในระบบโครมาโตกราฟีของเหลว การเปลี่ยนแปลงอัตราการไหลจะมีผลกระทบต่อพฤติกรรมการแยกน้อยกว่าที่เกิดในระบบโครมาโตกราฟีก๊าซ ด้วยเหตุนี้จึงได้กำหนดอัตราการไหลของตัวทำละลายไว้ก่อนค่าหนึ่ง ซึ่งสามารถให้ผลการทดลองได้ค่อนข้างเร็ว ในงานวิจัยนี้ เลือกใช้ที่ 2.0 มล.ต่อนาที หลังจากที่ได้หาค่าที่เหมาะสมของ mobile phase ได้เหมาะสมแล้ว จึงนำ mobile phase นี้มาใช้ประกอบการศึกษาอัตราการไหลหรืออาจจะเปลี่ยนแปลงอัตราการไหลไปด้วยขณะที่กำลังหา mobile phase ที่เหมาะสมในคราวเดียวกัน

ได้ศึกษาความสัมพันธ์ระหว่าง retention time และอัตราการไหล โดยใช้ mobile phase 2 ระบบ คือ ระบบของ MeOH/H₂O(85:15, v/v) และระบบของ ACN/H₂O (80:20, v/v) เนื่องจากอัตราการไหลมีผลต่อเวลาที่ใช้แยก และ resolution ในแง่ทฤษฎีอัตราการไหลยังมีผลต่อ จำนวนแผ่นทางทฤษฎี (N) โดยที่ resolution และ เวลาที่ใช้วิเคราะห์มีส่วนสัมพันธ์กัน ดังนั้นจึงถือว่า จำนวนแผ่นต่อหน่วยเวลา เป็นข้อกำหนดที่สำคัญอย่างหนึ่ง สำหรับการเปรียบเทียบสมรรถนะของคอลัมน์⁽⁵⁷⁾

(ก) ระบบของเมทานอลกับน้ำ

เนื่องจากกำหนดค่าอัตราการไหลคงที่ เท่ากับ 2.0 มล.ต่อนาที ในการเปลี่ยนแปลงองค์ประกอบ mobile phase ใช้สภาวะที่เหมาะสมในการแยก ethinyloestradiol

progesterone mestranol และ lynoestrenol ที่อัตราการไหลนี้ได้เลย เพราะว่าใช้เวลาวิเคราะห์เพียง 9.6 นาที เท่านั้น ถ้าต้องการลดเวลาแยกให้สั้นกว่านี้ ทำได้โดยการเพิ่มอัตราการไหลสูงขึ้น แต่เป็นการสิ้นเปลืองตัวทำละลาย และทำให้การแยก ethinyloestradiol ออกจากสารผสมยุ่งยากมากขึ้น เนื่องจาก ethinyloestradiol ถูกแยกออกมาก่อน และอยู่ใกล้ซีกกับพีคของตัวทำละลาย โดยเฉพาะ เมื่อประยุกต์ใช้แยก ethinyloestradiol ออกจากตัวอย่างยาเม็ดคุมกำเนิด ซึ่งมี excipients ปนอยู่มาก อาจมีผลทำให้การวิเคราะห์ปริมาณผิดพลาดได้ ในทางตรงกันข้ามถ้าต้องการประหยัดตัวทำละลาย ทำได้โดยการใช้อัตราการไหลต่ำกว่า 2.0 มล.ต่อนาที แต่ก็มีข้อจำกัด คือ ต้องใช้เวลาวิเคราะห์นานขึ้น และทำให้ระบบการแยกสารโดยวิธี HPLC ไม่เหมาะสมสำหรับวิเคราะห์ตัวอย่างที่มีจำนวนมากๆ อย่างไรก็ตาม ได้ทดลองเปลี่ยนแปลงอัตราการไหลตั้งแต่ 0.5-3.0 มล.ต่อนาที โดยใช้ MeOH/H₂O (90:10, v/v) และ MeOH/H₂O (88:12, v/v) พบว่า เมื่อใช้ 90% เมทานอลในน้ำเป็น mobile phase ซึ่งสามารถแยก mestranol ออกจาก lynoestrenol ได้ดี แต่ไม่สามารถใช้ progesterone เป็น I.S. เพราะว่า progesterone มีค่า k' ใกล้เคียงกับของ mestranol และถูกแยกออกมาในเวลาใกล้เคียงกัน และมีการซ้อนทับกันบางส่วน (overlapping) สภาวะเช่นนี้เกิดขึ้นที่อัตราการไหลเท่ากับ 1.0 มล.ต่อนาที เป็นต้นไป ในกรณีที่ใช้ 88% เมทานอลในน้ำ เป็น mobile phase พบว่า ตลอดช่วงที่ศึกษาอัตราการไหลนี้ยังสามารถใช้ progesterone เป็น I.S. ได้เสมอ โดยเฉพาะที่อัตราการไหลเท่ากับ 1.5 มล.ต่อนาที ใช้เวลาแยกสารกลุ่มนี้ เพียง 9.6 นาที เท่านั้น เหมือนกับที่เลือกใช้ 85% เมทานอลในน้ำ ที่อัตราการไหลเท่ากับ 2.0 มล.ต่อนาที และช่วยประหยัดตัวทำละลายอีกด้วย แต่ระบบนี้ไม่เหมาะสำหรับการแยกสารผสมที่มี ethinloestradiol ปนอยู่ด้วย เพราะว่าในตัวอย่างยาเม็ดคุมกำเนิด จะมี ethinyloestradiol คู่กับ levonorgestrel และมี ethinyloestradiol คู่กับ lynoestrenol ดังนั้น ถ้าเลือกใช้ 85% เมทานอลในน้ำจะสามารถแยกคู่ผสมทั้งสองนี้ได้พร้อมกัน โดยไม่ต้องเปลี่ยนแปลง mobile phase ระบบอื่น

ในแง่ทฤษฎี ได้ศึกษาผลของอัตราการไหล โดยพิจารณาจากกราฟของ HETP และแสดงผลของ mobile phase velocity ที่มีต่อ retention time⁽⁵⁷⁾ โดยการสร้างกราฟระหว่างค่า H/U เทียบกับ U จากกราฟของ HETP ในรูปที่ 15 แสดงถึง

พฤติกรรมการแยกสาร ethinyloestradiol, mestranol, lynoestrenol และ progesterone โดยใช้ MeOH/H₂O (85:15, v/v) เป็น mobile phase โดยการเปลี่ยนแปลงอัตราการไหลจาก 0.5-3.5 มล.ต่อนาที (ตารางที่ 4) จะเห็นว่าที่อัตราการไหลต่ำมีจำนวนแผ่นทางทฤษฎี ประมาณ 800-900 แผ่น และมีค่า H ต่ำ เมื่ออัตราการไหลเพิ่มขึ้นจาก 0.5-1.5 มล.ต่อนาที ค่าความชัน (slope) จะเปลี่ยนแปลงมากกว่าอัตราการไหลช่วงอื่นๆ ทำให้ H มีค่าสูงขึ้นอย่างรวดเร็ว และตั้งแต่อัตราการไหลเท่ากับ 2.0 มล.ต่อนาที เป็นต้นไป ความชันจะเพิ่มขึ้นที่น้อย หรือเปลี่ยนแปลงน้อยลง เป็นผลให้จำนวนแผ่นทางทฤษฎีมีค่าใกล้เคียงกัน นั่นคือไม่ว่าจะเลือกใช้อัตราการไหลใดๆ ในช่วงนี้ สารประกอบที่ศึกษาจะมีพฤติกรรมแยกในคอลัมน์เปลี่ยนแปลงไปเพียงเล็กน้อย หรือมีค่า resolution ใกล้เคียงกัน เมื่อพิจารณาการสร้างกราฟของ H/U เทียบกับ U ในรูปที่ 16 และตารางที่ 5 ของ ethinyloestradiol เพื่อแสดงถึงผลกระทบของ mobile phase velocity ที่มีต่อค่า retention time พบว่าตอนแรกๆ H/U จะลดลงอย่างรวดเร็ว เมื่อ U เพิ่มขึ้น และจะค่อยๆ ลดลงที่น้อยจนเกือบจะคงที่ อาจกล่าวได้ว่า ควรจะใช้อัตราการไหลสูงๆ เท่าที่เป็นไปได้จะให้ผลดีกว่า แต่ในทางปฏิบัติแล้ว คอลัมน์จะใช้งานได้ดีที่ optimum flow-rate ในระบบโครมาโตกราฟีของเหลวไม่มีการนิยามค่าอัตราการไหลที่เหมาะสมไว้ชัดเจนเหมือนอย่างในระบบโครมาโตกราฟีก๊าซ แต่จะพิจารณาจากค่า U บนกราฟ H/U เทียบกับ U ที่ความชันมีค่าเปลี่ยนแปลงมากๆ อย่างไรก็ตาม การใช้อัตราการไหลสูงๆ จะมีขีดจำกัด เนื่องจากอัตราการไหลจะสัมพันธ์กับ pressure drop ที่ผ่านคอลัมน์

ในการใช้วิธี HPLC ประยุกต์ใช้วิเคราะห์หาปริมาณสารตัวอย่างมักไม่ค่อยคำนึงถึงหลักการของการเลือกใช้อัตราการไหลของตัวทำละลายอย่างละเอียด เพียงแต่เลือกใช้อัตราการไหลที่สามารถแยกสารผสมได้ resolution ที่ดีและแยกได้ภายในเวลาที่เหมาะสมเท่านั้น การเลือกใช้ MeOH/H₂O (85:15, v/v) เป็นตัวชะที่อัตราการไหลเท่ากับ 2.0 มล.ต่อนาที ดังกล่าวนั้น จะเห็นว่าสอดคล้องตามหลักการของกราฟ HETP ที่ยังคำนึงถึงเวลาที่ใช้แยก (ประมาณ 9 นาที) อีกด้วย ถ้าใช้อัตราการไหลต่ำกว่านี้ จะทำให้เวลาแยกนานขึ้น และถ้าใช้อัตราการไหลสูงกว่านี้จะสิ้นเปลืองตัวทำละลาย สภาวะที่เหมาะสมในการแยกสารกลุ่มนี้ คอลัมน์มีค่า N โดยเฉลี่ยประมาณ 609 แผ่น และมีค่า H สูงประมาณ 165 ไมโครเมตร และมีค่า U เท่ากับ 1.48 มม.ต่อนาที

เมื่อพิจารณาถึงความสัมพันธ์ระหว่างอัตราการไหล และ retention time (ข้อมูลในตารางที่ 4) ของสารกลุ่มนี้ จะเห็นว่า retention time มีค่าลดลง เมื่ออัตราการไหลมีค่าเพิ่มขึ้น จากการทดลอง เมื่อฉีดสารประกอบที่มีความเข้มข้นเท่ากัน และมีปริมาตรฉีดเท่ากัน ที่อัตราการไหลต่ำๆ จะได้พีคขนาดใหญ่และสูงกว่าพีคที่แยกได้จากราการไหลสูงๆ จากการบันทึกการเปลี่ยนแปลงของ pressure drop (ΔP) ขณะที่เปลี่ยนแปลงอัตราการไหล พบว่า ΔP เพิ่มขึ้นเป็นเชิงเส้นกับการเพิ่มขึ้นของอัตราการไหล อย่างไรก็ตาม ค่าของ ΔP นี้ ยังขึ้นอยู่กับอายุการใช้งานของการคอลลัมน์อีกด้วย เนื่องจากการคอลลัมน์เป็นค่าสิ้นสุดท้ายที่ตัวจะเข้าสู่คอลลัมน์ และใช้เป็นที่กักกันสิ่งสกปรกทั้งหลายไว้ เมื่อใช้ไปนานๆ จะทำให้การคอลลัมน์แน่นขึ้น และเป็นผลให้ ΔP มีค่าเพิ่มขึ้นได้ (อ่าน ΔP จากมาตรวัดอย่างหยาบๆ บนเครื่องปั๊ม)

(ข) ระบบของอะซิโตนในไตรกลีเซอรอล

เมื่อพิจารณาถึงอัตราการไหล เริ่มแรกกำหนดให้ใช้อัตราการไหลเท่ากับ 2.0 มล. ต่อ นาที ครั้นเมื่อทำการเปลี่ยนแปลงอัตราการไหล โดยทดลองใช้เท่ากับ 1.0 และ 1.5 มล. ต่อ นาที เพื่อต้องการประหยัดตัวทำละลาย แต่ยังคงค้ำไว้เวลาที่ใช้แยก และ resolution ตารางที่ 8 แสดงถึงผลของการเปลี่ยนแปลงอัตราการไหล 3 ค่า ในการแยก ethinyloestradiol, levonorgestrel และ progesterone เมื่อใช้ mobile phase 3 ระบบ พบว่า retention time และ resolution ของสตีรอยด์ฮอร์โมนกลุ่มนี้ ไม่แตกต่างกันมากนัก โดยเฉพาะที่อัตราการไหลเท่ากับ 1.0 มล. ต่อ นาที ใช้เวลาแยกประมาณ 8.2 นาที เมื่อใช้ ACN/H₂O (80:20, v/v) เป็น mobile phase (โครมาโตแกรมในรูปที่ 30) ส่วนที่อัตราการไหลเท่ากับ 2.0 มล. ต่อ นาที เมื่อใช้ mobile phase ทั้ง 3 ระบบนั้น จะเห็นว่าพีคของตัวทำละลายจะอยู่ชิดกับพีคของ ethinyloestradiol มากเกินไป โดยเฉพาะเมื่อใช้ ACN/H₂O (90:10, v/v) เป็น mobile phase ไม่เหมาะสำหรับใช้แยกสารกลุ่มนี้ ที่ 80% อะซิโตนในไตรกลีเซอรอลสามารถใช้แยก ethinyloestradiol และ levonorgestrel โดยมี progesterone เป็น I.S. ได้โดยใช้อัตราการไหลเท่ากับ 1.5 มล. ต่อ นาที และแยกสารได้ภายในเวลา 5.6 นาที จะช่วยประหยัดตัวทำละลาย เมื่อเปรียบเทียบกับวิธีการแยกที่อัตราการไหลเท่ากับ 2.0 มล. ต่อ นาที

ไตทดลองเลือกใช้ mobile phase ที่มีเปอร์เซ็นต์ของน้ำมากขึ้น เช่น ใช้ ACN/H₂O (60:40, v/v) ที่อัตราการไหลเท่ากับ 2.0 มล.ต่อนาที เมื่อเปรียบเทียบกับการใช้ ACN/H₂O (80:20, v/v) ที่อัตราการไหลเท่ากับ 1.0 มล.ต่อนาที และใช้เวลาแยกต่างกัน เพียง 1.0 นาที เท่านั้น จะเห็นว่า mobile phase ทั้ง 2 ระบบนี้ แตกต่างกันอยู่ 2 อย่างคือปริมาณน้ำที่ใช้ และอัตราการไหล โดยที่ mobile phase ระบบแรกใช้น้ำมากกว่า mobile phase ระบบที่ 2 เท่ากับ 50% แต่เมื่อพิจารณาถึงปริมาณตัวทำละลาย ที่ใช้ทั้งหมด ต่อหน่วยเวลา mobile phase ระบบที่ 2 จะช่วยประหยัดตัวทำละลายได้มากกว่า ทั้งยังใช้เวลาแยกสั้นกว่า และทวนเวลาในการเตรียม mobile phase อีกด้วย อย่างไรก็ตาม โดยทางปฏิบัติแล้ว การแยกสารโดยวิธี HPLC นั้นจะคำนึงถึงจำนวนสารที่ต้องการแยก และใช้เวลาแยกสั้นที่สุดเท่าที่เป็นไปได้ โดยสิ้นเปลืองตัวทำละลายน้อยที่สุด ในที่นี้ จึงเลือกใช้ระบบ ACN/H₂O (80:20, v/v) ที่อัตราการไหลเท่ากับ 1.5 มล.ต่อนาที และใช้เวลาแยกสารกลุ่มนี้ภายในเวลาเพียง 5.6 นาที เท่านั้น

ในทำนองเดียวกัน เมื่อศึกษาอัตราการไหลของระบบที่ใช้ ACN/H₂O (80:20, v/v) เป็น mobile phase โดยพิจารณาตัวแปรทางโครมาโตกราฟี ในลักษณะเดียวกัน ไตทดลองเปลี่ยนแปลงอัตราการไหล จาก 0.5-4.0 มล.ต่อนาที นำข้อมูลสร้างกราฟ HETP ดังที่แสดงในรูปที่ 17 พบว่า ระบบนี้มีความชันต่างจากระบบของเมทานอลกับน้ำเพียงเล็กน้อย คือ ความชันจะเริ่มเปลี่ยนแปลงมากในช่วงอัตราการไหลประมาณ 1.5 มล.ต่อนาที ขึ้นไป และให้ผลสอดคล้องกับความชันในกราฟ ของ H/U เทียบกับ U (ดังรูปที่ 18)คือที่บริเวณอัตราการไหลเท่ากับ 1.5 มล.ต่อนาที (U = 1.27 mm/sec) จะได้ N มีค่าเฉลี่ยประมาณ 1024 แผ่น และ H มีค่าเท่ากับ 97.80 ไมโครเมตร

จากการใช้ระบบของอะซิโตนไตรกับน้ำเป็น mobile phase พบว่า ΔP ของระบบมีค่าต่ำกว่าระบบของเมทานอลกับน้ำ ปกติแล้ว เมื่อใช้ระบบเมทานอลกับน้ำเป็น mobile phase ที่อัตราการไหลเท่ากับ 2.0 มล.ต่อนาที ระบบจะมี ΔP ประมาณ 1,000 psi ขณะที่ระบบของอะซิโตนไตรกับน้ำที่อัตราการไหลเดียวกันนี้ ΔP มีค่าประมาณ 500 psi จะเห็นว่า ΔP ของระบบอะซิโตนไตรกับน้ำมีค่าต่ำกว่าระบบเมทานอลกับน้ำประมาณครึ่งหนึ่ง ทั้งนี้เนื่องจากอิทธิพลของความหนืด (viscosity) คือความหนืดของเมทานอล อะซิโตนไตร และน้ำ มีค่าเท่ากับ 0.60 0.37 และ 1.00 ที่ 20° เซลเซียส

ตามลำดับความหนักของอะซีไต์ไนไตรมีค่าต่ำกว่าของเมทานอลประมาณครึ่งหนึ่ง พิจารณาถึงความสัมพันธ์ระหว่าง retention time และอัตราการไหลของการแยก ethinylloestradiol levonorgestrel และ progesterone ความสัมพันธ์เชิงเส้นระหว่าง AP เทียบกับอัตราการไหลจะเห็นว่าอัตราการไหลเท่ากับ 1.5 มล.ต่อนาที ซึ่งเลือกเป็นสภาวะที่เหมาะสมในการแยกสารระบบนี้จะมี AP ประมาณ 400 psi และสอดคล้องกับที่พบขณะทำการทดลอง อย่างไรก็ตาม AP ของระบบนี้ก็ขึ้นอยู่กับอายุการใช้งานของการคอลลัมน์ เช่นเดียวกัน แต่ตัวทำละลายระบบนี้ช่วยยืดอายุการใช้งานของการคอลลัมน์ได้นานกว่าระบบของเมทานอลกับน้ำ

ใต้พิจารณาค่า resolution (Rs) ของระบบที่แยก ethinylloestradiol levonorgestrel และ progesterone ที่แยกออกมาใกล้กันที่อัตราการไหลต่างๆได้ผลการทดลอง แสดงในตารางที่ 9 เริ่มตั้งแต่อัตราการไหลเท่ากับ 0.5-4.0 มล.ต่อนาที การแยกของสตีรอยด์ฮอร์โมนทั้ง 3 ชนิด พบว่า Rs ของคู่ชิดกันมีค่ามากกว่า 1.50 ซึ่งเป็นค่าที่ค่อนข้างสูง และไม่เป็นที่วิตกกังวลต่อการแยกสารผสมกลุ่มนี้แต่อย่างใด

3.3.3 การเลือกใช้ความยาวคลื่นที่เหมาะสม

จากตารางที่ 10 จะเห็นว่า สตีรอยด์ฮอร์โมนที่มีโครงสร้างของวง A เป็น α, β -unsaturated double bond จะดูดกลืนแสงได้ที่ความยาวคลื่น 254 นาโนเมตร ส่วนที่ 213 และ 280 นาโนเมตร มีค่าการดูดกลืนแสง (absorptivity; ϵ) ปานกลางและต่ำตามลำดับ แต่ที่ 280 นาโนเมตรก็สามารถใช้ตรวจวัดสารประกอบโปรเจสโตเจนเหล่านี้ได้ คือ อาจต้องมีปริมาณฮอร์โมนมากพอสมควร อย่างไรก็ตาม Lynoestrenol ไม่ให้สัญญาณตอบสนองที่ 254 นาโนเมตร และมีค่า ϵ ค่อนข้างต่ำมากที่ 280 นาโนเมตร แต่มีค่า ϵ ค่อนข้างสูงที่ 213 นาโนเมตร ส่วนสารประกอบเอสโตรเจน จะให้สัญญาณตอบสนองสูงที่ 213 นาโนเมตร รองลงมาคือ ที่ 280 นาโนเมตร แต่ให้สัญญาณตอบสนองต่ำที่ 254 นาโนเมตร ดังนั้นในการวิเคราะห์ ethinylloestradiol และ mestranol ควรเลือกใช้ความยาวคลื่นที่ 280 หรือ 213 นาโนเมตร ก็ได้ แล้วแต่ความเหมาะสมของระบบที่ศึกษา

เมื่อคำนึงถึงปริมาณฮอร์โมนที่มีอยู่ในยาเม็ดคุมกำเนิด ซึ่งจะมีผลต่อความไวของการวิเคราะห์แล้วจะเห็นว่า สารประกอบโปรเจสโตเจนมีปริมาณมากกว่า สารประกอบ

เอสโตรเจน อย่างเห็นได้ชัด เช่นในตัวอย่างยาเม็ดคุมกำเนิดบางชนิด มี levonorgestrel 2.5 มิลลิกรัม และมี ethinylloestradiol 50 ไมโครกรัม ดังนั้น ถ้าเลือกใช้ความยาวคลื่นที่ 254 นาโนเมตร จะทำให้ความไวไม่สูงพอในการตรวจสอบ ethinylloestradiol แต่ถ้าเลือกใช้ความยาวคลื่นที่ 280 นาโนเมตร จะสามารถใช้วิเคราะห์ทั้ง ethinylloestradiol และ levonorgestrel ได้พร้อมกัน แม้ว่าความไวของ levonorgestrel จะต่ำลง แต่มีปริมาณฮอร์โมนค่อนข้างมาก ทำให้ไม่เกิดปัญหาในการตรวจสอบ ได้เปรียบเทียบสัดส่วนของความสูงของพีคที่ 213 และ 254 นาโนเมตร เทียบกับ 280 นาโนเมตร แสดงในตารางที่ 10 พบว่า ที่ A_{213}/A_{280} แสดงให้เห็นถึงค่าการดูดกลืนแสง UV ของสตีรอยด์ ทั้ง 7 ชนิด ได้ดีกว่าค่าที่ได้จาก A_{254}/A_{280} โดยเฉพาะอย่างยิ่ง ความไวของ Lynoestrenol ซึ่งมีค่า ϵ ค่าที่ 280 นาโนเมตร Roos ได้รายงานการศึกษาค่าการดูดกลืนแสง UV ของสารประกอบเอสโตรเจน ว่ามีค่า A_{280}/A_{254} ประมาณ 7 : 1 (31)

ในงานวิจัยนี้ ได้เลือกใช้ความยาวคลื่น 213 นาโนเมตร ในการตรวจวัด สตีรอยด์ฮอร์โมนที่สนใจเพราะว่า ที่ความยาวคลื่นนี้ สตีรอยด์ฮอร์โมนทุกตัว มีความไวสูงพอสมควร โดยเฉพาะกับสาร lynoestrenol แม้ว่าจะเป็นช่วงความยาวคลื่นใกล้กับ UV cut off ของตัวทำละลายต่างๆ ก็ตาม แต่สำหรับการแยกระบบนี้ ซึ่งใช้เมทานอล และอะซิโตนในไตรเป็นสารอินทรีย์ปรับสภาพขั้วของ mobile phase ไม่มีผลกระทบต่อการวิเคราะห์ แต่อย่างไร ตารางที่ 11 สนับสนุนการเลือกใช้ความยาวคลื่นที่ 213 นาโนเมตร พบว่า peak height ratio ที่ได้จาก A_{213}/A_{280} มีค่ามากกว่าค่าที่ได้จาก A_{213}/A_{254} ซึ่งสอดคล้องกับการใช้ MeOH/H₂O (75:25, v/v) เป็น mobile phase

3.3.4 สรุปผลการหาสภาวะการทดลองที่เหมาะสม

สำหรับการวิเคราะห์หาปริมาณสตีรอยด์ฮอร์โมนบางชนิดที่ใช้เป็นองค์ประกอบในยาเม็ดคุมกำเนิด จำนวน 4 ชนิด ได้ผลการทดลองแสดงในตารางที่ 22 กล่าว โดยสรุปได้ดังนี้

(ก) ระบบ MeOH/H₂O (85:15, v/v) สามารถใช้แยก ethinylloestradiol progesterone (I.S.) mestranol และ lynoestrenol แต่ไม่สามารถแยก ethinylloestradiol ออกจาก levenorgestrel เมื่อใช้อัตราการไหลเท่ากับ

2.0 มล.ต่อนาที และใช้เวลาแยกประมาณ 9.6 นาที mobile phase ระบบนี้ยังสามารถใช้แยก ethinyloestradiol ออกจาก norethisterone acetate ($t_r = 3.6$ นาที) และ ethynodiol diacetate ($t_r = 7.6$ นาที) ได้อีกด้วย แต่ใช้ progesterone เป็น I.S. ไม่ได้ เนื่องจากมีค่า capacity factor ใกล้เคียงกับของ norethisterone acetate Bond et al. (45) เลือกใช้ mobile phase ระบบนี้ในการแยก ethinyloestradiol ออกจาก norethisterone acetate เช่นเดียวกัน จากโครมาโตแกรมที่แยกได้ด้วย mobile phase ระบบนี้ได้พีคที่สมมาตร และได้ baseline resolution ทุกๆ พีคระหว่างพีคของตัวทำละลาย ethinyloestradiol progesterone mestranol และ lynoestrenol เรียงตามลำดับการแยกจากสภาพขั้วมากไปหาน้อย (รูปที่ 31(a) และรูปที่ 32)

(ข) ระบบ ACN/H₂O (60:40, v/v) สามารถใช้แยกสตรีรอยด์ฮอร์โมนได้ดีเหมือนกับข้อ (ก) แต่มีช่วงของค่า k' มากกว่า โดยเฉพาะ lynoestrenol มีค่า k' มากกว่า 10 ขึ้นไป เมื่อใช้อัตราการไหลเท่ากับ 2.0 มล.ต่อนาที อย่างไรก็ตามได้ทดลองใช้ mobile phase ระบบนี้แยกสารผสมของ ethinyloestradiol levonorgestrel และ progesterone (I.S.) และใช้เวลาแยกประมาณ 9.2 นาที Carignan et al. (44) ได้ใช้ mobile phase ระบบนี้เพื่อแยก ethinyloestradiol norethindrone norethynodrel และ mestranol ออกจากกันได้เป็นอย่างดี (รูปที่ 31 (b))

(ค) ระบบ ACN/H₂O (80:20, v/v) สามารถใช้แยกสตรีรอยด์ฮอร์โมนได้ดีเหมือนกับข้อ (ก) เมื่อใช้อัตราการไหลเท่ากับ 2.0 มล.ต่อนาที คือแยก ethinyloestradiol levonorgestrel mestranol และ lynoestrenol โดยใช้เวลาแยกเพียง 8.0 นาทีเท่านั้น แต่ใช้ progesterone เป็น I.S. ไม่ได้ เนื่องจากมีค่า k' เท่ากันกับของ mestranol ทำให้พีคทั้งสองซ้อนทับกันพอดี ปกติแล้วระบบการแยกที่ดีควรจะมีค่า selectivity factor (α) ที่เหมาะสม และมีค่า k' ค่าๆ จะเห็นว่า ethinyloestradiol มีค่า k' ค่อนข้างต่ำและแยกออกมาใกล้เคียงกับพีคของตัวทำละลาย หรือพีคของสารเจือปนอื่นๆ ในเมื่อกายมากเกินไป (โครมาโตแกรมในรูปที่ 30 (c)) ดังนั้นจึงจำเป็นต้องเพิ่มค่า k' ขึ้น โดยปราศจากการสูญเสีย resolution ของระบบโดยลดค่าอัตราการไหลลงเหลือ 1.5 มล.ต่อนาที ทำให้เวลาวิเคราะห์นานขึ้นเพียงเล็กน้อย นั่นคือสามารถแยก ethinyloestradiol levonorgestrel และ progesterone ออกจากกันได้ภายใน

เวลา 5.6 นาที คังโครมาโตแกรมในรูปที่ 31(c) และใช้สภาวะที่เหมาะสมนี้วิเคราะห์หาปริมาณ ethinyloestradiol-levonorgestrel ในตัวอย่างยาเม็ดคุมกำเนิดต่อไป

สำหรับความยาวคลื่นแสง UV ที่ใช้ตรวจวัดสารประกอบฮอร์โมนดังกล่าวนี้ จะเลือกใช้ความยาวคลื่น 213 นาโนเมตร ดังที่ได้ศึกษาไว้แล้วในข้อ 3.3.3 และการเลือกใช้ความยาวคลื่นที่เหมาะสมได้นิ่งถึงค่า molar absorptivity ของสเตียรอยด์ฮอร์โมนแต่ละชนิด และปริมาณของตัวยาฮอร์โมนที่มีอยู่ในตัวอย่างยาที่จะวิเคราะห์ส่วนสภาวะอื่นๆ เช่น ความไว ความเร็วของกระดาษ และปริมาตรที่ฉีดนั้นสามารถเปลี่ยนแปลงได้ตามความเหมาะสม และในการทดลองแต่ละครั้งก็ใช้ระบบสภาวะที่ใช้ทดลองไว้เสมอ

3.3.5 การศึกษาพฤติกรรมการแยกสเตียรอยด์ฮอร์โมนจากธรรมชาติบางชนิด

จากตารางที่ 12 เมื่อใช้ระบบของเมทานอลกับน้ำ เป็น mobile phase โดยการเปลี่ยนแปลงส่วนประกอบของเมทานอลในน้ำจาก 55-80% พบว่าใช้เมทานอลต่ำกว่า 60% ในน้ำจะเห็นลักษณะของการแยกสารผสมเหล่านี้ใบบาง มีลำดับของการแยก เรียงตามลำดับของสภาพขั้ว จากมากไปหาน้อยได้ดังนี้ คือ oestriol > oestrone > 17 β -oestradiol > 17 α -oestradiol > testosterone > 17 α -hydroxyprogesterone > progesterone นอกจาก oestriol ซึ่งมีสภาพขั้วมากที่สุดและ progesterone มีสภาพขั้วน้อยที่สุดแล้ว จะเห็นว่าสเตียรอยด์ฮอร์โมนจากธรรมชาติเหล่านี้มีลักษณะของโครงสร้างคล้ายกัน ทำให้การแยกเกิดขึ้นทับกันเป็นกลุ่มๆ และแยกออกจากกันได้ยากด้วย ตัวทำละลายระบบนี้ (รูปที่ 19)

ในทำนองเดียวกันจากตารางที่ 13 เมื่อใช้ระบบของอะซิโตนในไตรกับน้ำ เป็น mobile phase โดยศึกษาพฤติกรรมการแยกในช่วง 35-60% ของอะซิโตนในไตรในน้ำ พบว่ามีลำดับของการแยก เรียงตามลำดับของสภาพขั้ว จากมากไปหาน้อยได้ดังนี้ คือ oestriol > 17 β -oestradiol > 17 α -oestradiol และ testosterone > oestrone > 17 α -hydroxyprogesterone > progesterone จากความแตกต่างของสภาพขั้วจะเห็นว่าตัวทำละลายระบบนี้แสดงลักษณะการแยกให้เห็นชัดเจนกว่าการใช้ระบบของเมทานอลกับน้ำ คือ มีการแยกสารที่มี stereochemistry ต่างกันได้ ในที่นี้คือแยก 17 β -oestradiol ออกจาก 17 α -oestradiol ใบบางส่วนที่อะซิโตนในไตรต่ำกว่า 50% โดยเฉพาะที่ 40% อะซิโตนในไตรในน้ำ มี resolution ชัดเจนมากขึ้นแต่ยังไม่ได้ baseline resolution เชื่อว่าจะสามารถแยกสารประกอบคู่นี้ได้เมื่อใช้อะซิโตนในไตร

ในปริมาณต่ำกว่า 35% นอกจากนี้ยังพบว่า oestrone จะมีสภาพขั้วลดลงมากกว่าในระบบของเมทานอลกับน้ำ โดยเปรียบเทียบ capacity factor (k') ของ oestrone ที่ 60% อะซีโตไนไตร หรือเมทานอลในน้ำมีค่า $k' = 1.55$ และ 6.11 ตามลำดับ ดังนั้น การแยกสตีรอยด์ฮอร์โมนจากธรรมชาติโดยระบบ reversed-phase HPLC เมื่อเลือกใช้อะซีโตไนไตรเป็นตัวทำละลาย จะแสดงให้เห็นพฤติกรรมการแยกได้ดีกว่าการใช้เมทานอลเป็นตัวทำละลาย (รูปที่ 20)

เนื่องจากใช้ระบบของ binary solvent แยกสตีรอยด์ฮอร์โมนจากธรรมชาติได้ผลไม่ดีจึงได้ทดลองแยกสตีรอยด์ดังกล่าวโดยใช้ระบบของ ternary solvent หรือปรับสภาพขั้วของ mobile phase ด้วยตัวทำละลายชนิดอื่น เช่น เตตระไฮโดรฟูราน หรือ ไดเอทิล อีเทอร์ เป็นต้น (ดังตารางที่ 14) ในกราฟรูปที่ 21 แสดงผลของระบบ mobile phase ชนิดต่างๆที่มีการปรับสภาพขั้วในการแยกสตีรอยด์ฮอร์โมนจากธรรมชาติ พบว่า การใช้เตตระไฮโดรฟูรานปรับสภาพ mobile phase จะมีค่า k' ต่ำใกล้เคียงกับระบบ MeOH/H₂O (70:30, v/v) หรือระบบ ACN/H₂O (50:50, v/v) แต่ไม่ทำให้พฤติกรรม การแยกดีขึ้น ในทำนองเดียวกันเมื่อใช้ไดเอทิล อีเทอร์ในปริมาณน้อยๆ (10%) 2 ระบบคือ MeOH/H₂O/DEE (50:40:10, v/v/v) และ MeOH/H₂O (50:50, v/v) + DEE (90:10, v/v) จะเห็นว่าสภาพขั้วของ mobile phase เปลี่ยนแปลงไปเป็นผลให้ค่า k' ของ สตีรอยด์ฮอร์โมนลดลงประมาณ 1 เท่าตัวแต่ยังมีพฤติกรรมการแยกเหมือนเดิม การที่ค่า k' ลดลงทำให้เวลาแยกสั้นลง เมื่อใช้ไดเอทิล อีเทอร์ ปรับสภาพ mobile phase ของระบบ ACN/H₂O (40:60, v/v) ก็ให้ผลในลักษณะเดียวกันคือ ค่า k' ลดลงประมาณครึ่งหนึ่ง ลักษณะของการแยกสตีรอยด์ฮอร์โมนที่มีโครงสร้างต่างกัน 2 แบบ คือ สตีรอยด์ที่มีโครงสร้าง ฟีนอลในวง A กับสตีรอยด์ที่มี α, β -unsaturated double bond ในวง A ในที่นี้ พิจารณาจาก oestriol และ oestrone มีระดับของค่า k' ลดลงน้อยกว่า testosterone ซึ่งมีค่า k' เปลี่ยนแปลงมากอย่างเห็นได้ชัด การที่ค่า k' ของสารประกอบ เอสโตรเจนมีขนาดลดลงน้อยกว่าสารประกอบโปรเจสเตอโรเจนนั้น มีรายงานอธิบายไว้ว่าเกิดจากผลของ organic modifier เช่น ไดเอทิล อีเทอร์ ที่เติมลงใน binary solvent โดย organic modifier เหล่านี้จะเกิด interaction กับเอสโตรเจนในลักษณะของ ฟันระไฮโดรเจนแล้วถูกสกัดกั้นไว้ใบบางบน stationary phase จากปรากฏการณ์นี้ถือว่าการปรับปรุงพฤติกรรมการแยกสตีรอยด์ฮอร์โมนทั้ง 2 กลุ่มนี้ได้ดีขึ้น

นอกจากนี้ ได้ศึกษาพฤติกรรมการแยกสตีรอยด์ฮอร์โมนโดยใช้ไดเอทิล อีเทอร์ เป็น organic modifier ในระบบของเมทานอลกับน้ำที่เปลี่ยนแปลงสภาพขั้วจาก 45-60% เมทานอลในน้ำแล้วนำตัวทำละลายนี้มาปรับสภาพขั้วอีกครั้งด้วยไดเอทิล อีเทอร์ 10 ใน 100 ส่วน ได้ผลการทดลองแสดงในตารางที่ 15 และ กราฟรูปที่ 22 เมื่อเปรียบเทียบพฤติกรรมการแยกระหว่างระบบ binary solvent (MeOH/H₂O) และระบบ ternary solvent (MeOH/H₂O/DEE) ที่ 60% เมทานอลในน้ำเมื่อสภาวะอื่นคงที่ พบว่า ค่า k' ของสตีรอยด์ที่สนใจมีค่าลดลงอย่างเห็นได้ชัดและขนาดของค่า k' ของโปรเจสโตเจนลดลงมากกว่าของเอสโตรเจนในลักษณะเดียวกันกับที่กล่าวไว้ข้างต้น จะเห็นว่าถ้าต้องการแยกสตีรอยด์ฮอร์โมนจากธรรมชาติออกจากกันควรจะใช้ mobile phase ที่ปรับสภาพด้วย organic modifier อีกชนิดหนึ่งในปริมาณน้อยๆ กับระบบเมทานอลกับน้ำโดยใช้เมทานอลในปริมาณต่ำกว่า 55% เพื่อให้ระบบการแยกมีความจำเพาะดีขึ้นและทำให้ค่า k' ของสตีรอยด์ฮอร์โมนลดลงจากเดิมอย่างน้อยประมาณ 2 เท่า เปรียบเทียบกับเวลาที่ใช้แยกเมื่อใช้เมทานอลกับน้ำ เป็น mobile phase อย่างเดียวนั้นคือการปรับปรุงความจำเพาะ และ capacity factor ของระบบที่กำลังศึกษาเพื่อประยุกต์ใช้แยกสตีรอยด์ฮอร์โมนประเภทต่อไป

3.3.6 การศึกษาพฤติกรรมการแยกสตีรอยด์ฮอร์โมนสังเคราะห์บางชนิด

(ก) การเลือกใช้ชนิดของอีเทอร์ เป็น organic modifier ตารางที่ 16 แสดงการเปรียบเทียบผลของการใช้ชนิดของอีเทอร์ เป็น organic modifier โดยเลือก binary solvent ที่เป็นส่วนผสมของเมทานอลกับน้ำในสัดส่วน 54 ต่อ 46 โดยปริมาตร และกราฟรูปที่ 23 แสดงความสัมพันธ์ระหว่าง k' ของสตีรอยด์และชนิดของอีเทอร์ที่ 5% ใน MeOH/H₂O (54:46, v/v) พบว่าเมื่อใช้ไดไอโซโพรพิล อีเทอร์ 5% เป็น organic modifier จะปรับปรุงความจำเพาะของการแยกได้ดีกว่าไดเอทิล อีเทอร์ และเตตระไฮโดรฟูราน และมีค่า k' อยู่ในช่วง 2-6 เปรียบเทียบกับการใช้ MeOH/H₂O (54:46, v/v) อย่างเดียวซึ่งมีความจำเพาะต่ำและมีค่า k' มาก เมื่อใช้ MeOH/H₂O (54:46, v/v) +DPE (95:5, v/v) สามารถแยก levonorgestrel ออกจาก norethynodrel ได้ดีขึ้น

(ข) การใช้ไดเอทิล อีเทอร์ เป็น organic modifier จากตารางที่ 17 พบว่าที่ 55% เมทานอลในน้ำแยก levonorgestrel norethynodrel ได้บางส่วนแล้ว แต่จะแยกได้ baseline resolution ที่ 45% เมทานอลในน้ำเป็นต้นไป อย่างไรก็ตามค่า k' ของสตีรอยด์ทั้งสองนี้จะเพิ่มขึ้น พิจารณาจากกราฟรูปที่ 24 ซึ่งแสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่า k' และ % MeOH/H₂O + DEE (90:10, v/v)

(ค) การใช้ไดไอโซโพรพิลอีเทอร์เป็น organic modifier จากตารางที่ 18 และ 19 พบว่า เมื่อใช้ไดไอโซโพรพิล อีเทอร์ 2% เติมลงใน 50% เมทานอลในน้ำ จะแสดงให้เห็นพฤติกรรมแยกได้ชัดเจน แต่ค่า k' ของสตีรอยด์ยังมีค่าสูง ส่วนที่ 55 และ 60% เมทานอลในน้ำ ไม่เกิดการแยกและมีความจำเพาะลดลงเมื่อใช้ไดไอโซโพรพิล อีเทอร์ 5 % เติมลงใน 50% เมทานอลในน้ำ จะสามารถแยกสารผสมได้ดีขึ้น เปรียบเทียบกับที่ใช้ไดไอโซโพรพิล อีเทอร์ 2% ใน 50% เมทานอลในน้ำเหมือนกัน จะเห็นว่าค่า k' ของระบบลดลง เกือบเท่าตัว ดังกราฟรูปที่ 25 และ 26

ได้ทดลองศึกษา % MeOH/H₂O อย่างละเอียดเมื่อกำหนดให้ไดไอโซโพรพิล-อีเทอร์ คงที่และศึกษาปริมาณของ DPE อย่างละเอียดเช่นเดียวกันเมื่อกำหนดให้ เมทานอลในน้ำที่เหมาะสมคงที่ ได้ผลการทดลองแสดงในตารางที่ 20 และ กราฟรูปที่ 27 จากการเปลี่ยนแปลงปริมาณของเมทานอลจาก 45-60% และปรับสภาพด้วยไดไอโซโพรพิล อีเทอร์ 5% พบว่าค่า k' ของสตีรอยด์ที่ศึกษามีค่าลดลงเรื่อยๆที่ 45% เมทานอลในน้ำ สามารถแยก สตีรอยด์ทั้ง 5 ชนิดออกจากกันได้แต่มีค่า k' สูงมาก ลำดับของการแยกระหว่าง ethinyloestradiol กับ progesterone จะมีพฤติกรรมแยกสลับกัน โดยที่เมทานอลต่ำกว่า 55% progesterone จะถูกแยกออกมาก่อน ethinyloestradiol ที่ 55% เมทานอลในน้ำ จะทำให้ progesterone มีค่า k' เท่ากับ ethinyloestradiol พอดี และหลังจาก นั้นเมื่อมีเมทานอลสูงกว่า 55% จะทำให้ ethinyloestradiol ถูกแยกออกมาก่อน progesterone อย่างไรก็ตามเป็นที่น่าสังเกตว่าตลอดช่วง 45-60% เมทานอลในน้ำ พบว่า levonorgestrel แยกออกจาก norethynodrel ได้อย่างชัดเจน และจาก 45-55% เมทานอลในน้ำจะสามารถแยก levonorgestrel ออกจาก norethynodrel ได้ดีโดยเฉพาะที่ 50% เมทานอลในน้ำ แต่จาก 55-60% เมทานอลในน้ำ จะทำให้ความจำเพาะของระบบลดลง (ดังโครมาโตแกรมแสดงในรูปที่ 33) ได้เลือกสภาวะที่เหมาะสมใน

การแยกสารผสมระบบนี้คือ MeOH/H₂O (54:46, v/v) + DPE (95:5 v/v) จากนั้นนำ mobile phase นี้มาประกอบการศึกษาปริมาณของไดไฮโซโพรพิล อีเทอร์ที่เหมาะสมโดยเปลี่ยนแปลงปริมาณของไดไฮโซโพรพิล อีเทอร์ จาก 1-10% ได้ผลการทดลองแสดงในตารางที่ 21 และกราฟรูปที่ 28 จะเห็นว่า เมื่อปริมาณไดไฮโซโพรพิล อีเทอร์เพิ่มขึ้นจาก 3-10% ระบบยังคงมีความจำเพาะของการแยกเหมือนเดิมแต่ค่า k' ของสัตรีอยคมีค่าลดลงเรื่อยๆ แต่ที่ 1-2% ไดไฮโซโพรพิล อีเทอร์ จะไม่มีผลทำให้สารผสมแยกออกจากกันได้ อย่างไรก็ตามไม่ว่าจะเลือกใช้ไดไฮโซโพรพิล อีเทอร์ หรือไดเอทิล อีเทอร์ เป็น organic modifier ก็ตาม จะมีขีดจำกัดของการใช้เนื่องจากค่าการละลายได้ของอีเทอร์ ในส่วนผสมของ mobile phase ดังนั้นหากมีความจำเป็นต้องใช้อีเทอร์เป็น organic modifier เพื่อใช้แยกสารตัวอย่างที่ต้องการแล้วจะต้องคำนึงถึงสิ่งเหล่านี้ นอกจากนี้ การใช้ mobile phase ที่มีส่วนผสมของอีเทอร์ปนอยู่จะทำให้ baseline drift ตลอดเวลาและเสถียรเป็นบางช่วงเท่านั้น ทำให้การวิเคราะห์ของหุคชั่วคราจะพบว่า baseline จะเสถียรเป็นการเปลี่ยนแปลงตัวทำละลายยิ่งไปกว่านี้อีเทอร์ชนิดต่างๆ มีกลิ่นเหม็น เนื่องจากมีจุดวาบไฟต่ำ จะระเหยอยู่ตลอดเวลาทำให้บรรยากาศขณะทดลองมีกลิ่นของอีเทอร์รบกวน และอาจเป็นผลร้ายต่อสุขภาพของผู้ทดลองอีกด้วย สำหรับการเตรียม mobile phase ระบบนี้ พบว่า ถ้าใช้ก๊าซไนโตรเจนเป็นตัวไล่ก๊าซออกจาก mobile phase จะทำให้ปริมาณของอีเทอร์ที่เติมลงไปลดลงและทำให้ค่า k' ของระบบเปลี่ยนแปลงไปด้วย

ตารางที่ 1 ค่า retention time (min) และ capacity factor (k') ของสเตียรอยด์ฮอร์โมนชนิดต่างๆ เมื่อเปลี่ยนแรงผลักดันของเมทานอลในน้ำ

Steroids	Mobile phase composition: MeOH/H ₂ O (v/v)									
	55/45	60/40	65/35	70/30	75/25	80/20	85/15	90/10		
Norethisterone	19.8(10.0)	11.8(5.55)	8.4(3.66)	5.6(2.11)	4.2(1.33)	3.4(0.88)			**	
Levonorgestrel	31.6(16.55)	18.0(9.0)	11.6(5.44)	7.4(3.11)	5.2(1.88)	4.2(1.33)	3.2(0.77)			2.6(0.44)
Norethynodrel	32.0(16.77)	18.0(9.0)	12.9(9.0)	7.4(3.11)	5.2(1.88)	4.2(1.33)		**		**
Ethinylloestradiol	24.6(12.66)	14.0(6.77)	9.6(4.33)	6.2(2.44)	4.4(1.44)	3.6(1.0)	3.0(0.66)			2.6(0.44)
Progesterone	60.0(32.33)	32.0(16.77)	19.2(9.66)	11.6(5.44)	7.2(3.0)	5.8(2.22)	4.2(1.33)			3.40(0.88)
Mestranol	132.0(72.77)	66.0(35.66)	37.2(19.66)	20.0(10.11)	11.8(5.55)	8.2(3.55)	5.4(2.0)			4.0(1.22)
Lyncoestrenol	**	**	**	**	32.0(16.77)	18.2(9.11)	9.6(4.33)			6.2(2.44)

* เลขในวงเล็บคือ $t_0 = 1.8$ นาที

** ไม่ได้คิดค่า

Conditions : Flow-rate : 2.0 ml/min , Sensitivity : 0.16 x10 mv Chart speed : 0.25 cm/min

ตารางที่ 2 ค่า retention time (min) และ capacity factor (k') ของสารแยกตัวร้อยละ 3 ชนิดเมื่อเปลี่ยนเฟสของเมทาบอลิซึม

Steroid	Mobile phase composition : MeOH/H ₂ O (v/v)					
	85/15	86/14	87/13	88/12	89/11	90/10
Progesterone	4.2(1.33)	4.0(1.22)	3.9(1.13)	3.8(1.11)	3.4(0.88)	3.3(0.83)
Mestranol	5.4(2.0)	5.2(1.88)	5.0(1.77)	4.6(1.55)	4.0(1.22)	3.9(1.17)
Lynoestronol	9.6(4.33)	9.4(4.22)	8.8(3.88)	8.0(3.44)	6.6(2.66)	6.2(2.44)

* เลขในวงเล็บ

** สภาพการทดลองอื่นเหมือนในตารางที่ 1

ตารางที่ 3 ค่า retention time (min) และ capacity factor (k') ของสารร้อยละ 3 ชนิดต่าง เมื่อเปลี่ยนเฟสของซิลิกาโครโมกราฟี

Steroids	Mobile phase composition : Acetonitrile/water (v/v)											
	35/65	40/60	45/55	50/50	55/45	60/40	65/35	70/30	75/25	80/20	85/15	90/10
Norethisterone	**	13.4(6.44)	9.0(4.0)	6.8(2.77)	5.2(1.88)	4.6(1.55)	3.6(1.0)	3.2(0.77)	3.0(0.66)	2.8(0.55)	2.6(0.44)	2.4(0.33)
Ethinylloestradiol	28.2(14.66)	16.0(7.88)	10.0(4.55)	7.2(3.0)	5.4(2.0)	4.4(1.44)	3.4(0.88)	3.0(0.66)	2.8(0.55)	2.6(0.44)	2.4(0.33)	2.2(0.22)
Levonorgestrel	39.0(20.66)	22.0(4.22)	14.0(6.77)	10.0(4.55)	7.4(3.11)	6.0(2.33)	4.8(1.66)	3.2(1.11)	3.4(0.88)	3.2(0.77)	3.0(0.66)	2.8(0.55)
Norethynodrel	**	22.8(11.66)	14.0(6.77)	10.0(4.55)	7.4(3.11)	6.0(2.33)	4.6(1.55)	4.0(1.22)	3.4(0.88)	3.2(0.77)	3.0(0.66)	2.8(0.55)
Progesterone	85.0(46.22)	44.4(23.66)	25.6(13.22)	17.4(8.66)	12.0(5.66)	9.2(4.11)	7.0(2.8)	5.8(2.22)	4.8(1.66)	4.2(1.33)	3.6(1.00)	3.4(0.88)
Mestranol	**	74.0(40.11)	37.6(13.22)	24.4(12.55)	15.6(7.66)	11.2(5.22)	7.8(3.33)	6.2(2.44)	5.0(1.77)	4.2(1.33)	3.4(0.88)	3.2(0.77)
Lynoestronol	**	**	37.6(19.88)	**	**	**	19.4(9.77)	10.4(6.77)	10.4(4.77)	2.0(3.44)	6.4(2.55)	5.2(1.88)

* เลขในวงเล็บ เมื่อ t₀ = 1.8 นาที

** ไม่ได้ศึกษา

*** สภาพการทดลองอื่นเหมือนในตารางที่ 1

ตารางที่ 4 การเปลี่ยนแปลงอัตราการไหลของสเตียรอยด์ฮอร์โมน

Steroids	Flow-rate (ml/min)	t ₀ (sec)	u (mm/sec)	t _r (sec)	w _t (sec)	N	H (μm)
Ethinyl- oestradiol	0.5	258.0	0.39	696.0	90.0	957	104.5
	1.0	129.0	0.78	349.5	48.0	848	117.9
	1.5	85.5	1.17	234.0	36.0	676	147.9
	2.0	67.5	1.48	181.5	28.5	649	154.1
	2.5	50.4	1.98	148.4	22.8	617	164.8
	3.0	43.2	2.32	120.0	19.7	594	168.4
	3.5	36.0	2.78	102.0	16.8	590	169.5
Progesterone	0.5	258.0	0.39	978.0	120.0	1063	94.1
	1.0	129.0	0.78	490.5	67.5	845	118.3
	1.5	85.5	1.17	327.0	52.5	621	161.0
	2.0	67.5	1.48	255.0	42.0	590	169.5
	2.5	50.4	1.98	198.0	33.6	556	179.8
	3.0	43.2	2.32	166.8	27.6	537	186.2
	3.5	36.0	2.78	144.0	25.2	523	191.2
Mestranol	0.5	258.0	0.39	1236.0	162.0	931	107.4
	1.0	129.0	0.78	619.5	87.0	811	123.3
	1.5	85.5	1.17	414.0	66.0	630	158.7
	2.0	67.5	1.48	325.5	52.5	615	162.6
	2.5	50.4	1.98	248.4	40.8	593	168.6
	3.0	43.2	2.32	211.2	34.8	589	169.8
	3.5	36.0	2.78	181.2	30.0	584	171.2
Lynoestrenol	0.5	258.0	0.39	2202.0	294.0	898	111.4
	1.0	129.0	0.78	1104.0	154.5	817	122.4
	1.5	85.5	1.17	739.5	120.0	608	164.5
	2.0	67.5	1.48	579.0	96.0	582	171.8
	2.5	50.4	1.98	444.0	74.4	570	175.4
	3.0	43.2	2.32	376.8	63.6	562	177.9
	3.5	36.0	2.78	324.0	55.2	551	181.5

* Conditions : Mobile phase : MeOH/H₂O (85:15 ,v/v.)
 Sensitivity : 0.08 x 10 mV ; Chart speed : 2.5 cm/min
 Injection volume: 5 μl of mixture of ethinyl-
 oestradiol (25 ppm) progesterone (50 ppm) mestranol (37.5 ppm)
 and lynoestrenol (250 ppm)

ตารางที่ 5 การสร้างกราฟ $\frac{H}{U}$ เทียบกับ U ของ ethinyloestradiol *

Flow-rate (ml/min)	U (mm/sec)	H (μ m)	$\frac{H}{U}$ (sec)
0.5	0.39	104.5	0.268
1.0	0.78	117.9	0.151
1.5	1.17	147.9	0.126
2.0	1.48	154.1	0.104
2.5	1.98	164.8	0.083
3.0	2.32	168.4	0.073
3.5	2.78	169.5	0.061

* ข้อมูลของ ethinyloestradiol จากตารางที่ 4

ตารางที่ 6 การเปลี่ยนแปลงอัตราการไหลของผลิตภัณฑ์ใหม่

Steroids	Flow-rate (ml/min)	t_0 (sec)	U (mm/sec)	t_R (sec)	$\frac{W}{t}$ (sec)	N	H (μ m)
Ethinyloestradiol	0.5	256.8	0.40	604.8	68.4	1251	79.94
	1.0	120.9	0.83	301.8	36.0	1125	88.37
	1.5	78.9	1.27	201.9	25.8	980	102.04
	2.0	59.7	1.68	153.0	21.0	849	117.79
	2.5	48.6	2.06	123.3	18.3	726	137.74
	3.0	40.6	2.47	104.4	15.9	690	144.93
	3.5	35.1	2.85	90.0	14.4	625	160.00
	4.0	30.9	3.24	79.8	13.2	585	170.94
Levonorgestral	0.5	256.8	0.40	760.8	85.8	1258	79.49
	1.0	120.9	0.83	379.8	45.0	1140	87.72
	1.5	78.9	1.27	254.7	31.8	1026	97.47
	2.0	59.7	1.68	192.6	26.1	871	114.81
	2.5	48.6	2.06	155.4	22.8	743	134.59
	3.0	40.6	2.47	131.1	19.5	723	138.31
	3.5	35.1	2.85	113.4	17.7	657	152.21
	4.0	30.9	3.24	100.5	16.5	594	168.35
Progesterone	0.5	256.8	0.40	1005.6	113.6	1254	79.75
	1.0	120.9	0.83	490.3	55.8	1238	80.78
	1.5	78.9	1.27	337.8	41.4	1065	93.90
	2.0	59.7	1.68	255.6	34.8	863	115.38
	2.5	48.6	2.06	223.2	29.4	922	108.46
	3.0	40.6	2.47	173.1	25.5	737	135.69
	3.5	35.1	2.85	149.4	22.5	705	141.84
	4.0	30.9	3.24	132.0	20.4	677	147.71

* Conditions : Sensitivity = 0.16×10 mV , Chart speed : 2.5 cm./min., Injection volume: 10 μ l of mixture of ethinyloestradiol (25 ppm.) levonorgestral (250 ppm.) and progesterone (50 ppm.)

ตารางที่ 7 การสร้างกราฟ $\frac{H}{U}$ เทียบกับ U ของ ethinyloestradiol*

Flow-rate (ml/min)	U (mm/sec)	H (μ m)	$\frac{H}{U}$ (sec)
0.5	0.40	79.94	0.200
1.0	0.83	88.87	0.107
1.5	1.27	102.04	0.080
2.0	1.68	117.79	0.070
2.5	2.06	137.74	0.067
3.0	2.47	144.93	0.059
3.5	2.85	160.00	0.056
4.0	3.24	170.94	0.053

* ข้อมูลของ ethinyloestradiol จากตารางที่ 6

ตารางที่ 8 ค่า retention time (min) เมื่อเปลี่ยนแปลงอัตราการใช้ของ mobile phase 3 ระบบ*

ACN/H ₂ O(v/v) Steroids	Flow-rate (ml/min)		
	1.0	1.5	2.0
ACN/H ₂ O(80:20,v/v)			
Ethinyloestradiol	5.0	3.4	2.6
Levonorgestrel	6.2	4.2	3.2
Progesterone	8.2	5.6	4.2
ACN/H ₂ O(85:15,v/v)			
Ethinyloestradiol	4.6	3.2	2.4
Levonorgestrel	5.6	4.0	3.0
Progesterone	7.4	5.0	3.6
ACN/H ₂ O(90:10,v/v)			
Ethinyloestradiol	4.4	3.0	2.2
Levonorgestrel	5.4	3.8	2.8
Progesterone	6.6	4.6	3.4

* Conditions : Sensitivity : 0.08 x 10 mV , and Chart Speed : 0.25 cm/min

ตารางที่ 9 ค่า resolution (R_s) ของสเตียรอยด์ฮอร์โมนบางตัว

Resolution (R _s)	Flow-rate (ml /min)							
	0.5	1.0	1.5	2.0	2.5	3.0	3.5	4.0
R _s ^{EE,LNT}	2.02	1.93	1.83	1.68	1.56	1.51	1.49	1.39
R _s ^{LNT,P}	2.46	2.20	2.27	2.07	1.91	1.87	1.79	1.71

* คำนวณจากข้อมูลในตารางที่ 6

ตารางที่ 10 ความสูงของพีค และ peak height ratio ของสเตียรอยด์ฮอร์โมนความยาวคลื่นต่างๆ

Compounds	Peak height (cm)			280 nm	Peak height ratio		Injection volume and concentration of steroid used
	213 nm	254 nm	280 nm		A ₂₁₃ / A ₂₈₀	A ₂₅₄ / A ₂₈₀	
Norethisterone	10.3	38.60	1.20	8 : 1	32 : 1	5 µl, 1,000 ppm	
Levonorgestrel	9.95	37.80	1.10	9 : 1	34 : 1	10 µl, 500 ppm	
Norethynodrel	16.20	0.55	0.20	81 : 1	3 : 1	15 µl, 1,000 ppm	
Progesterone	7.35	25.60	0.95	8 : 1	27 : 1	10 µl, 500 ppm	
Lynoestrenol	1.60	**	0.10	16 : 1	-	10 µl, 500 ppm	
Ethinylloestradiol	6.35	0.15	1.20	5 : 1	1 : 8	1 µl, 1,000 ppm	
Mestranol	4.60	0.11	0.95	42 : 1	1 : 8	2 µl, 1,000 ppm	

** = No response

Conditions Mobile phase : MeOH/H₂O (75:25, v/v)

Flow-rate : 2.0 ml /min

Sensitivity : 0.16 x 10 mV

Chart speed : 0.25 cm /min

ตารางที่ 11 peak height ratios ของสเตียรอยด์ฮอร์โมนที่มีความยาวคลื่นต่างๆ

Compounds	Peak height (cm)			Peak height ratios *	
	213 nm	254 nm	280 nm	A ₂₁₃ /A ₂₈₀	A ₂₁₃ /A ₂₅₄
Ethinylloestra- diol	3.15	**	0.45	7 : 1	-
Levonorgestrel	7.93(4.10)	(12.20)	0.35	22 : 1	(1 : 3)
Progesterone	1.25	3.63	0.05	25 : 1	1 : 3

* Sensitivity : 0.16 x 10 mV

() " : 0.32 x 10 mV

** No response

Conditions Mobile phase : ACN/H₂O (80:20, v/v)

Flow-rate : 2.0 ml /min Pressure 400 psi

Chart speed : 0.25 cm /min

Injection volume: 10 µl of mixture of Ethinylloestadiol
(25 ppm), levonorgestrel (250 ppm) and progesterone
(50 ppm)

ตารางที่ 12 ค่า retention time (t_r , min) และ capacity factor* (k') ของสเตียรอยด์จากธรรมชาติ เมื่อเปลี่ยนแปลงสัดส่วนของเมทานอลในน้ำ

Steroids	CH ₃ OH/H ₂ O (x : y, v/v)					
	80 : 20	75 : 25	70 : 30	65:35	60:40	55:45
1. Oestriol	2.2(0.22)	2.4(0.33)	2.8(0.55)	5.6(1.0)	4.8(1.66)	6.0(2.33)
2. Oestrone	3.8(1.11)	4.4(1.44)	6.0(2.33)	8.8(3.88)	12.8(6.11)	**
3. 17 α -Oestradiol	3.8(1.11)	4.8(1.66)	6.4(3.55)	9.8(4.44)	14.8(7.22)	**
4. 17 β -Oestradiol	3.8(1.11)	4.8(1.66)	6.4(2.55)	9.8(4.44)	14.0(6.77)	**
5. Testosterone	4.1(1.27)	4.8(1.66)	6.8(2.77)	10.0(4.55)	15.0(7.33)	**
6. 17 α -Hydroxyprogesterone	4.0(1.22)	4.8(1.66)	6.8(2.77)	10.4(4.77)	16.0(7.88)	**
7. Progesterone	5.7(2.16)	7.2(3.0)	11.6(5.44)	19.2(9.66)	32.0(16.77)	60.0(32.33)

* เลขในวงเล็บ

** ไม่ได้วิเคราะห์ และสภาวะการทดลองเหมือนในตารางที่ 1

ตารางที่ 13 ค่า retention time (min) และ capacity factor* (k') ของสเตียรอยด์ฮอร์โมนจากธรรมชาติ เมื่อเปลี่ยนแปลงสัดส่วนของอะซิโตนในไตรโนน้ำ

Steroids	Mobile phase composition : CH ₃ CN/H ₂ O (x:y,v/v)					
	60 : 40	55:45	50 : 50	45 : 55	40 : 60	35 : 65
1. Oestriol	2.0(0.11)	2.2(0.22)	2.6(0.44)	2.8(0.55)	3.6(1.0)	4.2(1.33)
2. 17 β -Oestradiol	4.0(1.22)	4.6(1.55)	6.0(2.33)	7.8(3.33)	11.6(5.44)	**
3. 17 α -Oestradiol	4.2(1.33)	5.0(1.77)	6.6(2.66)	8.8(3.88)	13.2(6.33)	**
4. Testosterone	4.2(1.33)	5.2(1.88)	6.6(2.66)	8.4(3.66)	13.2(6.33)	19.6(9.88)
5. Oestrone	4.6(1.55)	6.0(2.33)	8.0(3.44)	10.8(5.0)	16.8(8.33)	28.6(14.88)
6. 17 α -Hydroxyprogesterone	4.8(1.66)	6.2(2.44)	8.2(3.55)	11.2(5.22)	18.4(9.22)	29.0(15.11)
7. Progesterone	9.2(4.11)	12.0(5.66)	17.4(8.66)	25.6(13.22)	44.4(23.66)	85.0(46.22)

* เลขในวงเล็บ เมื่อ $t_0 = 1.8$ นาที

** ไม่ได้วิเคราะห์และสภาวะการทดลองเหมือนในตารางที่ 3

ตารางที่ 14 ค่า retention time (t_r , min) และ capacity factor* (k') ของสเตียรอยด์ฮอร์โมนจากธรรมชาติเมื่อใช้ organic modifier ชนิดต่างๆ

Steroids	Retention time and Capacity factor		
	THF/H ₂ O (50:50 v/v)	MeOH/H ₂ O/DEE (50:40:10 v/v/v)	ACN/H ₂ O(40:60,v/v)+ DEE(90:10 ,v/v)
Oestriol	3.0(0.66)	3.4(0.88)	3.0(0.66)
Testosterone	4.6(1.55)	6.6(2.66)	7.6(3.22)
17 β -Oestradiol	5.6(2.11)	9.2(4.11)	**
17 α -Hydroxy- progesterone	6.2(2.44)	7.2(3.0)	10.2(4.66)
17 α -Oestradiol	6.6(2.66)	9.6(4.33)	**
Oestrone	7.2(3.0)	8.6(3.77)	12.0(5.66)
Progesterone	8.0(3.44)	11.6(5.44)	21.8(11.11)

* เลขในวงเล็บ

** ไม่ได้คัดสารและสภาวะการทดลองอื่นเหมือนในตารางที่ 1

ตารางที่ 15 ค่า retention time (t_r , min) และ capacity factor* (k') ของสเตียรอยด์ฮอร์โมนเมื่อใช้ส่วนผสมของ mobile phase

Steroids	Ternary mixture of MeOH/H ₂ O(v/v) +DEE (90:10,v/v)			
	45/55	50/50	55/45	60/40
Oestriol	5.6(2.11)	5.0(1.44)	3.6(1.0)	2.8(0.55)
Testosterone	12.0(5.66)	9.2(4.11)	7.0(2.88)	5.4(2.0)
17 α -Hydroxypro- gesterone	14.6(7.11)	10.6(4.88)	7.6(3.22)	6.0(2.33)
Oestrone	**	13.4(6.44)	9.2(4.11)	6.4(2.55)
17 β -Oestradiol	21.2(10.77)	14.4(7.0)	9.6(4.35)	7.2(3.0)
17 α -Oestradiol	**	16.0(7.88)	10.4(4.77)	7.4(3.11)
Progesterone	26.0(13.44)	18.0(9.0)	12.6(6.0)	9.0(4.0)

* เลขในวงเล็บ

** ไม่ได้คัดสารและสภาวะการทดลองอื่นเหมือนในตารางที่ 1

ตารางที่ 16 ค่า retention time (t_r , min) และ capacity factor* (k') ของสเตียรอยด์ที่ใช้อิเทอร์ชนิดต่างๆ เป็นตัวรับสภาพของ mobile phase

Steroids	MeOH/H ₂ O (54:46, v/v)	Ternary mixture of MeOH/H ₂ O (54:46, v/v) + ether (95:5, v/v)		
		Diisopropyl ether	Diethyl ether	Tetrahydrofuran
Norethisterone	24.4(12.55)	5.6(2.11)	9.4(4.22)	12.0(5.66)
Levonorgestrel	39.8(21.11)	7.8(3.33)	14.2(6.88)	12.6(9.33)
Norethynodrel	40.4(21.44)	9.4(4.22)	15.8(7.77)	19.6(9.88)
Ethinylloestradiol	31.6(16.55)	11.6(5.44)	16.2(8.0)	19.8(10.0)
Progesterone	**	**	21.6(11.0)	29.0(15.11)

* เลขในวงเล็บ

** ไม่ได้วิเคราะห์และสภาวะการทดลองอื่นเหมือนในตารางที่ 1

ตารางที่ 17 ค่า retention time (t_r , min) และ capacity factor* (k') ของสเตียรอยด์ที่ใช้อิเทอร์ชนิดต่างๆ เป็นตัวรับสภาพของ mobile phase

Steroid	Ternary mixture of MeOH/H ₂ O (v/v) + DEE (90:10, v/v)			
	40/60	45/55	50/50	55/45
Norethindrone	15.0(7.33)	11.0(5.11)	8.4(3.66)	6.2(2.44)
Levonorgestrel	28.0(12.88)	17.6(8.77)	12.5(6.0)	8.8(3.88)
Norethynodrel	31.2(16.33)	21.6(11.0)	14.8(7.22)	10.0(4.55)
Ethinylloestradiol	43.2(23.0)	26.4(13.66)	16.8(8.33)	10.6(4.88)
Progesterone	**	26.0(13.44)	18.0(9.0)	12.6(6.0)
				60/40

* เลขในวงเล็บ

** ไม่ได้วิเคราะห์และสภาวะการทดลองอื่นเหมือนในตารางที่ 1

ตารางที่ 18 ค่า retention time (t_r , min) และ capacity factor* (k') ของสเตียรอยด์เมื่อใช้ 2% DPE

Steroids	Ternary mixture of MeOH/H ₂ O (v/v) + DPE (98:2,v/v)		
	50/50	55/45	60/40
Norethisterone	12.4(5.88)	11.8(5.55)	7.8(3.33)
Levonorgestrel	19.6(9.88)	18.0(9.0)	11.4(5.33)
Norethynodrel	23.4(12.0)	20.0(10.11)	12.2(5.77)
Ethinylloestradiol	26.4(13.55)	20.4(10.33)	11.8(5.55)
Progesterone	32.6(17.11)	26.3(13.6)	17.6(8.77)

* เลขในวงเล็บ และใช้สภาวะการทดลองเหมือนในตารางที่ 1

ตารางที่ 19 ค่า retention time (t_r , min) และ capacity factor* (k') ของสเตียรอยด์เมื่อใช้ 5% DPE.

Steroids	Ternary mixture of MeOH/H ₂ O (v/v) + DPE (95:5,v/v)			
	45/55	50/50	55/45	60/40
Norethisterone	9.8(5.3)	7.4(3.11)	6.2(2.44)	5.0(1.77)
Levonorgestrel	16.2(9.13)	11.4(5.33)	8.8(3.88)	6.6(2.66)
Norethynodrel	22.0(12.75)	13.6(6.55)	10.6(4.88)	7.4(3.11)
Ethinylloestradiol	34.2(20.38)	19.0(9.55)	12.6(6.0)	8.2(3.55)
Progesterone	25.0(14.63)	16.2(8.0)	12.6(6.0)	9.4(4.22)

* เลขในวงเล็บ และใช้สภาวะการทดลองเหมือนในตารางที่ 1

ตารางที่ 20 ค่า retention time (t_r , min) และ capacity factors* (k') ของสารออกฤทธิ์ไม่เมื่อเปลี่ยนแปลง % ของ MeOH/H₂O

Steroids	Ternary mixture of MeOH/H ₂ O (x : y, v/v) + Diisopropyl ether (95 : 5, v/v)									
	45/55	50/50	52/48	53/47	54/46	55/45	56/44	58/42	60/40	
Norethindrone	9.8(5.13)	7.4(3.11)	6.6(2.66)	6.4(2.55)	6.2(2.44)	6.2(2.44)	5.8(2.22)	5.4(2.0)	5.0(1.77)	
Levonorgestrel	16.2(5.33)	11.4(5.33)	9.4(4.22)	9.4(4.22)	9.0(4.0)	8.8(3.88)	8.6(3.77)	7.8(3.33)	6.6(2.66)	
Norethy nodrel	22.0(12.75)	13.6(6.55)	11.6(5.44)	11.4(5.33)	11.0(5.11)	10.6(4.88)	10.0(4.55)	8.6(3.77)	7.4(3.11)	
Ethinylloestradiol	34.3(20.38)	19.0(9.55)	15.0(7.33)	14.2(6.88)	13.6(6.55)	12.6(6.0)	11.8(5.55)	14.4(4.77)	8.2(3.55)	
Progesterone	25.0(14.63)	16.2(8.0)	13.4(6.44)	13.0(6.22)	12.8(6.11)	12.6(6.0)	12.4(5.88)	11.0(5.11)	9.4(4.22)	

* เลขในวงเล็บ และใช้สภาวะการทดลองเหมือนในตารางที่ 1

ตารางที่ 21 ค่า retention time (t_r , min) และ capacity factor* (k') ของสารออกฤทธิ์ไม่เมื่อเปลี่ยนแปลง % ของไดไอโซโพรพิล อีเทอร์

Steroids	Ternary mixture of MeOH/H ₂ O (54 : 46, v/v) + DPE (x : y, v/v)									
	99/1	98/2	97/3	96/4	95/5	94/6	93/7	92/8	91/9	90/10
Norothisterone	12.6(6.0)	9.4(4.22)	7.6(3.22)	6.4(2.55)	5.6(2.11)	4.8(1.66)	4.2(1.63)	3.8(1.38)	3.4(1.13)	2.8(1.33)
Levonorgestrel	19.6(9.88)	14.4(7.0)	11.2(5.22)	9.4(4.22)	7.8(3.33)	7.0(2.88)	6.0(2.75)	7.7(2.38)	4.8(2.0)	4.2(2.5)
Norethy nodrel	21.2(10.77)	16.2(8.0)	13.0(6.22)	11.4(5.33)	9.6(4.33)	8.6(3.77)	7.2(3.5)	6.8(3.25)	5.8(2.63)	5.4(3.5)
Ethinylloestradiol	19.8(10.0)	16.6(8.22)	14.6(7.11)	13.6(6.55)	12.0(5.66)	11.0(5.11)	9.2(4.35)	8.8(4.5)	7.8(3.75)	7.2(5.0)

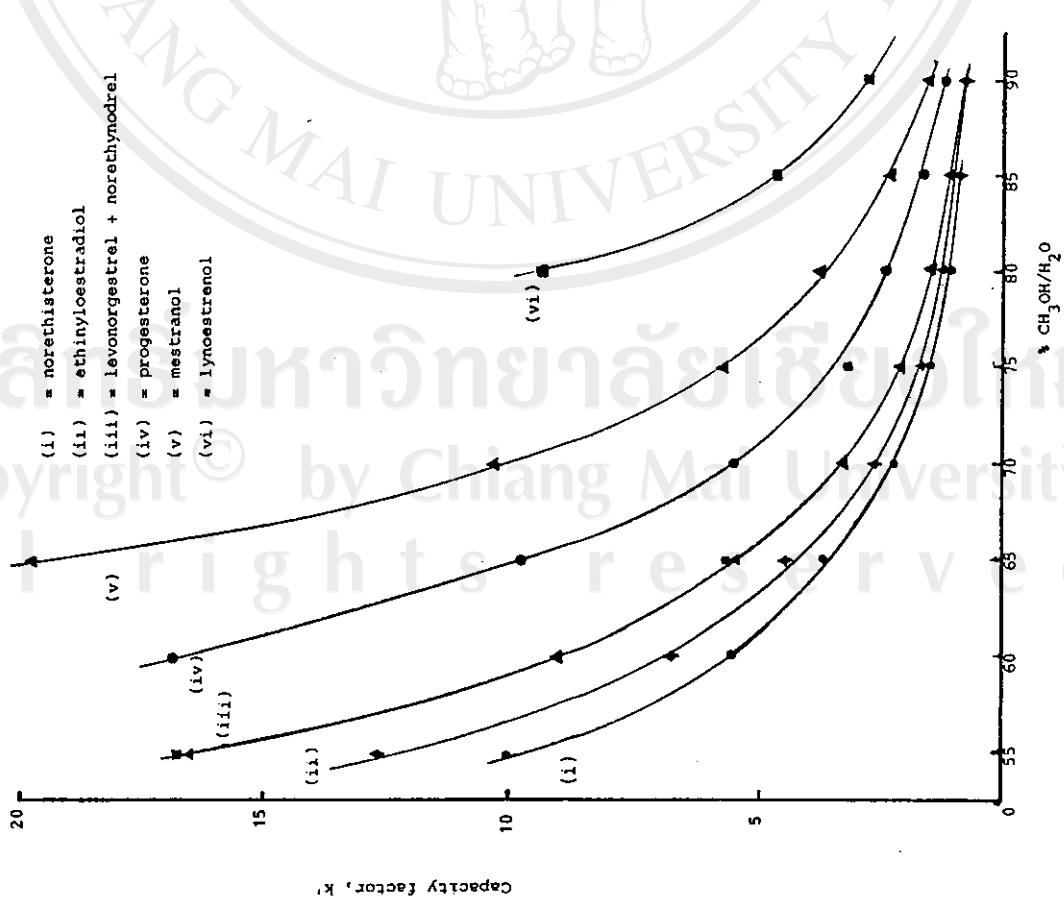
* เลขในวงเล็บ และใช้สภาวะการทดลองเหมือนในตารางที่ 1

ตารางที่ 22 คา ำ retention time (min) และ capacity factor (k') ของสารด้วยตัวออร์โงานิกแยกด้วย mobile phase 3 ระยะ

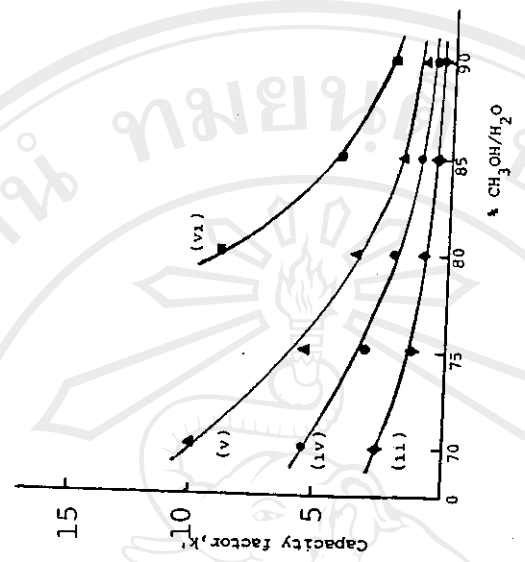
Steroids	Mobile phases			
	MeOH/H ₂ O(85:15, v/v) ^{a/}	ACN/H ₂ O(60:40, v/v) ^{a/}	ACN/H ₂ O (80:20, v/v) ^{a/}	ACN/H ₂ O(80:20, v/v) ^{b/}
Ethinylloestradiol	3.0(0.66)	4.4(1.44)	2.6(0.44)	3.4(0.88)
Levonorgestrel	3.2(0.77)	6.0(2.33)	3.2(0.77)	4.2(1.33)
Mestranol	5.4(2.00)	11.2(5.22)	4.2(1.33)	**
Lynoeestrenol	9.6(4.33)	**	8.0(3.44)	**
Progesterone(I.S.)	4.2(1.33)	9.2(4.11)	4.2(1.33)	5.6(2.11)

* เลขในวงเล็บ
 ** ไม่ได้คิดสาร

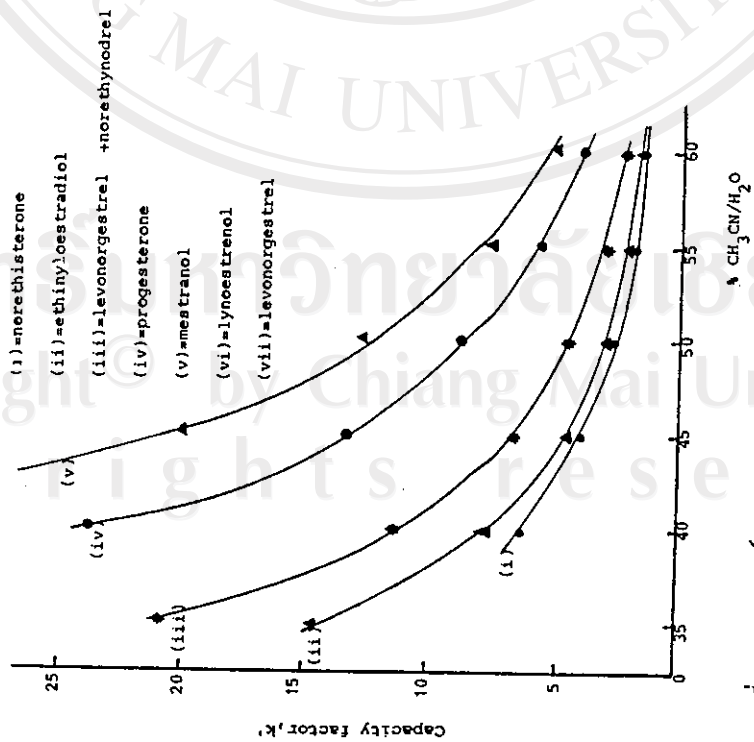
a/ ใช้ต่อการไหล เท่ากับ 2.0 มล. ต่อ นาที
 b/ ใช้ต่อการไหล เท่ากับ 1.5 มล. ต่อ นาที



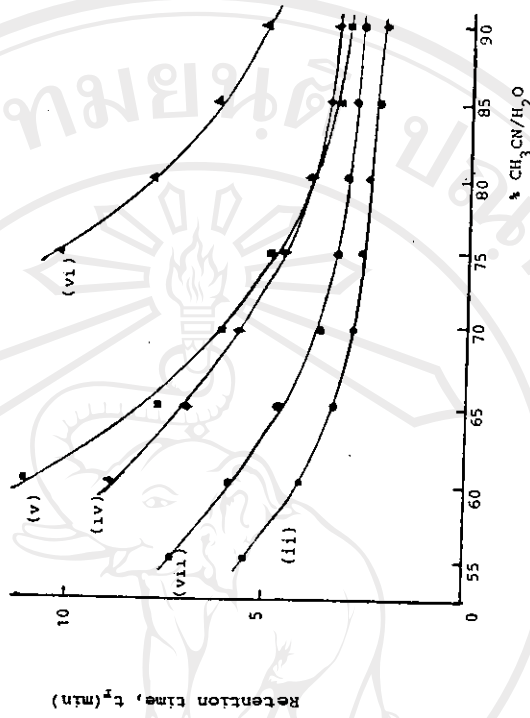
รูปที่ 11 ความสัมพันธ์ของ Capacity factor (k') กับ $\text{CH}_3\text{OH}/\text{H}_2\text{O}$ ในทางแยกตัวของฮอร์โมนบางตัว



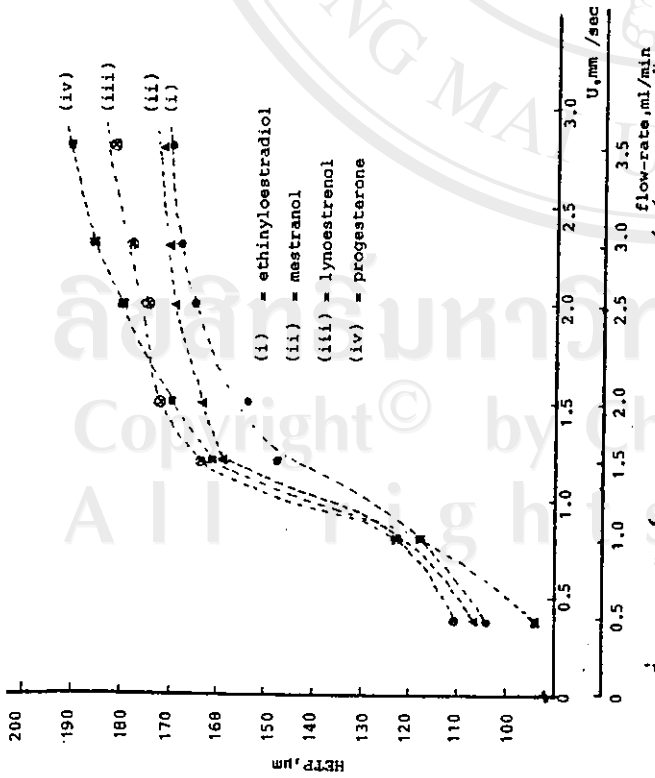
รูปที่ 12 ความสัมพันธ์ของ Capacity factor (k') กับ $\text{CH}_3\text{OH}/\text{H}_2\text{O}$ ในทางแยกตัวของฮอร์โมนบางตัว



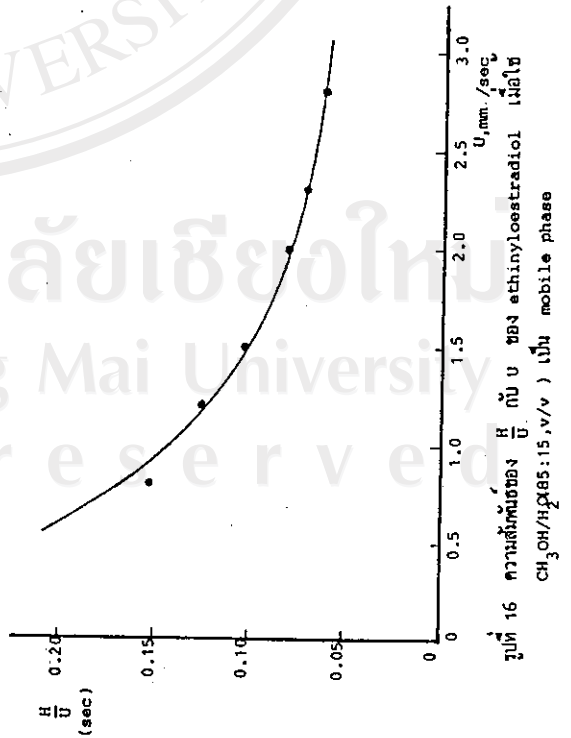
รูปที่ 13 ความสัมพันธ์ของ Capacity factor (k') กับ $\text{CH}_3\text{CN}/\text{H}_2\text{O}$ ในการแยกสตีรอยด์ในแบบต่าง ๆ



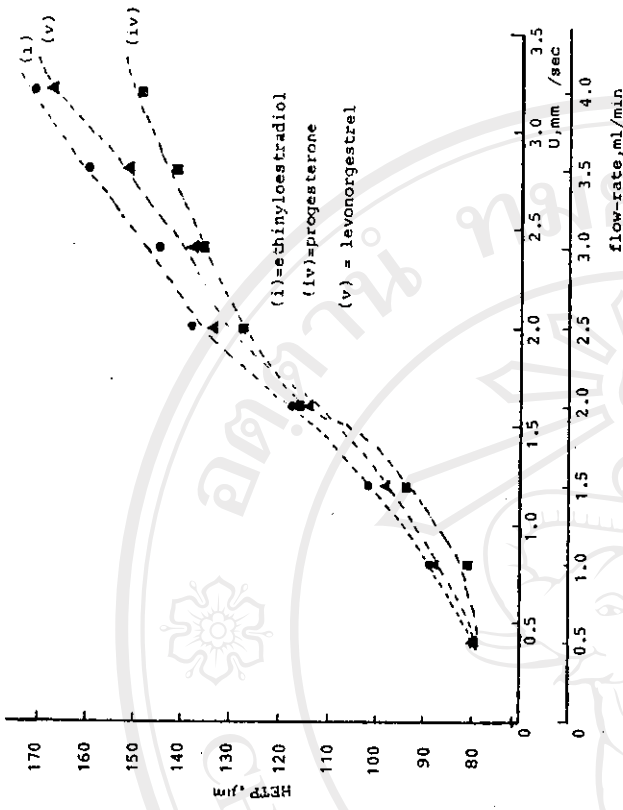
รูปที่ 14 ความสัมพันธ์ของ retention time (t_R) กับ $\text{CH}_3\text{CN}/\text{H}_2\text{O}$ ในการแยกสตีรอยด์ในแบบต่าง ๆ



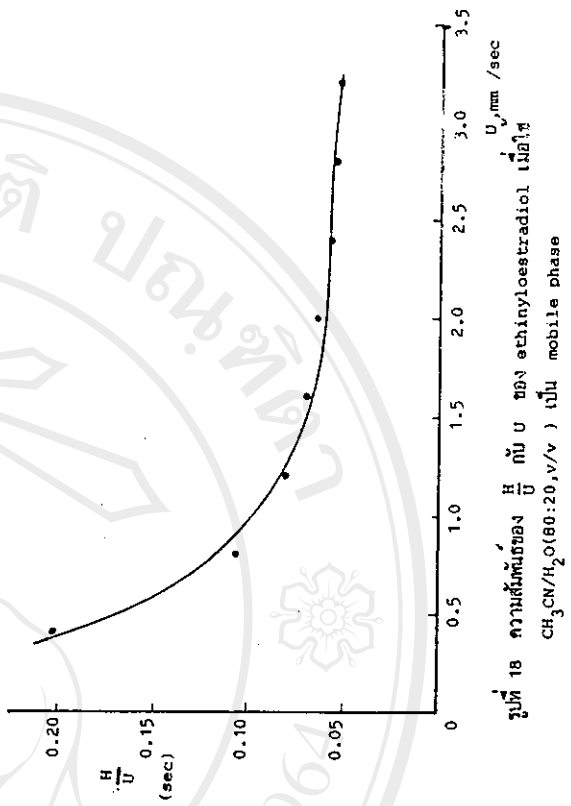
รูปที่ 15 ความสัมพันธ์ของ HETP กับ U ในการแยกสารด้วยคอลัมน์บางตัวโดยใช้ CH₃OH/H₂O(85:15, v/v) เป็น mobile phase



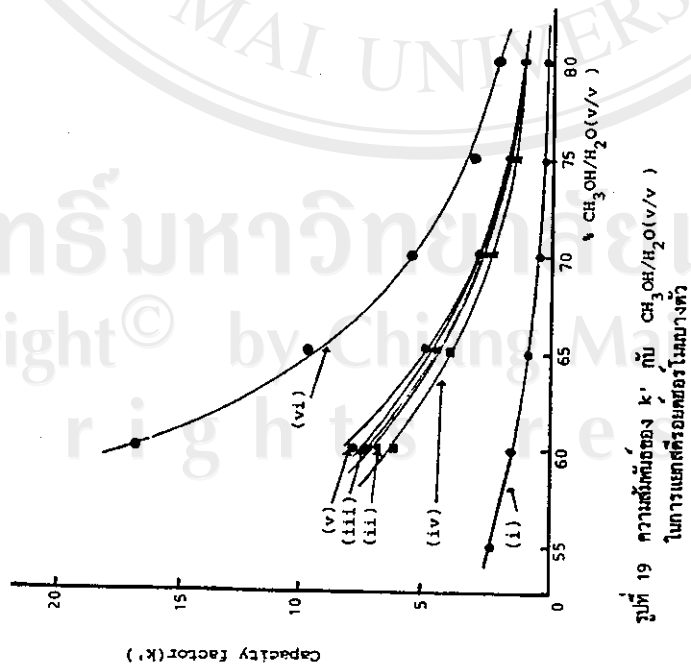
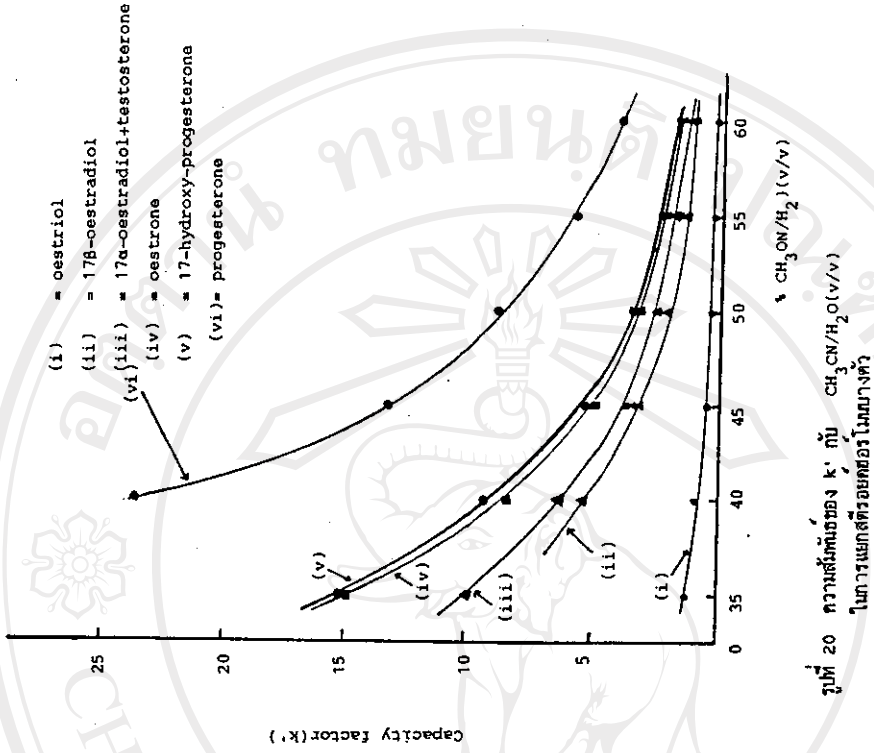
รูปที่ 16 ความสัมพันธ์ของ $\frac{H}{U}$ กับ U ของ ethinyloestradiol เมื่อใช้ CH₃OH/H₂O(85:15, v/v) เป็น mobile phase



รูปที่ 17 ความสัมพันธ์ของ HETP กับ U ในการแยกสารด้วยคอลัมน์บางตัวโดยใช้ CH₃CN/H₂O(80:20, v/v) เป็น mobile phase

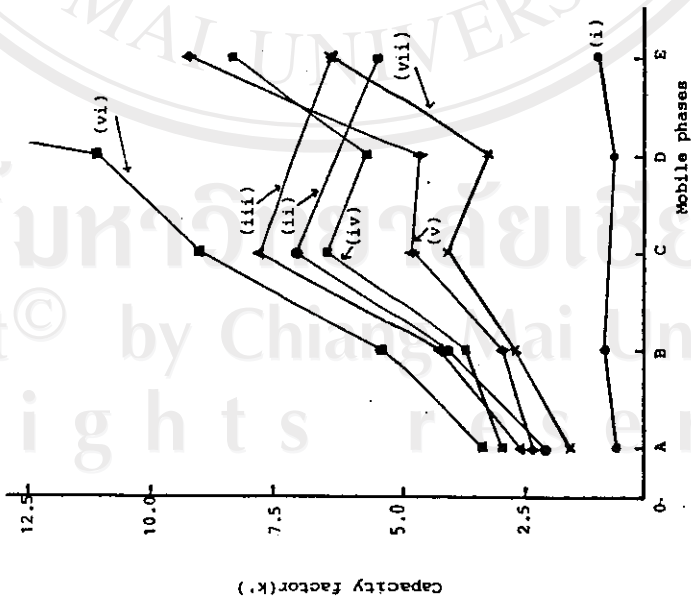


รูปที่ 18 ความสัมพันธ์ของ $\frac{H}{U}$ กับ U ของ ethinyloestradiol เมื่อใช้ CH₃CN/H₂O(80:20, v/v) เป็น mobile phase



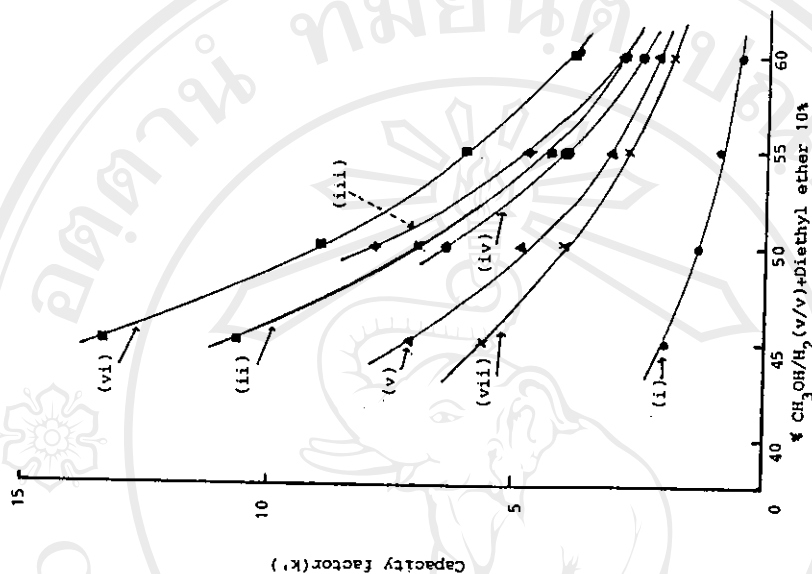
ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

- (i) = oestriol
- (ii) = 17 β -oestradiol
- (iii) = 17 α -oestradiol
- (iv) = oestrone
- (v) = 17-hydroxy progesterone
- (vi) = progesterone
- (vii) = testosterone

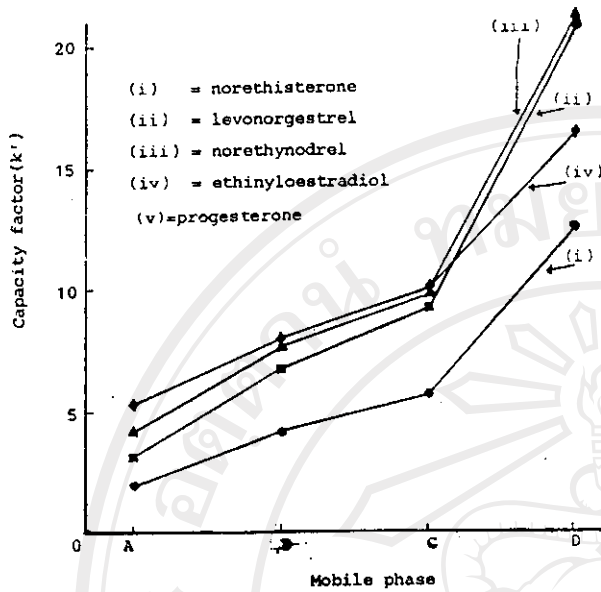


รูปที่ 21 ความสัมพันธ์ของ k' กับ mobile phase ที่ต่างกัน

- A = THF/H₂O(50:50, v/v)
- B = MeOH/H₂O/Diethylether(50:40:10, v/v/v)
- C = MeOH/H₂O(50:50, v/v) + Diethylether(90:10, v/v)
- D = ACN/H₂O(40:60, v/v) + Diethylether(90:10, v/v)
- E = ACN/H₂O(40:60, v/v)

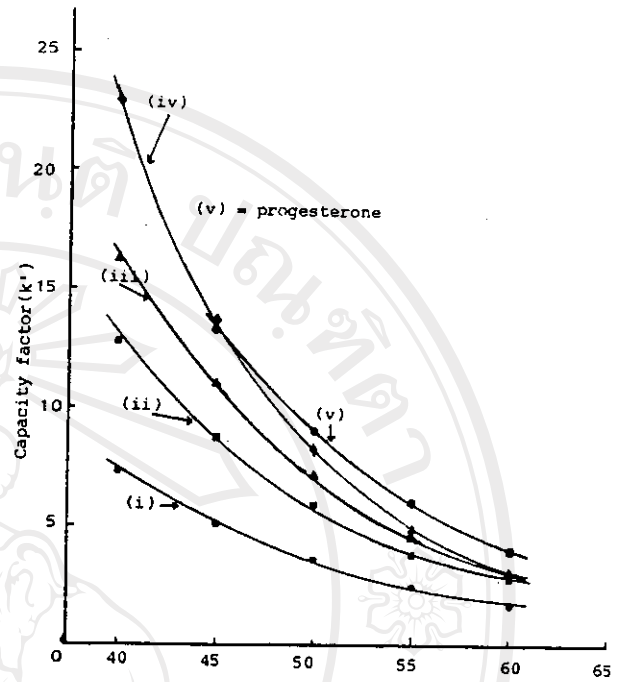


รูปที่ 22 ความสัมพันธ์ของ Capacity factor(k') กับ $\text{CH}_3\text{OH}/\text{H}_2\text{O}(\text{v}/\text{v})$ + Diethyl ether 10% ในภาวะที่คงที่ของอุณหภูมิ

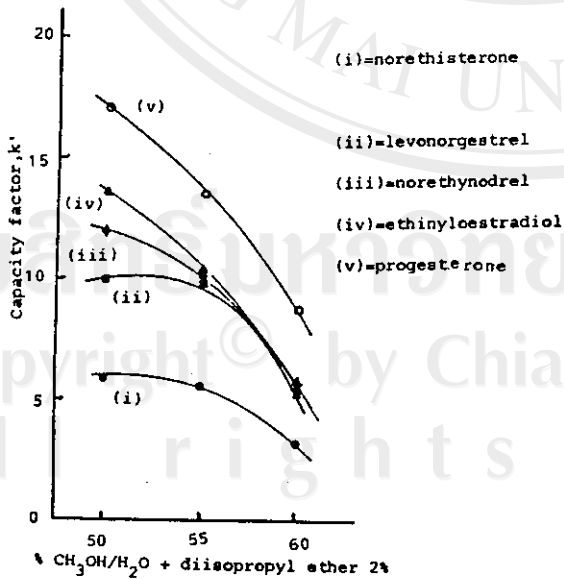


รูปที่ 23 ความสัมพันธ์ของ Capacity factor (k') กับ mobile phase ที่ modified ด้วย ethers 5%

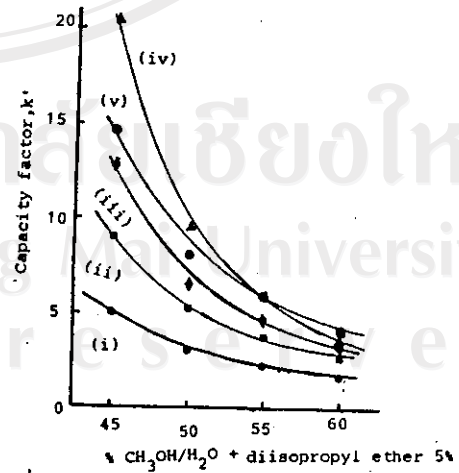
- A = $\text{CH}_3\text{OH}/\text{H}_2\text{O}(54:46, \text{v/v}) + \text{diisopropylether}$
- B = $\text{CH}_3\text{OH}/\text{H}_2\text{O} (54:46, \text{v/v}) + \text{diethyl ether}$
- C = $\text{CH}_3\text{OH}/\text{H}_2\text{O}(54:46, \text{v/v}) + \text{THF}$
- D = $\text{CH}_3\text{OH}/\text{H}_2\text{O}(54:46, \text{v/v})$



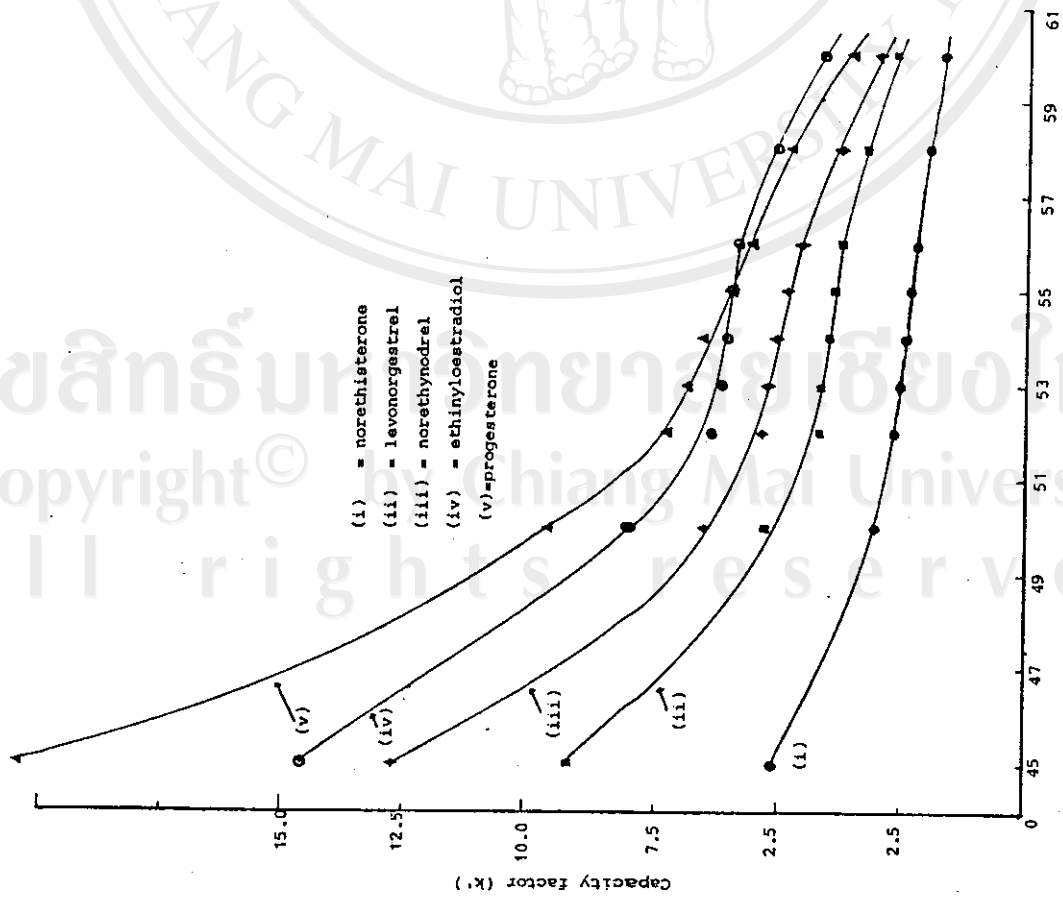
รูปที่ 24 ความสัมพันธ์ระหว่าง capacity factor (k') กับ $\% \text{CH}_3\text{OH}/\text{H}_2\text{O}$ + Diethyl ether 10% ในการแยกสัตรีอยด์ฮอร์โมนบางตัว



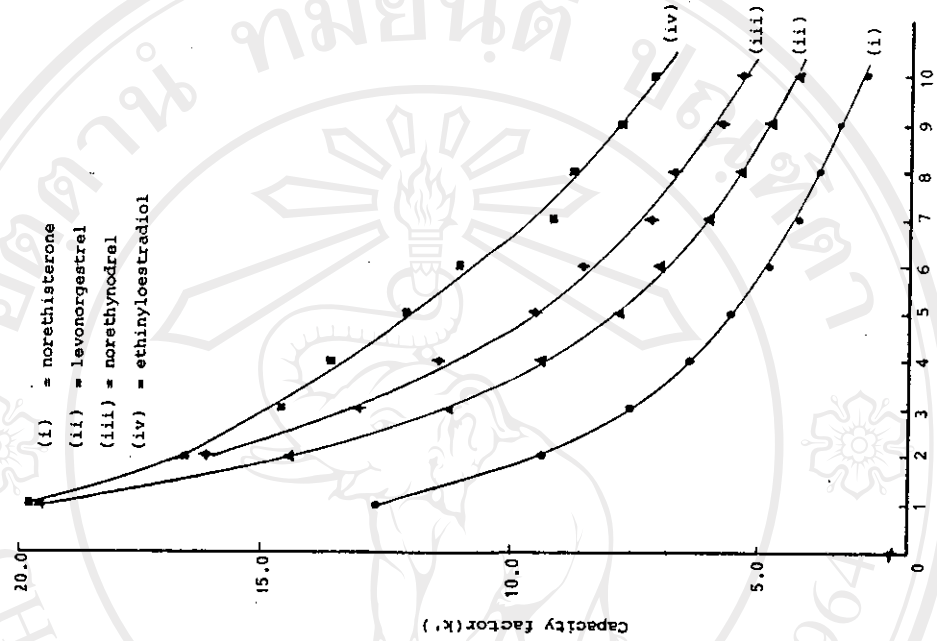
รูปที่ 25 ความสัมพันธ์ของ Capacity factor, k' กับ $\% \text{CH}_3\text{OH}/\text{H}_2\text{O} + \text{diisopropyl ether } 2\%$ ในการแยกสัตรีอยด์ฮอร์โมนบางตัว



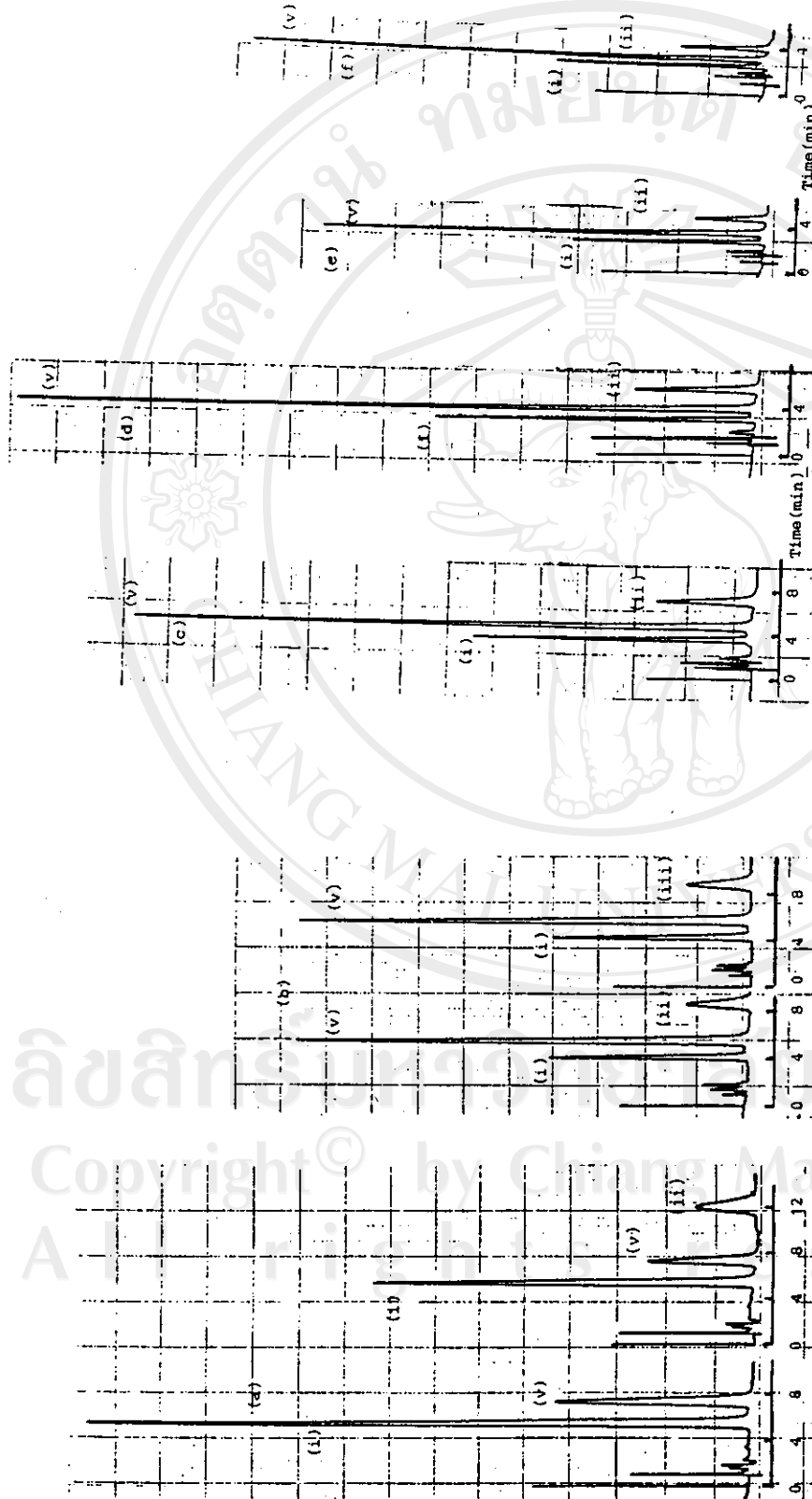
รูปที่ 26 ความสัมพันธ์ของ Capacity factor, k' กับ $\% \text{CH}_3\text{OH}/\text{H}_2\text{O} + \text{diisopropyl ether } 5\%$ ในการแยกสัตรีอยด์ฮอร์โมนบางตัว



รูปที่ 27 ความสัมพันธ์ของ k' กับ MeOH/H₂O + Diisopropyl ether 5% ในการแยกสารของโคมินางซึก



รูปที่ 28 ความสัมพันธ์ของ k' กับ Diisopropyl ether ใน MeOH/H₂O (54:46, v/v) ในการแยกสารของโคมินางซึก

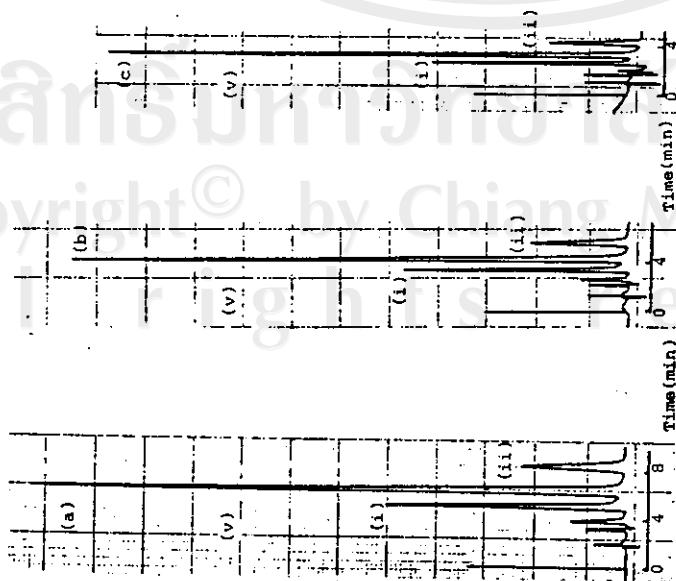


รูปที่ 29 โครมาโทแกรมของสารมาตรฐาน ethinyl oestradiol (i), levonorgestrel (v), และ progesterone (ii) ที่ flow-rate 2.0 ml/min, sensitivity: $0.06 \times 10^6 v$, chart speed: 0.25 cm/min ใช้ mobile phase ดังนี้:

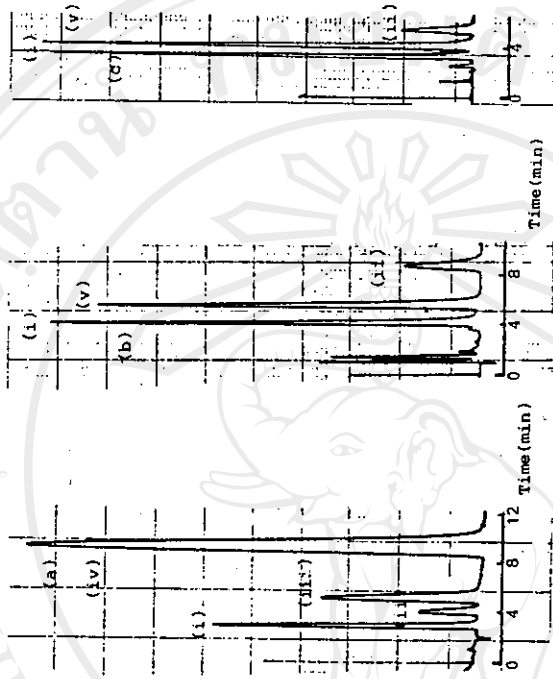
- (a) $CH_3CN/H_2O(55:45, v/v)$
- (b) $CH_3CN/H_2O(60:40, v/v)$
- (c) $CH_3CN/H_2O(65:35, v/v)$
- (d) $CH_3CN/H_2O(75:25, v/v)$
- (e) $CH_3CN/H_2O(80:20, v/v)$

และ (f) $CH_3CN/H_2O(80:20, v/v)$

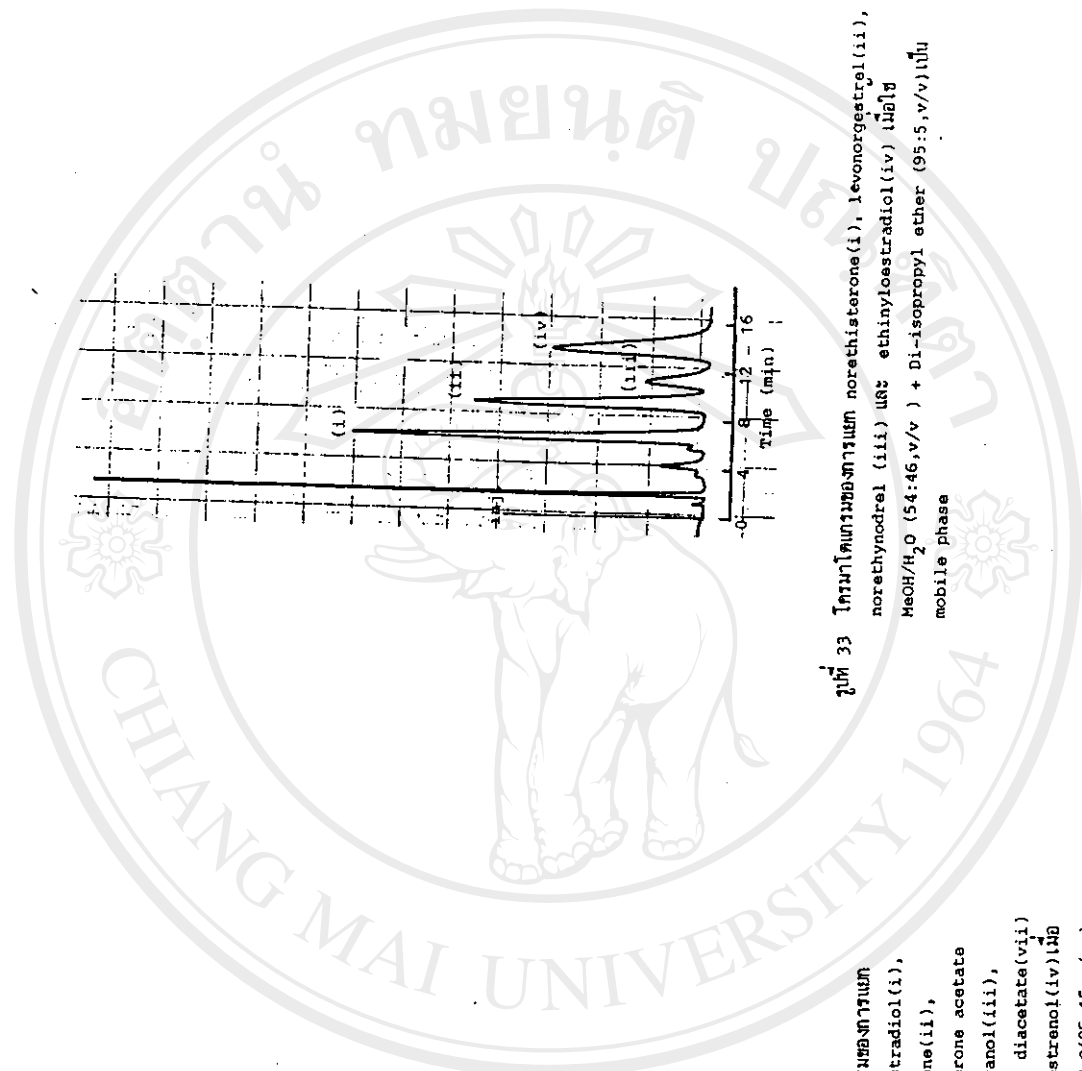
ลิขสิทธิ์ของมหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved



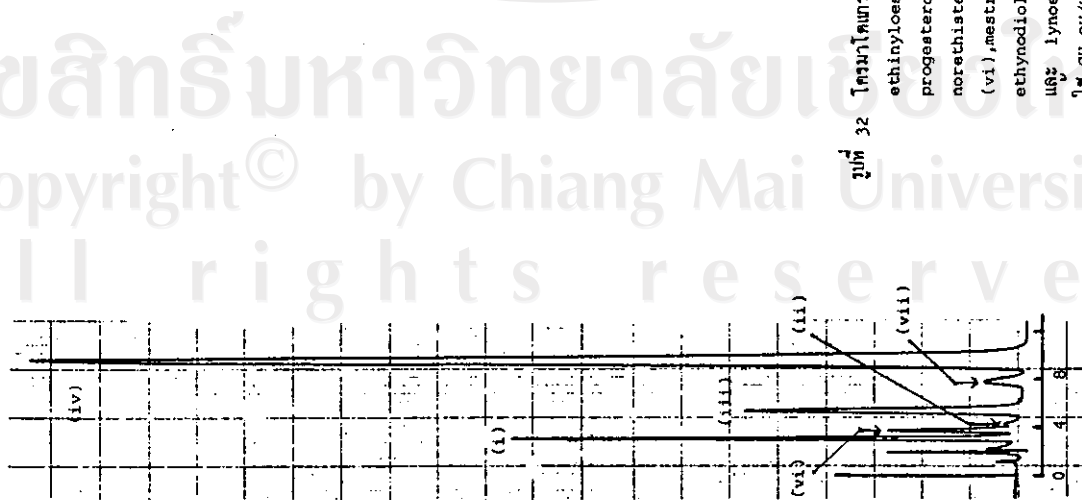
รูปที่ 30 โครมาโทแกรมของการแยก ethinyloestradiol (i), levonorgestrel (v) และ progesterone (ii) เป็น I.S. โดยใช้ $\text{CH}_3\text{CN}/\text{H}_2\text{O}$ (80:20, v/v) เป็น mobile phase และใช้ flow-rate: (a) 1.0 ml/min (b) 1.5 ml/min และ (c) 2.0 ml/min



รูปที่ 31 โครมาโทแกรมของการแยก ethinyloestradiol (i), progesterone (ii), levonorgestrel (v) และ I.S. (ii) เป็น I.S. โดยใช้ $\text{CH}_3\text{OH}/\text{H}_2\text{O}$ (85:15, v/v) เป็น mobile phase และใช้ flow-rate: (a) $\text{CH}_3\text{CN}/\text{H}_2\text{O}$ (60:40, v/v) และ (c) $\text{CH}_3\text{CN}/\text{H}_2\text{O}$ (80:20, v/v), และ flow-rate: (a) และ (b) ใช้ 2.0 ml/min และ (c) ใช้ 1.5 ml/min



รูปที่ 33 โครมาโตแกรมของสารผสม norethisterone(i), levonorgestrel(ii), norethynodrel (iii) และ ethinyloestradiol(iv) ในเฟส MeOH/H₂O (54:46,v/v) + Di-isopropyl ether (95:5,v/v) เป็น mobile phase



รูปที่ 32 โครมาโตแกรมของสารผสม ethinyloestradiol(i), progesterone(ii), norethisterone acetate (vi),mestranol(iii), ethynodiol diacetate(vii) และ lynoestrenol(iv)ในเฟส CH₃CH₂O(85:15,v/v) เป็น mobile phase และใช้ flow-rate 2.0 ml/min

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved