

การวิเคราะห์หาปริมาณสเตียรอยด์ฮอร์โมนในยาเตรียม

ปัจจุบันนี้มีการใช้วิธี HPLC วิเคราะห์ผลิตภัณฑ์ยากน้อยอย่างแพร่หลาย⁽⁴⁾ ทั้งนี้เนื่องจากเทคนิค HPLC ได้มีการพัฒนาขึ้นเป็นเครื่องมือวิเคราะห์ที่ทันสมัยมาก ให้ความไว ความเร็ว และความจำเพาะสูง ให้ออกผลที่ถูกต้องและแม่นยำเชื่อถือได้ และประยุกต์ใช้งาน วิเคราะห์สารตัวอย่างได้อย่างกว้างขวาง⁽⁷¹⁾ ในงานวิจัยนี้ได้วิเคราะห์หาปริมาณตัวยาสำคัญ ในยาเตรียมที่ใช้คุมกำเนิด ซึ่งเป็นสารประกอบฮอร์โมนสังเคราะห์ประเภทเอสโตรเจน และ โปรเจสโตเจน องค์ประกอบของโปรเจสโตเจน มีปริมาณเป็นมิลลิกรัม ส่วนองค์ประกอบของ เอสโตรเจนมีปริมาณน้อยกว่าโปรเจสโตเจน คือมีปริมาณเป็นไมโครกรัม ปกติแล้วยาเม็ดคุมกำเนิดที่มีขายอยู่ทั่วไปจะมีฮอร์โมนสองอย่างนี้ผสมอยู่เป็นคู่ๆ รวมกับส่วนผสมอื่นๆ ของเม็ดยา มีรายงานของ Johnston *et al.*⁽¹²⁾ Bond *et al.*⁽⁴⁵⁾ และ Carignan *et al.*⁽⁴⁴⁾ ได้ตรวจสอบปริมาณตัวยาที่ระบุ (content uniformity) หรือควบคุมคุณภาพให้ ตรงตามมาตรฐาน (quality control specifications) ขององค์การควบคุมคุณภาพของ ผลิตภัณฑ์ยาของประเทศอังกฤษ (British Pharmacopoeia; BP) หรือของประเทศสหรัฐอเมริกา (United States Pharmacopoeia; USP)

ในบทนี้ได้ใช้วิธี HPLC ที่พัฒนาขึ้นสำหรับวิเคราะห์หาปริมาณสเตียรอยด์ฮอร์โมน จำนวน 4 ชนิด คือ ethinyloestradiol, mestranol, lynoestrenol และ levonorgestrel จากตัวอย่างยาเม็ดคุมกำเนิดทั้งหมด 20 ตัวอย่าง ซึ่งมีชนิดของโปรเจสโตเจน-เอสโตรเจน และมีปริมาณตัวยาระดับต่างหากัน โดยใช้สภาวะที่เหมาะสมดังที่ศึกษา มาแล้วในบทที่ 3

4.1 การทดลอง

- 4.1.1 เครื่องมือ HPLC (เหมือนในข้อ 3.1.1)
- 4.1.2 อุปกรณ์และเครื่องแก้ว (เหมือนในข้อ 3.1.2)
- 4.1.3 สารเคมีที่ใช้ (เหมือนในข้อ 3.1.3)
- 4.1.4 ตัวอย่างยาเม็ดคุมกำเนิดที่ใช้วิเคราะห์

ตัวอย่างยาเม็ดคุมกำเนิดที่นำมาวิเคราะห์ชื่อมาจากร้านขายยาในจังหวัดเชียงใหม่ มีรายละเอียดดังตารางที่ 23

ตารางที่ 23 ยาเม็ดคุมกำเนิดที่นำมาวิเคราะห์หาปริมาณตัวยาสำคัญ

ตัวอย่าง ที่	ชื่อตัวอย่างยา (จำนวนเม็ดยาทั้งหมด)	ตัวยาสอร์โอม		บริษัทที่ผลิต (วันที่ผลิต)	น้ำหนักเฉลี่ย ต่อเม็ด(กรัม)	จำนวนเม็ด ยาที่มีซอร์- โอม
		ชนิดของฮอร์โมน ซอร์โอม	ขนาดยา (มก.)			
1	Microgynon-50 ED (28 เม็ด)	Levonorgestrel	0.124	Schering (14/05/85)	0.0892	21 เม็ด
		Ethinylestradiol	0.05			
2	Microgynon-30 ED (28 เม็ด)	Levonorgestrel	0.15	Schering (04/04/85)	0.0891	21 เม็ด
		Ethinylestradiol	0.03			
3	Neogynon-21 (21 เม็ด)	Levonorgestrel	0.25	Schering (14/01/81)	0.0887	21 เม็ด
		Ethinylestradiol	0.05			
4	Nordette (21 เม็ด)	Levonorgestrel	0.15	Wyeth-Pharma (-/03/85)	0.0907	21 เม็ด
		Ethinylestradiol	0.03			
5	Nordiol-21 (21 เม็ด)	Levonorgestrel	0.25	Wyeth-Pharma (-/11/84)	0.0886	21 เม็ด
		Ethinylestradiol	0.05			
6	Trinordiol (สีน้ำตาล 6 เม็ด) (สีขาว 5 เม็ด) (สีเหลือง 10 เม็ด)	Levonorgestrel (สีน้ำตาล)	0.05	Wyeth-Pharma (-/11/83)	0.0889	21 เม็ด
		Ethinylestradiol (สีน้ำตาล)	0.03			
		Levonorgestrel (สีขาว)	0.075			
		Ethinylestradiol (สีขาว)	0.04			
		Levonorgestrel (สีเหลือง)	0.125			
		Ethinylestradiol (สีเหลือง)	0.03			
7	Triquilar ED (สีน้ำตาล 5 เม็ด) (สีขาว 6 เม็ด) (สีเหลือง 10 เม็ด)	Levonorgestrel (สีน้ำตาล)	0.05	Schering (22/10/84)	0.0906	21 เม็ด
		Ethinylestradiol (สีน้ำตาล)	0.03			
		Levonorgestrel (สีขาว)	0.075			
		Ethinylestradiol (สีขาว)	0.04			
		Levonorgestrel (สีเหลือง)	0.125			
		Ethinylestradiol (สีเหลือง)	0.03			
8	Ovidon-Richter (21 เม็ด)	D-Norgestrel	0.125	Gedeon Richter (19/02/85)	0.0983	21 เม็ด
		Ethinylestradiol	0.05			
9	Ovral (21 เม็ด)	Norgestrel	0.05	Wyeth-Pharma (-/03/84)	0.0923	21 เม็ด
		Ethinylestradiol	0.05			
10	Eugynon-21 (21 เม็ด)	Norgestrel	0.50	Schering (27/08/85)	0.0901	21 เม็ด
		Ethinylestradiol	0.05			
11	Butterfly (21 เม็ด)	Norgestrel	0.50	บริษัท ฟาซูกิดคอก (19/05/85)	0.0747	21 เม็ด
		Ethinylestradiol	0.05			
12	Duoluton (21 เม็ด)	Norgestrel	0.50	Schering (02/01/85)	0.0887	21 เม็ด
		Ethinylestradiol	0.05			
13	Ovostat 28 (22 เม็ด)	Lyncestrenol	1.0	Organon (23/03/83)	0.1004	22 เม็ด
		Ethinylestradiol	0.05			
14	Minilyn (22 เม็ด)	Lyncestrenol	2.5	Zuelling (25/02/85)	0.0991	22 เม็ด
		Ethinylestradiol	0.05			
15	Noracyclin 22 (22 เม็ด)	Lyncestrenol	2.5	Ciba-Geigy (-/08/85)	0.1018	22 เม็ด
		Mestranol	0.075			
16	Lyndiol 2.5 (22 เม็ด)	Lyncestrenol	2.5	Zuelling (21/08/85)	0.0993	22 เม็ด
		Mestranol	0.075			
17	Exluton (35 เม็ด)	Lyncestrenol	0.50	Organon (19/07/84)	0.0502	35 เม็ด
18	Ovulen 50 Fe 28 (28 เม็ด)	Ethinylestradiol diacetate	1.0	Searle (03/01/84)	0.1394	21 เม็ด
		Ethinylestradiol	0.05			
19	Gynovlar 21 (21 เม็ด)	Norethisterone acetate	3.0	Schering (30/08/85)	0.1388	21 เม็ด
		Ethinylestradiol	0.05			
20	Anovlar 21 (21 เม็ด)	Norethisterone acetate	4.0	Schering (01/04/85)	0.1354	21 เม็ด
		Ethinylestradiol	0.05			

4.1.5 การเตรียมสารละลายมาตรฐานฮอร์โมนสำหรับการวิเคราะห์หาปริมาณ

เตรียม stock solution ของสารละลายมาตรฐานฮอร์โมน ความเข้มข้น 1,000 ppm โดยการชั่งสารมาตรฐานฮอร์โมนอย่างละเอียด 25 มก. ละลายด้วยระบบตัวทำละลายที่เหมาะสมในขวดปริมาตรขนาด 25 มล. และเก็บไว้ในตู้เย็นหลังจากที่ใช้แล้ว เมื่อต้องการสารละลายมาตรฐานเจือจาง จะใช้ระบบตัวทำละลายชนิดเดียวกันมาเจือจางลงในงานวิจัยนี้ใช้ตัวทำละลาย 2 ระบบ คือ MeOH/H₂O (85:15, v/v) ใช้ละลายสารมาตรฐาน ethinyloestradiol, mestranol และ lynoestrenol และ ACN/H₂O (80:20, v/v) ใช้ละลายสารมาตรฐาน ethinyloestradiol และ levonorgestrel

4.1.5.1 การเตรียมสารละลาย internal standard (I.S.)

ใช้ progesterone เป็น I.S. โดยชั่งสารมาตรฐานฮอร์โมนอย่างละเอียด 25 มก. ละลายด้วยตัวทำละลายที่เหมาะสมทั้ง 2 ระบบ ในขวดปริมาตรขนาด 25 มล. และนำมาเจือจางลงใหม่ให้ความเข้มข้น 50 ppm ด้วยตัวทำละลายระบบดังกล่าว

4.1.5.2 การเตรียมสารละลายมาตรฐานฮอร์โมนผสม

(ก) เตรียมสารผสมของ ethinyloestradiol (25 ppm) mestranol (37.5 ppm), lynoestrenol (1,250 ppm) และ progesterone (50 ppm) จะได้อาหารละลายผสมของฮอร์โมนดังกล่าวมีความเข้มข้นเหมือนกับที่ได้จากการเตรียมสารละลายตัวอย่างยาที่นำมาวิเคราะห์ โดยการเจือจางจาก stock solution 1,000 ppm ด้วย mobile solvent: MeOH/H₂O (85:15, v/v)

(ข) เตรียมสารผสมของ ethinyloestradiol (25 ppm) levonorgestrel (250 ppm) และ progesterone (50 ppm) โดยการเจือจางจาก stock solution 1,000 ppm ด้วย mobile solvent: ACN/H₂O (80:20, v/v)

4.1.5.3 การเตรียมสารละลายมาตรฐานฮอร์โมนสำหรับกราฟมาตรฐาน

เตรียมชุดสารละลายมาตรฐานฮอร์โมนโดยการเจือจางจาก stock solution 1,000 ppm ด้วย mobile solvent ที่เหมาะสมกับระบบที่ใช้แยกดังตารางที่ 24

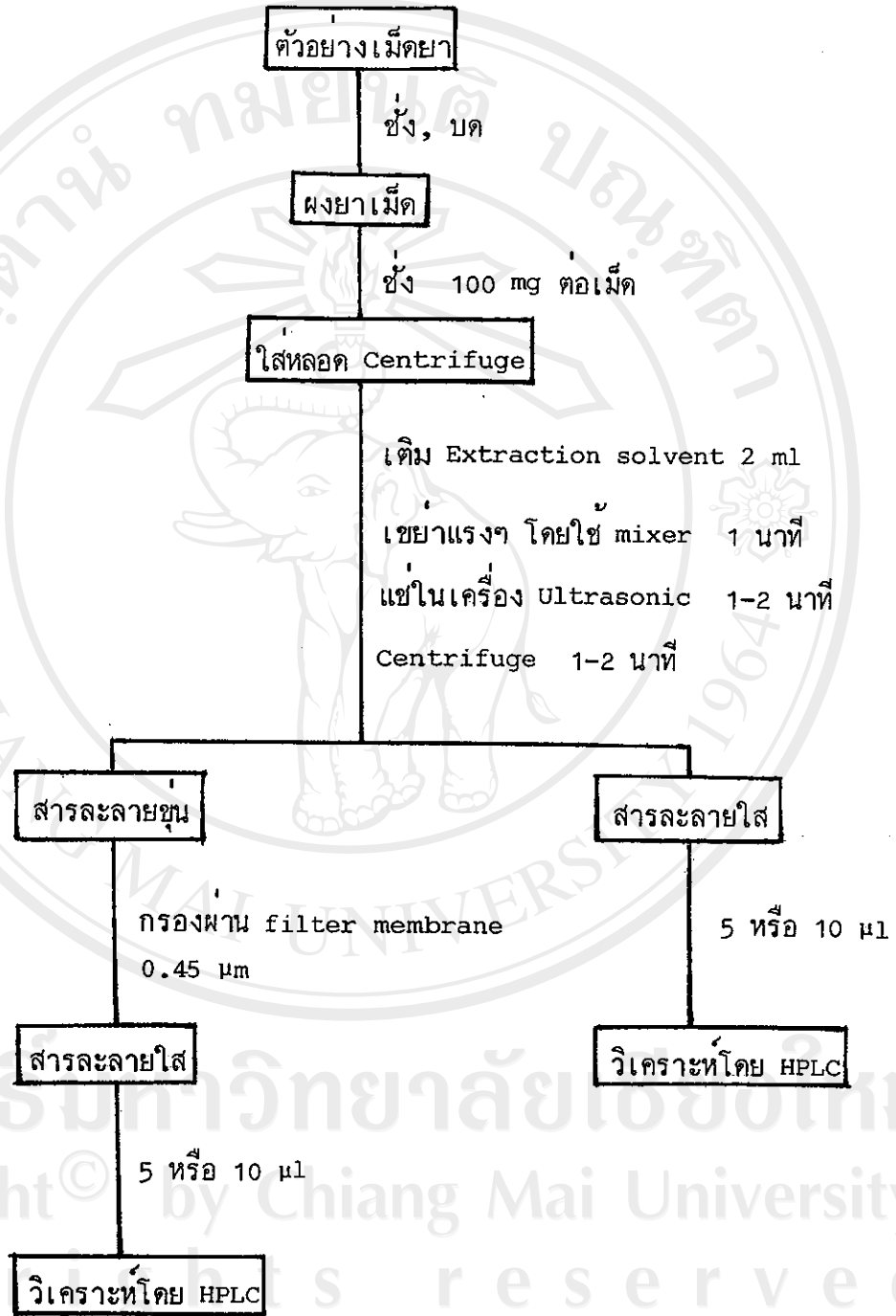
ตารางที่ 24 ช่วงความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐานฮอร์โมนที่ใช้สร้างกราฟมาตรฐาน

สตรีรอยด์ฮอร์โมน	ช่วงความเข้มข้น (ppm)
ethinylostradiol	10 - 70
mestranol	5 - 50
lynoestrenol	10 - 400
levonogestrel	10 - 300

4.1.6 การเตรียมสารละลายตัวอย่างที่จะวิเคราะห์ (Sample preparation)

ซึ่งตัวอย่างยาเม็ดคุมกำเนิดแต่ละเม็ดจนครบตามจำนวนของแต่ละตัวอย่าง แล้วนำมาหาคำนวณน้ำหนักเฉลี่ยต่อเม็ด (ตารางที่ 23) นำตัวอย่างเม็ดยามาบดให้ละเอียดเป็นผง โดยใช้ครกบดสาร และเก็บผงยานี้ไว้ในขวดเก็บสารตัวอย่างที่มีฝาปิดมิดชิด ในการวิเคราะห์ตัวยาสสำคัญ (active ingredient) ในเม็ดยา ซึ่งผงยาตัวอย่างใหม่น้ำหนักเท่ากับ น้ำหนักเฉลี่ยต่อเม็ดของแต่ละตัวอย่างใส่ลงในหลอดเหวี่ยงใส่ที่สะอาด และแห้งซึ่งเก็บไว้ในโถอบแห้งแล้วปิดหลอดด้วยแผ่นพาราฟิล์ม (parafilm) ให้มิดชิด จากนั้นมาผ่านขั้นตอนการสกัด (extraction procedure) โดยการเติมตัวทำละลายที่ใช้สกัดที่เหมาะสม จำนวน 2 มล. (ใช้ไปเปิด) เขย่าแรงๆให้เขากันด้วยเครื่องสั่น นำมาแช่ในเครื่องอุลตราโซนิก ประมาณ 2-3 นาที แล้วนำมาเหวี่ยงใส่เพื่อให้สารละลายใส (clear solution) นานประมาณ 1-2 นาที ในกรณีที่สารละลายยังไม่ขุ่นอยู่ ให้นำมากรองโดยใช้ชุดกรองสารละลายตัวอย่าง และเก็บสารละลายตัวอย่างที่สกัดได้ไว้วิเคราะห์โดยวิธี HPLC ต่อไป ดังแผนภูมิแสดงวิธีการเตรียมสารละลายตัวอย่างในรูปที่ 34

แผนภูมิการสกัด



รูปที่ 34 แผนภูมิการสกัดสารตัวอย่าง

4.1.7 การเตรียมตัวอย่างยาเม็ดคุมกำเนิด (Synthetic preparation)

ซึ่งสารที่ใช้เตรียมยาเตรียมให้ไตปริมาณรวม 10 กรัม ดังตารางที่ 25

ตารางที่ 25 สาร matrix ที่ใช้เตรียมยาเม็ดสังเคราะห์ (synthetic tablet)

Matrix	Weight (g)
Lactose	8.9992
Starch	0.5009
Carboxymethylcellulose	0.2015
Magnesium stearate	0.2025
Talc	0.1010
รวม	10.0051

นำ matrix จำนวนนี้มาบดให้เข้ากันโดยใช้ครกบดสาร และเก็บไว้ในขวดเก็บสารตัวอย่างที่มีฝาปิดมิดชิด ซึ่งน้ำหนัก matrix powder อย่างละเอียด จำนวน 4 ครั้ง ละเอียด ประมาณ 2.0 กรัม กำหนดให้เป็น synthetic sample no. 1,2,3 และ 4 ใช้ไปเปิดดูดสารละลายมาตรฐานของ ethinyloestradiol และ levonorgestrel จาก stock solution 1,000 ppm อย่างละ 1 มล. ใส่ลงใน synthetic sample no. 1 และ 2 และดูดสารละลายมาตรฐานของ mestranol และ lynoestrenol จาก stock solution 1,000 ppm อย่างละ 1 มล. ใส่ลงใน synthetic sample no. 3 และ 4 จากนั้นนำ synthetic sample เหล่านี้ไปประเหยเอาตัวทำละลายออกโดยใช้ลมสุญญากาศต่อเขากับวาล์วของฝาโถอบแห้ง นานประมาณ 1 ชั่วโมง (จนกว่าตัวทำละลายออกเกือบหมด) แล้วนำไปอบแห้งในตูอบที่มีอุณหภูมิค่า (ประมาณ 50-60°C) อีกประมาณ 1 ชั่วโมง นำออกจากตูอบทิ้งให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง และนำมาบดให้ละเอียดโดยใช้ครกบดสาร เก็บไว้ในขวดเก็บสารตัวอย่างเพื่อนำไปวิเคราะห์หาปริมาณตัวยา ฮอร์โมนที่ทราบปริมาณ โดยผ่านขั้นตอนการสกัด และวิเคราะห์โดยวิธี HPLC เหมือนกับสารตัวอย่างยาเม็ดคุมกำเนิดทุกประการ สำหรับการวิเคราะห์จะชั่งน้ำหนักตัวอย่างยาเตรียม (synthetic sample) อย่างละเอียดประมาณ 0.1 กรัม (100 มิลลิกรัม) จะไตปริมาณของฮอร์โมนที่เตรียมขึ้นอย่างละ 50 ไมโครกรัมต่อเม็ด

4.1.8 การคำนวณหาปริมาณ การคำนวณสารโดยวิธี HPLC ก็เหมือนกับวิธีโครมาโตกราฟีแบบอื่น ๆ คือ จะหาปริมาณสารที่วิเคราะห์ในสารตัวอย่างจากกราฟมาตรฐานโดยหาพื้นที่ใต้พีค หรือวัดความสูงของพีคของสารตัวอย่างเทียบกับกราฟมาตรฐานแบบ absolute calibration curve หรือแบบ relative calibration curve (49) และใช้วิธี internal standard แบบใช้สูตรเทียบอัตราส่วนของพื้นที่ใต้พีคหรือความสูงของพีค (41,43) ในงานวิจัยนี้ได้แสดงข้อมูลการทดลอง ทั้ง 3 แบบดังกล่าวในการวิเคราะห์หาปริมาณตัวยาสำคัญในตัวอย่างยาเม็ดคุมกำเนิด

การใช้วิธี I.S. เพื่อขจัดข้อผิดพลาดต่างๆ ที่อาจเกิดขึ้นเนื่องจากเครื่องมือและขั้นตอนการทดลอง ส่วนสารประกอบที่เลือกใช้เป็น I.S. ควรจะมีคุณสมบัติดังนี้คือ (49)

- แยกออกจากสารตัวอย่างทุกตัวที่ศึกษา
- แยกออกมาไกลพีคของสารที่สนใจ
- มีความเข้มข้นใกล้เคียงกับพีคสารที่สนใจ
- เป็นสารประกอบเคมีเหมือนกันกับสารประกอบที่ศึกษา แต่ไม่มีอยู่ในตัวอย่างที่นำมาวิเคราะห์ และ
- เฉื่อยต่อปฏิกิริยาเคมี (chemically inert)

ในการใช้สูตรเทียบอัตราส่วนความสูงพีค หรือพื้นที่ใต้พีคกับสารในการวิเคราะห์หาตัวยาสำคัญต่อเม็ด คือ

$$C_u = x \times C_s \times \frac{R_u}{R_s} \times \frac{W_t}{W_u} \dots\dots\dots (13)$$

เมื่อ C_u = ตัวยาสำคัญที่วิเคราะห์ต่อเม็ด (มิลลิกรัม)

C_s = ความเข้มข้นของตัวยาสำคัญ ในสารละลายมาตรฐาน (มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร)

R_u = area หรือ peak height ratio ของตัวยาสำคัญเทียบกับ I.S. ในสารละลายตัวอย่าง

R_s = area หรือ peak height ratio ของตัวยาสำคัญเทียบกับ I.S. ในสารละลายมาตรฐาน

w_u = น้ำหนักของสารตัวอย่างที่นำมาวิเคราะห์ (มิลลิกรัม)

w_t = น้ำหนักเฉลี่ยต่อเม็ดของยาตัวอย่าง (มิลลิกรัม)

และ x = dilution factor

4.1.9 การหาความแม่นยำ (precision) ของการวิเคราะห์⁽⁸⁶⁾

ทดลองหาค่า reproducibility ของเครื่องมือที่ใช้ โดยทดลองซ้ำหลายๆ ครั้งเพื่อตรวจสอบหาความแม่นยำของการวิเคราะห์ ได้ผลการทดลองแสดงในเทอมของค่าเฉลี่ย (mean) ความเบี่ยงเบนมาตรฐาน (standard deviation) และความเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ (relative standard deviation) โดยใช้สูตรดังต่อไปนี้

(1) ค่าเฉลี่ย (mean, \bar{x})

$$\bar{x} = \frac{\sum x_i}{N} \dots\dots\dots (14)$$

เมื่อ x_i = ข้อมูลแต่ละค่า

N = จำนวนข้อมูลทั้งหมด

(2) ความเบี่ยงเบนมาตรฐาน (standard deviation, S.D)

$$S.D = \sqrt{\frac{\sum (x_i - \bar{x})^2}{N - 1}} \dots\dots\dots (15)$$

(3) ความเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ (relative standard deviation, RSD)

$$\% RSD = \frac{S.D}{\bar{x}} \times 100 \dots\dots\dots (16)$$

4.1.10 การหาความถูกต้อง (accuracy) ของการวิเคราะห์

ทดลองหาความถูกต้องของการวิเคราะห์ในเทอมของร้อยละของการคืนกลับ (% recovery) ในงานวิจัยนี้ จะหา % recovery จากการใช้ synthetic sample และการวิเคราะห์หาปริมาณสารตามวิธี standard addition การวิเคราะห์หาปริมาณสารจาก synthetic sample นี้ นอกจากจะทราบ % recovery แล้ว ยังเป็นการหา

ประสิทธิภาพของการสกัด (extraction efficiency) และความแม่นยำของวิธีการทดลอง (precision of the experimental procedure) อีกด้วย (12,40)

4.1.11 การหาขีดต่ำสุดของการตรวจวัด (Detection limits)

ทดลองหาปริมาณต่ำสุดของสารแต่ละชนิดโดยวิธี HPLC ได้จากการวัดสัญญาณของสารตัวอย่างที่มีค่าเป็น 2 เท่า ของระดับของ noise เมื่อปรับ sensitivity ของเครื่องตรวจวัดสูงสุดตามสภาวะที่เหมาะสม (65)

4.2 ผลการทดลอง

4.2.1 การศึกษา detector response เทียบกับความเข้มข้นของสเตียรอยด์ฮอร์โมน

ทดลองหา linear range ของ ethinyloestradiol, linoestrenol และ mestranol โดยใช้ความเข้มข้นของ ethinyloestradiol 2 ช่วง คือ ช่วง 10-100 ppm ซึ่งเป็นช่วงใช้วิเคราะห์สารตัวอย่าง (working range) และช่วง 20-1,000 ppm ใช้ความเข้มข้นของ linoestrenol ช่วง 100-2,500 ppm และใช้ความเข้มข้นของ mestranol 2 ช่วงคือ ช่วง 5-100 ppm ซึ่งเป็นช่วงใช้วิเคราะห์สารตัวอย่างเช่นเดียวกัน (ตารางที่ 26 และกราฟมาตรฐานในรูปที่ 35) และช่วง 10-1,000 ppm พร้อมทั้งได้ทดลองหาค่า reproducibility ของเครื่องมือ HPLC โดยใช้ syringe ขนาด 25 ไมโครลิตรฉีดสารละลายมาตรฐาน mestranol เข้มข้น 50 ppm ใช้ปริมาตร 5 ไมโครลิตรฉีดจำนวน 11 ครั้ง ดังผลการทดลองแสดงในตารางที่ 27 สภาวะการทดลองที่ใช้คือ mobile phase : MeOH/H₂O (85:15, v/v) , flow-rate : 2.0 ml/min, pressure : 750 psi , UV detector 213 nm , chart speed: 0.25 cm/min, injection volume : 5 µl และ sensitivity : 0.08 x 10 mV (10-100 ppm ของ ethinyloestradiol) , 0.64x 10 mV (20-1,000 ppm ของ ethinyloestradiol) , 0.16 x 10 mV (100-2,500 ppm ของ linoestrenol) , 0.08 x 10 mV (5-100 ppm ของ mestranol) และ 0.32 x 10 mV (10-1,000 ppm ของ mestranol)

4.2.2 การเลือกใช้ตัวทำละลายสกัด (extraction solvent) ทดลองหาระบบตัวทำละลายที่ใช้สกัดหรือละลายสเตียรอยด์ฮอร์โมน จากการสกัด synthetic sample ซึ่ง

ประกอบด้วย ethinyloestradiol, mestranol, lynoestradiol และ levonorgestrel ได้ผลการทดลองดังนี้คือ

4.2.2.1 การสกัด mestranol และ lynoestradiol จากส่วนผสมของ synthetic sample เม็ดเดียวกันโดยใช้ระบบตัวทำละลายต่างกัน ดังตารางที่ 28 นำสารละลายที่สกัดได้มาวิเคราะห์หาปริมาณของ mestranol และ lynoestradiol โดยเทียบความสูงพีคจากกราฟมาตรฐานของสตรีรอยด์ฮอร์โมนดังกล่าวได้ผลการทดลอง แสดงในตารางที่ 29

4.2.2.2 การหา percentage recovery ทดลองหา % recovery ของ mestranol และ lynoestradiol จาก synthetic sample จำนวน 10 ครั้ง โดยเลือกใช้ MeOH/H₂O (85:15, v/v) เป็นตัวทำละลายที่เหมาะสมในการสกัด และหาปริมาณสารประกอบทั้งสองชนิดนี้ โดยเทียบความสูงพีคจากกราฟมาตรฐานในรูปที่ 36 (ตารางที่ 30) ได้ผลการทดลองแสดงในตารางที่ 31

4.2.2.3 การสกัด ethinyloestradiol และ levonorgestrel จากส่วนผสมของ synthetic sample เม็ดเดียวกัน โดยใช้ระบบตัวทำละลายต่างกัน ดังตารางที่ 32 นำสารละลายที่สกัดได้มาวิเคราะห์หาปริมาณแบบเดียวกันกับข้อ 4.2.2.1 แต่ใช้ทั้งความสูงพีคและพื้นที่ใต้พีคเทียบกับกราฟมาตรฐาน (ตารางที่ 33 และรูปที่ 36 และ 37 ตามลำดับ) ของฮอร์โมนทั้งสองชนิดนี้ ได้ผลการทดลองแสดงในตารางที่ 34 และ 35

4.2.2.4 การหา percentage recovery หลังจากได้ศึกษาระบบตัวทำละลายที่ใช้สกัด ethinyloestradiol และ levonorgestrel จาก synthetic sample แล้ว และได้เลือก ACN/H₂O (80:20, v/v) เป็นตัวทำละลายสกัด พร้อมทั้งหา % recovery ของ ethinyloestradiol และ levonorgestrel โดยเทียบ peak height ratio ของสตรีรอยด์ดังกล่าวจากกราฟมาตรฐาน (ตารางที่ 36 และรูปที่ 38) ได้ผลการทดลองแสดงในตารางที่ 37 และ ได้ทดลองซ้ำเพื่อหา % recovery ของ ethinyloestradiol และ levonorgestrel โดยนำสารละลายที่สกัดไว้มาฉีดอีกครั้ง โดยไม่คำนึงถึงพีคของ I.S. (progesterone) และหาปริมาณสารโดยเทียบความสูงของพีคจากกราฟมาตรฐานโดยตรง ได้ผลการทดลองแสดงในตารางที่ 38

นอกจากนี้ได้ทดลองเลือกใช้ระบบตัวทำละลายสกัด (ตารางที่ 39) โดยการสกัดหาปริมาณ ethinyloestradiol และ levonorgestrel ในตัวอย่างยาเม็ดคุมกำเนิดยี่ห้อ Microgynon 50-ED ซึ่งมีน้ำหนักเฉลี่ย 0.0892 กรัมต่อเม็ด โดยเทียบความสูงพีค จากกราฟมาตรฐาน ได้ผลการทดลองแสดงในตารางที่ 40

4.2.3 การวิเคราะห์หาปริมาณของ ethinyloestradiol, mestranol และ lynoestrenol ในตัวอย่างยาเม็ดคุมกำเนิด โดยใช้ MeOH/H₂O (85:15, v/v) เป็น mobile phase

4.2.3.1 วิเคราะห์หาปริมาณของ ethinyloestradiol, mestranol และ lynoestrenol ในตัวอย่างยาเม็ดคุมกำเนิดจำนวน 8 ชนิด โดยวิธีเทียบความสูงพีค จากกราฟมาตรฐาน ได้ผลการทดลองแสดงในตารางที่ 41 และคำนวณหาปริมาณดังตัวอย่าง ตัวอย่างการคำนวณ

เช่น วิเคราะห์หาปริมาณของ ethinyloestradiol ในตัวอย่างยา Gynovlar 21 (rep.1) น้ำหนักที่ซึ่งมาวิเคราะห์ 0.1385 กรัมต่อเม็ด วัดความสูงพีคเฉลี่ยได้ 3.15 ซม. เทียบกับกราฟมาตรฐาน แล้วอ่านค่าความเข้มข้นของ ethinyloestradiol ได้เท่ากับ 25.50 ppm (น้ำหนักเฉลี่ยของ Gynovlar 21 เท่ากับ 0.1388 กรัมต่อเม็ด)

นั่นคือ ในสารละลายตัวอย่าง 1 มล. มีปริมาณของ ethinyloestradiol อยู่ 25.50 ไมโครกรัม ดังนั้นสารละลายสกัด 2 มล. จึงมีปริมาณฮอร์โมนชนิดนี้เท่ากับ $25.50 \times 2 = 51.00$ ไมโครกรัม

จากน้ำหนักตัวอย่างยา 0.1385 กรัมมีปริมาณของ ethinyloestradiol 51.00 ไมโครกรัม ถ้าน้ำหนักตัวอย่างยา 0.1388 กรัม จะมีปริมาณฮอร์โมนชนิดนี้เท่ากับ $\frac{51.00 \times 0.1388}{0.1385} = 51.11$ ไมโครกรัมต่อเม็ด

เพราะฉะนั้น ในยาตัวอย่าง 1 เม็ดจะมีปริมาณของ ethinyloestradiol เท่ากับ 51.11 ไมโครกรัม แต่ตัวอย่างยา Gynovlar 21 ระบุปริมาณฮอร์โมนชนิดนี้ไว้เท่ากับ 50.00 ไมโครกรัมต่อเม็ด ดังนั้น คิดเป็น เปอร์เซ็นต์ของปริมาณยาที่ระบุไว้ในฉลากยา (labelled amount)

$$\text{จะได้ } \frac{51.11}{50.00} \times 100 = 102.22 \%$$

4.2.3.2 วิเคราะห์หาปริมาณของ ethinyloestradiol, mestranol และ lynoestrenol ในตัวอย่างยาเม็ดคุมกำเนิด จำนวน 5 ชนิด โดยวิธีเทียบ peak height ratio ซึ่งมี progesterone (50 ppm) เป็น I.S. ในส่วนผสมของ synthetic sample ของสารละลายมาตรฐาน ethinyloestradiol (25 ppm), mestranol (37.5 ppm) และ lynoestrenol (1,250 ppm) ตั้งโครมาโตแกรม ในรูปที่ 39 ได้ผลการทดลองแสดงในตารางที่ 42 และ 43 และใช้วิธีการคำนวณหาปริมาณสารโดยใช้สูตรเทียบสัดส่วนความสูงพีค (สมการ 13)

ตัวอย่างการคำนวณ

เช่น วิเคราะห์หาปริมาณของ ethinyloestradiol ในตัวอย่างยา Minilyn (rep.1) โดยใช้สูตรเทียบ peak height ratio จะได้

$$\begin{aligned} \text{แทนค่า } C_u &= 2 \text{ ml} \times 25.00 \text{ } \mu\text{g/ml} \times \frac{1.89}{1.96} \times \frac{0.0991}{1.0000} \text{ g} \\ &= 47.61 \text{ } \mu\text{g/tab} \end{aligned}$$

เมื่อ 2 คือ dilution factor หรือปริมาตรของตัวทำละลายสกัด

C_s " ความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐาน ethinyloestradiol
เท่ากับ 25.00 $\mu\text{g/ml}$

R_u " peak height ratio ของสารตัวอย่าง เท่ากับ 1.89

R_s " peak height ratio ของสารมาตรฐาน เท่ากับ 1.96

W_t " น้ำหนักเฉลี่ยต่อเม็ดของตัวอย่างยา 0.0991 g

W_u " น้ำหนักตัวอย่างที่นำมาวิเคราะห์เท่ากับ 1.0000 g

4.2.4 การวิเคราะห์หาปริมาณของ ethinyloestradiol และ levonorgestrel ในตัวอย่างยาเม็ดคุมกำเนิด โดยใช้ ACN/H₂O (80:20 ,v/v) เป็น mobile phase

4.2.4.1 วิเคราะห์หาปริมาณของ ethinyloestradiol และ levonorgestrel ในตัวอย่างยาเม็ดคุมกำเนิด จำนวน 12 ชนิด โดยวิธีเทียบพื้นที่ใต้พีคจากกราฟ

มาตรฐาน ได้ผลการทดลองแสดงในตารางที่ 44 และ 45 และใช้วิธีการคำนวณ เหมือน
ข้อ 4.2.3.1

4.2.4.2 วิเคราะห์หาปริมาณของ ethinyloestradiol และ levonorgestrel ในตัวอย่างยาเม็ดคุมกำเนิด จำนวน 12 ชนิด โดยวิธีเทียบ peak area ratio ซึ่งมี progesterone (50 ppm) เป็น I.S. ในส่วนผสมของ synthetic sample ของสารละลายมาตรฐาน ethinyloestradiol (25 ppm) และ levonorgestrel (250 ppm) ดังโครมาโตแกรมในรูปที่ 40 ได้ผลการทดลองแสดงในตารางที่ 46 และ 47 และใช้วิธีการคำนวณเหมือนข้อ 4.2.3.2

4.2.5 การวิเคราะห์หาปริมาณของ ethinyloestradiol และ levonorgestrel ในตัวอย่างยาเม็ดคุมกำเนิด โดยใช้ ACN/H₂O (60:40, v/v) เป็น mobile phase

4.2.5.1 วิเคราะห์หาปริมาณของ ethinyloestradiol และ levonorgestrel ในตัวอย่างยาเม็ดคุมกำเนิด จำนวน 10 ชนิด โดยวิธีเทียบ peak height ratio จากกราฟมาตรฐาน ได้ผลการทดลองแสดงในตารางที่ 49 และ 50

4.2.5.2 วิเคราะห์หาปริมาณของ ethinyloestradiol และ levonorgestrel ในตัวอย่างยาเม็ดคุมกำเนิด จำนวน 10 ชนิด โดยวิธีเทียบ peak height ratio จาก synthetic sample เหมือนข้อ 4.2.4.2 แต่ใช้ MeOH/H₂O (4:1, v/v) เป็นตัวทำละลายสกัดสารตัวอย่าง ได้ผลการทดลองแสดงในตารางที่ 48, 49 และ 50

4.2.6 การวิเคราะห์หาปริมาณของ ethinyloestradiol, mestranol และ lynoestrenol ในตัวอย่างยาเม็ดคุมกำเนิด โดยวิธี standard addition วิเคราะห์หาปริมาณฮอร์โมนทั้งสามชนิดนี้ โดยใช้ ACN/H₂O (80:20, v/v) และ MeOH/H₂O (85:15, v/v) เป็น mobile phase

วิธี standard addition

ใช้ไปเปต (graduate pipet) ขนาด 1 มิลลิลิตร กูดสารละลายที่สกัดได้จากตัวอย่างยาเม็ดคุมกำเนิด ปริมาตร 0.2 มิลลิลิตร ใส่ลงในขวดปรับปริมาตร (volumetric flask) ขนาด 1 หรือ 5 มิลลิลิตร (ขึ้นอยู่กับ ปริมาตรตัวยาสอร์โมน) แล้ว

เติมสารละลายมาตรฐานฮอร์โมนที่ต้องการวิเคราะห์ลงไปตามปริมาณที่ต้องการ และปรับปริมาตรด้วยระบบตัวทำละลายที่เหมาะสม นำสารละลายผสมเหล่านี้ไปฉีดเข้าสู่ระบบ HPLC ต่อไปใต้หลอดวิเคราะห์ฮอร์โมนในตัวอย่างยามืดคุมกำเนิดจำนวน 16 ชนิด (ตารางที่ 51) ดังตัวอย่างการวิเคราะห์ ethinyloestradiol, mestranol และ lynoestrenol โดยวิธีนี้แสดงในตารางที่ 52 , 53 และ 54 และกราฟในรูปที่ 41, 42 และ 43 ตามลำดับ

4.3 วิจารณ์ผลการทดลอง

ในการวิเคราะห์หาปริมาณสารโดยวิธี HPLC ใช้วิธีการวัดขนาดของพีคจากโครมาโตแกรม เนื่องจากขนาดของพีคเป็นสัดส่วนกับปริมาณของสารที่แยกได้ เพื่อแปลข้อมูลจากสัญญาณเครื่องตรวจจับ เช่น การวัดความสูงของพีค หรือการหาพื้นที่ใต้พีค แล้วเทียบหาปริมาณสารจากกราฟมาตรฐาน ในงานวิจัยนี้ได้ใช้วิธีการวัดความสูงของพีคและหาพื้นที่ใต้พีคโดยใช้วิธีการวัดด้วยไม้วัดมาตรฐาน ปริมาณที่วิเคราะห์ได้จะถูกต้องแม่นยำมากน้อยแค่ไหน ขึ้นอยู่กับขบวนการวิเคราะห์ตั้งแต่การเตรียมสารตัวอย่าง ตลอดจนการวิเคราะห์ผลจากข้อมูลการทดลอง ปัจจุบันมีการใช้เครื่องอินทิเกรเตอร์ หรือต่อเข้ากับเครื่องคอมพิวเตอร์เพื่อช่วยเพิ่มความถูกต้องแม่นยำให้มากขึ้น (49,87)

4.3.1 การเตรียมสารตัวอย่าง (Sample preparation)

การวิเคราะห์สารประกอบทางยาโดยวิธี HPLC สิ่งสำคัญอย่างหนึ่งของขั้นตอนการวิเคราะห์ คือ การเตรียมสารตัวอย่าง การใช้ไปเปิดที่มีความแม่นยำสูง จะช่วยลดข้อผิดพลาดที่เกิดจากการใช้ไปเปิดที่คลาดเคลื่อนได้มาก การปรับปริมาตรของสารละลายตัวอย่างหรือสารละลายมาตรฐาน ควรจะระมัดระวังเกี่ยวกับการคำนวณความเข้มข้นหรือ molarity ถ้าสารละลายมีความเข้มข้นสูงเกินไป อาจทำให้คอลัมน์ overload และทำให้พีคที่แยกได้เสียรูปไป หรืออาจมีปัญหาต่อการวิเคราะห์ข้อมูลจากโครมาโตแกรม ข้อผิดพลาดที่อาจเกิดจากการชั่งน้ำหนัก หรือการเจือจางสารละลายต่างๆ นอกจากนี้ควรระมัดระวังเกี่ยวกับการเก็บรักษาสารตัวอย่าง (sample storage) เพราะอาจทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงความเข้มข้นเนื่องจากการระเหย และการถูกเจือปนจากสารอื่นในขั้นตอนการสกัด จะต้องหลีกเลี่ยงจากการเกิดการสลายตัวด้วยความร้อนหรือสารเคมีกับสารประกอบที่จะวิเคราะห์ ขั้นตอนต่างๆ เหล่านี้เป็นข้อควรปฏิบัติ เพื่อช่วยเพิ่มความถูกต้องและแม่นยำของการวิเคราะห์ได้อีกทางหนึ่ง (49)

4.3.2 การนำสารตัวอย่างเข้าสู่คอลัมน์ (Sample introduction)

เนื่องจากวิธี HPLC ใช้สารละลายตัวอย่างในปริมาณน้อยๆ จึงต้องระมัดระวังในการฉีดสารเข้าสู่คอลัมน์ syringe ที่ใช้จะต้องสะอาดและไม่อุดตัน ไม่มีฟองอากาศ และวัดปริมาตรได้อย่างแม่นยำ ควรจะล้าง (rinse) syringe ด้วยสารละลายตัวอย่างหลายๆครั้ง เพื่อป้องกัน dilution effect เช็ดเข็มให้แห้งเพื่อป้องกันหยดสารที่เกินมา ขณะที่กำลังฉีด ในเครื่องมือ HPLC แต่ละชุดจะใช้เข็มของ syringe ที่พอดีกับ injector เพื่อป้องกันการสูญเสียสารตัวอย่างในระหว่างขั้นตอนการฉีด (49)

4.3.3 การหาช่วงของ linear response

ได้ทดลองหาความสัมพันธ์ระหว่าง detector response และความเข้มข้นของสตีรอยด์ฮอร์โมนทั้ง 4 ชนิด เพื่อหาช่วงของความเข้มข้นที่เป็นเส้นตรงในการใช้หาปริมาณสารตัวอย่าง โดยใช้สมการ regression ($Y = ax + b$) ได้ผลดังนี้

เมื่อ y = ปริมาณสารที่ฉีด (μg)
 x = detector response
 a = slope
 b = intercept

ตารางที่ 55 ซึ่งแสดงถึง linearity ของ response เทียบกับความเข้มข้นของตัวอย่างฮอร์โมนที่จะหาปริมาณในตัวอย่างยาเม็ดคุมกำเนิด พบว่า กราฟมาตรฐานเป็นเส้นตรงในช่วงความเข้มข้นที่ศึกษา และผ่านใกล้จุด origin ได้ค่า correlation coefficient ใกล้ค่า ideal (> 0.9993) ethinyloestradiol และ mestranol ให้ช่วงที่เป็นเส้นตรงตลอดช่วงที่ศึกษา lynoestrenol ให้ช่วงที่เป็นเส้นตรงตั้งแต่ 100-2,500 ppm และมีค่า $r = 0.9996$ และ levonorgestrel ก็เช่นกันแสดงว่า ค่า capacity factor และ band dispersion ของการฉีดสารที่แยกในคอลัมน์ ไม่ขึ้นกับความเข้มข้นของสตีรอยด์ฮอร์โมนในช่วงนี้ (21)

4.3.4 การหาขีดต่ำสุดของการตรวจวัด (Detection limit)

ในเทคนิคโครมาโตกราฟี นิยามค่า detection limit (D L) ไว้ว่า

เป็นปริมาณสารต่ำสุดที่ให้อัญญาณเท่ากับ 2 เท่าของ short-term noise ได้ทดลองหา D L ของสตรอยด์ฮอร์โมนทั้ง 4 ชนิด โดยใช้ sensitivity สูงสุด (0.0005 AUFS) ของเครื่องตรวจวัดอุลตราไวโอเลตสเปกโตรโฟโต มิเตอร์ ที่ความยาวคลื่น 213 นาโนเมตร (65,88) ได้ผลการทดลองแสดงในตารางที่ 56 ปริมาณของสารประกอบสตรอยด์ฮอร์โมนที่สามารถตรวจวัดได้ที่มีความยาวคลื่นนี้ ถือว่าเป็นปริมาณต่ำสุด ได้จากการฉีดสารละลายมาตรฐานฮอร์โมนแต่ละตัวแล้ววัดความสูงของพีคเทียบกับความสูงของระดับ noise มีค่าเป็น 2 เท่า พบว่าสามารถวิเคราะห์ ethinyloestradiol ได้ต่ำสุดถึง 2.0 นาโนกรัม levonorgestrel และ mestranol วิเคราะห์ปริมาณได้ต่ำสุดเท่ากับคือ 5.0 นาโนกรัม และ lynoestrenol วิเคราะห์ได้ต่ำสุด 10.0 นาโนกรัม จะเห็นว่า ethinyloestradiol มีค่า D L ต่ำกว่าสตรอยด์ฮอร์โมนตัวอื่น เนื่องจากมีค่าการดูดกลืนแสง UV ได้สูง ที่ความยาวคลื่นนี้ ส่วน lynoestrenol มีค่า D L สูงกว่าค่าที่ได้จาก levonorgestrel และ mestranol ประมาณ 2 เท่า เนื่องจากใช้ sensitivity สูงสุดของเครื่องตรวจวัด และความยาวคลื่นที่ใช้อยู่ไกลช่วง far UV ทำให้มี noise รบกวนมาก โดยเฉพาะ long-term noise และเกิด baseline drift ซึ่งอาจมีผลต่อการหาค่า D L ได้ (65) Carignan *et al.* ได้หาขีดต่ำสุดของการตรวจวัดของสตรอยด์ฮอร์โมน 7 ชนิด ในตัวอย่างยาเม็ดคุมกำเนิด ที่ความยาวคลื่น 210 นาโนเมตร โดยการวัดสัญญาณของสารเทียบเป็น 4 เท่าของ baseline และวิเคราะห์ ethinyloestradiol ได้ต่ำถึง 1 นาโนกรัม (44) และ Bagon *et al.* รายงานได้เท่ากับ 2 นาโนกรัม ที่ความยาวคลื่น 212 นาโนเมตร (40)

4.3.5 การศึกษาวิธีการสกัด

ได้ทดลองสกัดสตรอยด์ฮอร์โมนโดยใช้ตัวทำละลายชนิดต่างๆ ตามแผนผังการสกัด (รูปที่ 34) จาก synthetic sample และตัวอย่างยาเม็ดคุมกำเนิด และหา % recovery เพื่อเปรียบเทียบประสิทธิภาพของการสกัด เพื่อหาระบบตัวทำละลายสกัดที่เหมาะสมต่อไป

4.3.5.1 การสกัด mestranol และ lynoestrenol จาก synthetic sample โดยใช้ส่วนผสมของเมทานอล หรืออะซิโตนใดร่วมกับน้ำด้วยสัดส่วนต่างๆกัน (ตารางที่ 28) พบว่าเมทานอลกับน้ำในสัดส่วน 1 : 1 และ 1 : 2 โดยปริมาตรได้สารละลายชั้น หลังจากเหวี่ยงใส่ และนำมากรองผ่าน filter membrane ขนาด 0.45 ไมโครเมตร

จะได้อะซีโตในตัวอย่างเดียวเป็นตัวสกัด จะได้อะซีโตในตัวอย่างอื่น และทำให้กระดาษกรองทะเล จึงไม่นำมาวิเคราะห์หาปริมาณสาร จาก % recovery ของ mestranol พบว่าเมื่อใช้ระบบ MeOH/H₂O (4:1), MeOH/H₂O (85 : 15) ซึ่งใช้เป็น mobile phase และ ACN/H₂O (4:1) ให้ค่า 97.66-100.99% ส่วนระบบที่มีปริมาณของเมทานอลน้อยกว่าไม่เหมาะสมที่ใช้สกัด หรือแม้แต่ใช้เมทานอลอย่างเดียวก็ยังไม่ให้ recovery ค่าเช่นเดียวกัน ระบบ MeOH/H₂O (1:1) มีปัญหาในการกรองคือกรองผ่าน filter membrane ไคคอนขางยากกว่าระบบ MeOH/H₂O (2:1) ทำให้ recovery มีค่าต่ำกว่าปกติ

ส่วนการสกัด lynoestrenol ได้ผลการทดลองในลักษณะเดียวกันกับของ mestranol คือได้ recovery จาก 97.66-99.01 % (sample no. 1-6 ในตารางที่ 29) ดังนั้น ในการสกัดตัวอย่างยาเม็ดคุมกำเนิดที่มี mestranol และ lynoestrenol เป็นองค์ประกอบ สามารถใช้ระบบ MeOH/H₂O (85:15) หรือ MeOH/H₂O (4:1) และ ACN/H₂O (4:1) เป็นตัวทำละลายสกัดได้โดยปราศจากการรบกวนจากฟีกของ solvent front หรือฟีกของ excipient ในตัวอย่างยา⁽⁴⁴⁾

4.3.5.2 การสกัด ethinyloestradiol และ levonorgestrel จาก synthetic sample โดยใช้ส่วนผสมของอะซีโตในไตรกับน้ำด้วยสัดส่วนต่างๆกัน (ตารางที่ 32) พบว่า การใช้อะซีโตในไตรกับน้ำในสัดส่วนดังกล่าวสกัดฮอร์โมนทั้งสองชนิดนี้ ได้ recovery เฉลี่ย 95.97 และ 99.88 % ตามลำดับ (ตารางที่ 34) ยกเว้นเมื่อใช้ อะซีโตในไตรอย่างเดียวไม่เหมาะสมสำหรับใช้สกัด เพราะได้อะซีโตในตัวอย่างอื่นและกรองไม่ได้ ภายใต้สภาวะการทดลองเดียวกันนี้ได้เปรียบเทียบการหาปริมาณ ethinyloestradiol และ levonorgestrel โดยการหาพื้นที่ใต้ฟีก และได้ recovery เท่ากับ 96.16 และ 99.49% ตามลำดับ (ตารางที่ 35) ค่าเบี่ยงเบนสัมพัทธ์จากการใช้ระบบการสกัดด้วยตัวทำละลายชนิดต่างๆเหล่านี้ สำหรับสกัด ethinyloestradiol และ levonorgestrel มีค่าเท่ากับ 1.27 หรือ 1.63% และ 3.58 หรือ 3.86% ตามลำดับ เพราะฉะนั้น การสกัด ฮอร์โมนทั้งคู่นี้ในตัวอย่างยาเม็ดคุมกำเนิด สามารถใช้ระบบ ACN/H₂O (4:1, v/v) หรือ mobile phase ไคทั้นที่

4.3.5.3 การสกัด ethinyloestradiol และ levonorgestrel จากตัวอย่างยาเม็ดคุมกำเนิด Microgynon 50-ED โดยใช้ส่วนผสมของเมทานอล และ อะซิโตนในไตรกลีเซอไรด์ (ตารางที่ 39) พบว่า เมื่อใช้ระบบ MeOH/H₂O (4:1, v/v) ACN/H₂O (3:2, v/v) และ ACN/H₂O (4:1, v/v) สกัดยาตัวอย่างและได้ค่าปริมาณ ยาที่ระบุของ ethinyloestradiol ในช่วง 89.50-102.56% ส่วนที่ใช้อะซิโตนในไตร หรือเมทานอลอย่างเดียว วิเคราะห์หาปริมาณ ethinyloestradiol ได้ค่า (ตารางที่ 40) ไม่เหมาะสำหรับใช้สกัดสารตัวอย่าง ในกรณีของการสกัด levonorgestrel พบว่าวิเคราะห์ ปริมาณโคคออนข้างค่า และไม่ขึ้นอยู่กับระบบของตัวทำละลายที่ใช้

จากการศึกษาวิธีการสกัดดังกล่าวนี้จะเห็นว่าสามารถใช้ mobile solvent ที่ใช้แยกสารผสมแต่ละระบบ เป็นตัวทำละลายสกัดได้เลย และได้ประยุกต์ขั้นตอนการสกัดจากรายงานหลายฉบับ มีการสกัดจากยาเม็ดโดยตรง หรือ บดเป็นผงแล้ว การสกัดจากยาเม็ดที่เคลือบและไม่เคลือบด้วยน้ำตาลด้วยตัวทำละลายต่างชนิดกัน วิธีการสกัดตามรายงานของ Carignan *et al.* มีขั้นตอนการสกัดที่ทำได้ง่ายและสะดวกกว่าวิธีของกลุ่มนักวิจัยกลุ่มอื่น คือ การขังผงยาที่บดแล้ว ใส่ลงในหลอดทดลอง และใช้ไปเปตาคูตัวทำละลายที่ใช้สกัดซึ่งมีสารละลาย I.S. ใส่ลงในหลอดทดลองแล้วเขย่าให้เข้ากันและนำไปเหวี่ยงใส่จนกระทั่งได้สารละลายใส (clear solution) เพื่อใช้วิเคราะห์โดยวิธี HPLC ต่อไป (40, 44, 45) ปัญหาที่เกิดขึ้นกับวิธีการสกัดสตีรอยด์ อาจเกิดจากสตีรอยด์ละลายได้ในตัวทำละลายต่างๆ ได้แตกต่างกัน และมีแนวโน้มที่จะเกาะ อยู่กับ excipient อีกด้วย สตีรอยด์ที่เป็นโพลาร์ มากๆ จะเกิดการเกาะกัน (binding) ระหว่าง active ingredient กับ polar excipient เช่น แลคโตส หรือแป้ง จะเป็นการลดประสิทธิภาพของการสกัด (effectiveness of extraction) โดยเฉพาะการสกัดสตีรอยด์ที่มีปริมาณน้อยๆ เช่น mestranol ซึ่งเป็นเอสโตรเจนที่มีฟีนอลิกไฮดรอกซี กรู๊ปอยู่ในรูปของอีเทอร์ ถูกสกัดได้ง่ายกว่า ethinyloestradiol ซึ่งมีฟีนอลิกไฮดรอกซี กรู๊ป อยู่ในรูปอิสระมีวิธีการลด adsorption loss และเพิ่มความจำเพาะของการสกัด คือการใช้ two-phase extraction แทนการใช้ตัวทำละลายชนิดเดียว เช่น เมทานอล หรือเอทานอล มักจะใช้น้ำเป็นตัวทำละลายอีกชนิดหนึ่ง ซึ่งจะช่วยให้ละลายแลคโตส ที่ใช้เป็นส่วนประกอบของ excipient อย่างไรก็ตามวิธีการสกัดดังกล่าวนี้ก็มีข้อเสียบางอย่าง เช่น ใช้เวลานานขึ้น

และอาจจะละลาย excipient ได้ไม่หมดทำให้เกิด emulsion ขึ้นในระหว่างขั้นตอนการสกัด⁽¹⁾

4.3.6 การศึกษาปริมาณสารคืนกลับ (Recovery study)

4.3.6.1 การหาปริมาณสารคืนกลับจาก synthetic sample ได้เตรียม synthetic sample ที่ประกอบด้วยฮอร์โมน mestranol, lynoestrenol, ethinyloestradiol และ levonorgestrel มีปริมาณอย่างละ 50 ไมโครกรัมต่อเม็ด นำมาสกัดและวิเคราะห์ ได้สรุปผลการหา recovery ไว้ในตารางที่ 57 ซึ่งแสดงค่าเฉลี่ยของการวิเคราะห์หาปริมาณสเตียรอยด์ฮอร์โมน จาก synthetic sample จำนวน 10 ครั้งเมื่อใช้ MeOH/H₂O (85:15, v/v) สกัด mestranol และ lynoestrenol ได้ปริมาณเท่ากับ 48.55 และ 49.15 ไมโครกรัมต่อเม็ด และได้ recovery เท่ากับ 97.09 และ 98.29% (ค่า R S D เท่ากับ 1.48 และ 2.98%) ตามลำดับ และใช้ ACN/H₂O (80:20, v/v) สกัด ethinyloestradiol และ levonorgestrel วิเคราะห์หาปริมาณสารโดยใช้ peak height ratio ซึ่งใช้ progesterone เป็น I.S. เทียบกับกราฟมาตรฐาน ได้ปริมาณสารเท่ากับ 48.89 และ 49.23 ไมโครกรัมต่อเม็ด และได้ recovery เท่ากับ 97.78 และ 98.46% (ค่า R S D เท่ากับ 2.21 และ 4.14%) ตามลำดับ ได้ทดลองซ้ำเพื่อหาปริมาณของ ethinyloestradiol และ levonorgestrel โดยไม่ใช้ I.S. และวัดความสูงของพีคสารตัวอย่างเทียบกับกราฟมาตรฐาน หาปริมาณสารทั้งสองนี้ได้เท่ากับ 49.09 และ 49.58 ไมโครกรัมต่อเม็ด และได้ recovery เท่ากับ 98.18 และ 99.17% (ค่า R S D เท่ากับ 2.42 และ 0.84%) ตามลำดับ เพื่อเปรียบเทียบผลของการใช้ I.S. ในการวิเคราะห์ปริมาณสาร

จะเห็นว่า การหา % recovery ของสารจาก synthetic sample เป็นการตรวจสอบความถูกต้องของขั้นตอนการวิเคราะห์ โดยเฉพาะเพื่อศึกษาประสิทธิภาพของการสกัดได้ % recovery ของสารประกอบทั้ง 4 ชนิดนี้มีค่าสูงในช่วง 97.09-99.17% และมีค่า R S D 2.98% การหา % recovery จาก synthetic sample วิธีนี้ได้ประยุกต์ใช้ตามวิธีของ Bagon *et al.*⁽⁴⁰⁾ และ Carignan *et al.*⁽⁴⁴⁾ แต่ใช้ปริมาณสเตียรอยด์ฮอร์โมนมาตรฐานอย่างละ 50 ไมโครกรัมต่อเม็ดเท่านั้นไม่ได้เติมสารมาตรฐานฮอร์โมน

ให้มีปริมาณตัวยาเท่ากับที่ระบุไว้ข้างกลาง เนื่องมีปริมาณสารมาตรฐานจำกัด ผลการทดลองในตารางที่ 57 แสดงให้เห็นว่าการวิเคราะห์โดยวิธีนี้มีความถูกต้องและแม่นยำสูง และมีประสิทธิภาพการสกัดได้เกือบ 100%

4.3.6.2 การหาปริมาณสารคืนกลับโดยวิธี standard addition วิเคราะห์หาปริมาณตัวยาฮอร์โมนในตัวอย่างยาเม็ดคุมกำเนิด โดยวิธี standard addition คือ นำสารละลายตัวอย่างที่สกัดได้มาเติมสารละลายมาตรฐานฮอร์โมนที่ต้องการวิเคราะห์ด้วยปริมาณ (ความเข้มข้น) ต่างกัน แล้วนำมาวิเคราะห์โดยวิธี HPLC เปรียบเทียบผลการทดลองกับกราฟมาตรฐานของฮอร์โมนชนิดเดียวกัน เปอร์เซนต์ recovery ของ mestranol และ lynoestrenol (ตารางที่ 58) มีค่าเฉลี่ยเท่ากับ 101.62 และ 100.94% ตามลำดับ และ % recovery ของ ethinyloestradiol (ตารางที่ 58) มีค่าเฉลี่ยเท่ากับ 103.66% แสดงให้เห็นว่าปริมาณสารละลายมาตรฐานฮอร์โมนทั้ง 3 ชนิดดังกล่าวที่เติมลงในสารละลายตัวอย่างไม่มีการสูญหาย หรือสลายตัวในระหว่างขบวนการแยกในคอลัมน์ การหา % recovery โดยวิธีนี้ได้ค่าสูงกว่าค่าที่ได้จากวิธีการวิเคราะห์สารจาก synthetic sample ทั้งนี้อาจเป็นเพราะวิธีหา % recovery จาก synthetic sample มีขั้นตอนการทดลองมากกว่า และเป็นผลให้เกิดข้อผิดพลาดขึ้นได้ตามขั้นตอนการเตรียมสารตัวอย่างดังกล่าวไว้ในข้อ 4.3.1

4.3.7 การวิเคราะห์หาปริมาณสตรีรอยด์ฮอร์โมนในตัวอย่างยาเม็ดคุมกำเนิด

4.3.7.1 การวิเคราะห์หาปริมาณ ethinyloestradiol ได้วิเคราะห์หาปริมาณของ ethinyloestradiol ในตัวอย่างยาเม็ดคุมกำเนิด จำนวน 17 ชนิด โดยใช้ mobile phase 2 ระบบ คือ MeOH/H₂O (85:15,v/v) ใต้ปริมาณของ ethinyloestradiol และ % labelled amount แสดงในตารางที่ 59

4.3.7.2 การวิเคราะห์หาปริมาณของ mestranol ได้วิเคราะห์หาปริมาณของ mestranol ในตัวอย่างยาเม็ดคุมกำเนิดจำนวน 2 ชนิด โดยใช้ระบบ MeOH/H₂O (85:15,v/v) เป็น mobile phase ใต้ปริมาณของ mestranol และ % labelled amount แสดงในตารางที่ 60

4.3.7.3 การวิเคราะห์หาปริมาณ lynoestrenol ได้วิเคราะห์หาปริมาณ lynoestrenol ในตัวอย่างยาเม็ดคุมกำเนิด จำนวน 5 ชนิด โดยใช้ระบบ MeOH/H₂O (85:15, v/v) เป็น mobile phase ใ้ปริมาณของ lynoestrenol และ % labelled amount แสดงในตารางที่ 61

4.3.7.4 การวิเคราะห์หาปริมาณ levonorgestrel ได้วิเคราะห์หาปริมาณ levonorgestrel ในตัวอย่างยาเม็ดคุมกำเนิด จำนวน 12 ชนิด โดยใช้ระบบ ACN/H₂O (80:20, v/v) เป็น mobile phase ใ้ปริมาณของ levonorgestrel และ % labelled amount แสดงในตารางที่ 62

สรุปปริมาณวิเคราะห์สตีรอยด์ฮอร์โมนทั้ง 4 ชนิดที่วิเคราะห์ได้จากตัวอย่างยาเม็ดคุมกำเนิด 20 ตัวอย่าง แสดงไว้ในตารางที่ 63

ตารางที่ 59 แสดงปริมาณของ ethinyloestradiol ที่วิเคราะห์จากตัวอย่างยาเม็ดคุมกำเนิด โดยใช้วิธีการคำนวณปริมาณสารจากการเทียบกราฟมาตรฐานซึ่งวัดความสูงพีค และหาพื้นที่ใต้พีคตามสมการ 13 พบว่า การหาปริมาณสารโดยวิธีดังกล่าวให้ผลการทดลองใกล้เคียงกันมาก ได้เปรียบเทียบปริมาณของ ethinyloestradiol ในเทอมของ % labelled amount ในจำนวนตัวอย่างยาเม็ดคุมกำเนิด 17 ชนิดนี้ มีตัวอย่างยา 14 ชนิดที่มีปริมาณ ethinyloestradiol ในช่วง 97.52-105.58% วิเคราะห์หาปริมาณของ ethinyloestradiol ในตัวอย่างยา Neogynon-21 ได้เท่ากับ 95.50% ส่วนตัวอย่างยา Ovostat 28 และ Batterfly มีปริมาณของ ethinyloestradiol ต่ำกว่าคือหาได้เพียง 88.60 และ 88.30% เท่านั้น ได้ทดลองวิเคราะห์หาปริมาณสารโดยวิธี standard addition พบว่าใ้ปริมาณของ ethinyloestradiol สอดคล้องตามวิธีการเทียบกราฟมาตรฐาน ดังผลการทดลองในตารางที่ 52 ตัวอย่างยา Trinordiol และ Triquilar มีปริมาณของ ethinyloestradiol 2 ระดับ คือ เม็ดสีขาวขนาดตัวอย่าง 40 ไมโครกรัม และเม็ดสีน้ำตาลและเม็ดสีเหลือง ขนาดตัวอย่าง 30 ไมโครกรัม จากการวิเคราะห์หาปริมาณจากเม็ดยา 3 สีในตัวอย่างยาทั้งสองชนิดนี้ พบว่ามีปริมาณของ ethinyloestradiol ตรงตามที่ระบุไว้ และตัวอย่างยา Nordette และ Microgynon-30 ED ก็ให้ผลการวิเคราะห์ปริมาณของ ethinyloestradiol ตรงตาม

ที่ระบุไว้เช่นเดียวกัน ส่วนปริมาณของ ethinyloestradiol ในตัวอย่างอื่นระบุไว้เท่ากับ 50 ไมโครกรัมต่อเม็ด และวิเคราะห์ด้วยาไคผลใกล้เคียงกับปริมาณที่ระบุไว้

ตารางที่ 60 แสดงปริมาณของ mestranol จากตัวอย่างยาเม็ดคุมกำเนิด 2 ชนิดคือ Lyndiol 2.5 และ Noracyclin 22 ไคคา labelled amount เท่ากับ 102.60 และ 95.03% ตามลำดับ วิเคราะห์โดยวิธี standard addition (ตารางที่ 52) ไคผลการทดลองเท่ากัน จะเห็นว่า Noracycline 22 มีปริมาณของ mestranol ค่ากว่าที่ระบุไว้ประมาณ 5% ตารางที่ 61 แสดงปริมาณของ lynoestrenol ที่วิเคราะห์จากตัวอย่างยา 5 ชนิด พบว่ามีปริมาณตัวยาตรงตามที่ระบุไว้ทั้งหมด คือไคคา labelled amount ในช่วง 99.20-106.00% และได้วิเคราะห์หาปริมาณของ levonorgestrel ในตัวอย่างยาจำนวน 12 ชนิด ดังผลการทดลองสรุปไว้ในตารางที่ 62 พบว่า สารประกอบฮอร์โมนชนิดนี้มีปริมาณต่ำกว่าปริมาณตัวยาที่ระบุไว้และมี % labelled amount ในช่วงกว้าง (84.24-98.43%) สารประกอบโปรเจสโตเจนชนิดนี้ ที่ใช้เป็นองค์ประกอบของยาเม็ดคุมกำเนิด มี 2 ชนิด ซึ่งเป็นสาร optical isomers คือ D,L-norgestrel และ D-norgestrel หรือที่เรียกว่า levonorgestrel แต่ที่ระบุไว้ในฉลากยาคือ norgestrel และ D-norgestrel หรือ levonorgestrel ในงานวิจัยนี้ได้เลือกวิเคราะห์เฉพาะ levonorgestrel เท่านั้น Gazdag et al. ได้รายงานการแยก isomers ทั้ง 2 ตัวนี้ ซึ่งแตกต่างกันเฉพาะที่ stereochemistry ของเอทิลกรุปที่ C₁₃ เท่านั้น (55)

ได้รวบรวมผลการวิเคราะห์หาปริมาณสเตียรอยด์ฮอร์โมน 4 ชนิด จากตัวอย่างยาเม็ดคุมกำเนิดจำนวน 20 ชนิดไว้ในตารางที่ 63 ในการวิเคราะห์หาปริมาณสารดังกล่าวนี้ ได้ซึ่งสารที่จะวิเคราะห์ตัวอย่างละ 3 ข้ำ เพื่อนำไปสกัดแล้วนำมาฉีดเข้าเครื่อง HPLC โดยฉีดสารละลายตัวอย่างจำนวน 2-3 ข้ำ แล้วหาค่าเฉลี่ยของ response จากเครื่องบันทึกสัญญาณ นำมาสร้างกราฟมาตรฐานหรือเทียบหาปริมาณสารที่ต้องการ จะเห็นว่าปริมาณสารที่หาได้จากแต่ละข้ำมีค่าใกล้เคียงกัน ส่วนค่าที่แตกต่างกันไปบางอาจเนื่องจากการสุ่มตัวอย่างผงยาซึ่งได้จากการนำเม็ดยาทุกเม็ดที่มีฮอร์โมนมาบดรวมกัน ทั้งนี้ได้พยายามขจัดข้อผิดพลาดที่อาจเกิดจากการเตรียมสารละลายตัวอย่าง หรือสารละลายมาตรฐานดังกล่าวแล้ว ในข้อ 4.3.1 และการฉีดสารเข้าสู่เครื่องมือ HPLC ตามข้อวิจารณ์ข้อ 4.3.2 ให้น้อยลง การบันทึกข้อมูลการทดลอง โดยการใช้วิธีการวัดโดยใช้ไม้วัดมาตรฐาน (manual method)

เช่น การวัดความสูงพีค หรือหาพื้นที่ใต้พีค อาจมีผลกระทบต่อผลการวิเคราะห์หาปริมาณได้เช่นเดียวกัน การสกัดสารฮอร์โมนจากเม็ดยาในตัวอย่างต่างๆ ก็อาจมีส่วนเกี่ยวข้องกับความคลาดเคลื่อนของผลการทดลองได้ เนื่องจากยาคุมกำเนิดแต่ละยี่ห้อ มี excipient ในเม็ดยาแตกต่างกัน บางยี่ห้อที่ระบุไว้ แต่บางยี่ห้อไม่ระบุไว้ ในการศึกษาประสิทธิภาพการสกัดได้เตรียมตัวอย่างยาเตรียม (synthetic sample) จาก matrix ที่ทราบจากตัวอย่างยาบางชนิด และจาก matrix ที่หาได้ง่าย อาจทำให้ matrix ที่อยู่ในตัวอย่างยาที่เชื่อมกับยาที่เตรียมขึ้นมีลักษณะต่างกัน ทำให้ตัวทำละลายที่ใช้สกัดละลายฮอร์โมนที่ต้องการได้ไม่หมดดังที่กล่าวแล้ว

ในข้อ 4.3.5 อย่างไรก็ตามการวิเคราะห์หาปริมาณ ethinyloestradiol, mestranol และ lynoestrenol ได้ผลเป็นที่น่าพอใจ แต่ปริมาณ levonorgestrel มีค่า % labelled amount ค่อนข้างต่ำในทุกๆ ตัวอย่าง ทั้งนี้ คาดว่าเกิดจากสาเหตุ 2 อย่างคือ ฮอร์โมนชนิดนี้เกิดการสลายตัวไปไต่บางส่วน และตัวอย่างยาคุมกำเนิดมีปริมาณตัวยาไม่ตรงตามที่ระบุไว้ข้างกล่องก็ได้ มีตัวอย่างยาเพียง 4 ตัวอย่างเท่านั้นที่มี % labelled amount มากกว่า 95.82 จากที่วิเคราะห์ทั้งหมด 8 ตัวอย่าง วิเคราะห์หาปริมาณ lynoestrenol จากตัวอย่างยาเม็ด 8 ตัวอย่างได้ผลตรงตามที่ระบุไว้ทั้งหมด ในตัวอย่างยา Noracyclin 22 วิเคราะห์หาปริมาณ mestranol ได้แค่ 95.03% ส่วนปริมาณ ethinyloestradiol ในตัวอย่างยา Ovostat 28, Butterfly และ Neogynon-21 วิเคราะห์ผลได้แค่ 88.60 88.30 และ 95.50% ตามลำดับ นอกนั้นได้ผลมากกว่า 97.52% ขึ้นไป ทั้งนี้อาจเป็นเพราะตัวอย่างยาเม็ดเป็นยาเก่า (เก็บไว้นาน) หรืออาจมีปริมาณตัวอย่างต่ำกว่าปริมาณที่ระบุไว้ก็ได้ ดังโครมาโตแกรมของสารตัวอย่างยา Neogynon, Lyndiol 2.5, Ovostat และ Butterfly แสดงในรูปที่ 44, 45, 46 และ 47 ตามลำดับ

ตารางที่ 26 ความสูงพีคของ mestranol ที่ความเข้มข้นต่างๆ

Conc. (ppm)	Peak height (cm)		avg.
	rep.1	rep.2	
5	0.30	0.30	0.30
10	0.65	0.65	0.65
20	1.20	1.20	1.20
40	2.35	2.35	2.35
60	3.40	3.45	3.43
80	4.50	4.50	4.50
100	5.50	5.70	5.60

ตารางที่ 27 ปริมาณของ mestranol ที่พบในทางทาท reproducibility

No.	Peak height (cm)	Found (ppm)
1	2.90	50.05
2	2.90	50.05
3	2.95	51.05
4	2.95	51.05
5	2.95	51.05
6	2.95	51.05
7	2.95	51.05
8	2.90	50.05
9	2.95	51.05
10	2.90	50.05
11	2.95	51.05

ตารางที่ 28 น้ำหนักของ synthetic sample และปริมาณตัวทำละลายที่ใช้สกัด

Sample no.	Weight of synthetic sample (g)	Extraction solvents	Extracted solution after centrifuge
1	0.1010	MeOH/H ₂ O(4 : 1, v/v)	ใส
2	0.1017	MeOH/H ₂ O(85 : 15, v/v)	ใส
3	0.1015	ACN/H ₂ O(4:1, v/v)	ใส
4	0.1008	MeOH/H ₂ O(3:1, v/v)	ใส
5	0.1010	MeOH/H ₂ O(2 : 1, v, v)	ขุ่น
6	0.1024	MeOH/H ₂ O(1 : 1, v/v)	ขุ่น
7	0.1042	MeOH 100 %	ใส
8	0.1025	ACN 100 %	ขุ่น
9	0.1056		
10	0.1056		
11	0.1017		
12	0.1118		
13	0.0995		
14	0.1057		
15	0.1012		
16	0.1004		

* น้ำผสมที่สามารถละลายยาที่กรองผ่าน filter membrane ขนาด 0.45 µm ไม่ได้สารละลายใส

** การกรองไม่ได้ เนื่องจาก filter membrane ที่สุก และไม่ได้วิเคราะห์ปริมาณ

ตารางที่ 29 ปริมาณของ mestranol และ Lynoestrenol ที่สกัดได้จากตัวอย่างหลายรูปแบบต่าง ๆ

Sample no.	Mestranol			%Recovery	Lynoestrenol			% Recovery	
	Peak height (cm)				Peak height (cm)				Found (µg/tab)
	rep.1	rep.2	avg.		rep.1	rep.2	avg.		
1	4.30	4.25	4.28	100.99	0.85	0.80	0.83	49.51	99.01
2	4.25	4.25	4.25	98.33	0.80	0.75	0.78	49.16	98.33
3	4.20	4.30	4.25	98.52	0.80	0.80	0.80	49.26	98.52
5	4.20	4.30	4.25	99.01	0.75	0.75	0.75	49.51	99.01
6	4.20	4.30	4.25	97.66	0.80	0.80	0.80	48.83	97.66
7	4.20	4.15	4.18	94.05	0.80	0.80	0.80	47.99	95.97
8	4.10	4.15	4.13	93.66	0.75	0.75	0.75	48.78	97.56
9	4.20	4.20	4.20	92.80	0.80	0.80	0.80	47.35	94.70
10	4.15	3.95	4.05	90.91	0.80	0.70	0.75	47.35	94.70
11	1.20	1.15	1.18	27.53	0.30	0.30	0.30	18.68	37.37
12	2.55	2.60	2.58	53.67	0.45	0.45	0.45	28.62	57.25
13	3.65	3.50	3.58	84.42	0.70	0.65	0.68	45.23	90.45
14	3.75	3.90	3.83	83.26	0.75	0.80	0.78	47.30	94.61

ตารางที่ 30 ความสูงพีคของสารละลายมาตรฐาน mestranol และ lyncoestrenol

Conc. (ppm.)	Peak height (cm) of MT			Conc. (ppm)	Peak height (cm) of LN		
	rep.1	rep.2	avg.		rep.1	rep.2	avg.
5	0.95	1.00	0.98	10	0.35	0.35	0.35
10	1.80	1.80	1.80	20	0.65	0.70	0.68
20	3.65	3.65	3.65	30	1.00	1.05	1.03
30	5.45	5.50	5.48	40	1.40	1.35	1.38

ตารางที่ 31 Percentage recovery ของ mestranol และ lyncoestrenol จากสารวิเคราะห์ synthetic sample

Sample no.	Sample weight (g)	Mestranol			Lyncoestrenol			Recovery %			
		Peak height (cm)			Peak height (cm)						
		rep.1	rep.2	avg.	rep.1	rep.2	avg.				
17	0.1025	4.60	4.55	4.58	49.76	0.90	0.85	0.88	99.51	49.76	99.51
18	0.1029	4.50	4.50	4.50	48.59	0.85	0.90	0.88	97.18	49.56	99.13
19	0.1024	4.55	4.50	4.53	48.83	0.95	0.90	0.93	97.66	50.78	101.56
20	0.1031	4.50	4.50	4.50	48.50	0.90	0.90	0.90	96.99	49.47	98.93
21	0.0975	4.30	4.30	4.30	49.23	0.85	0.85	0.85	98.46	51.28	102.56
22	0.1095	4.60	4.70	4.65	47.49	0.90	0.95	0.93	94.98	47.49	94.98
23	0.1027	4.40	4.45	4.43	47.71	0.85	0.90	0.88	95.42	49.66	99.32
24	0.1085	4.70	4.75	4.73	47.93	0.90	0.90	0.90	95.85	47.01	94.01
25	0.1015	4.40	4.45	4.43	48.28	0.85	0.85	0.85	96.55	49.26	98.52
26	0.1017	4.50	4.50	4.50	49.16	0.80	0.85	0.83	98.33	47.20	94.40
n = 10		\bar{x} = 48.55	\bar{x} = 97.09		\bar{x} = 49.15	\bar{x} = 98.29					
		SD = 0.72	SD = 1.44		SD = 1.46	SD = 2.93					
		RSD = 1.48 %	RSD = 1.48 %		RSD = 2.98 %	RSD = 2.98 %					

Mobile phase : MeOH/H₂O (85:15,v/v)
 Flow-rate : 2.0 ml/min , Pressure 800 psi
 Sensitivity : 0.04 x 10 mV
 Chart speed : 0.5 cm/min
 Injection volume : 10 ul
 (ตารางที่ 29-31)

ตารางที่ 32 น้ำหนักของ synthetic sample และระบบตัวทำละลายที่ใช้สกัด

Sample no.	Sample weight(g)	Extraction solvents	Extracted solution after centrifuge
1	0.1031	ACN 100 %	ขุ่นมาก และทำให้กระดาษกรอง ทะลุขณะกรอง
2	0.1024		
3	0.1004		
4	0.1035	ACN/H ₂ O(1:1,v/v)	ขุ่นน้อย กรองแล้วใส
5	0.1004		
6	0.1022	ACN/H ₂ O(2:1,v/v)	ใส
7	0.1019		
8	0.1027	ACN/H ₂ O(3:1 ,v/v)	ใส
9	0.1044	ACN/H ₂ O(4:1, v/v)	ใส
10	0.1018	(mobile phase)	
11	0.1019		
12	0.1020	ACN/H ₂ (5 :1, v/v)	ใส

ตารางที่ 33 ความสูงและพื้นที่ใต้ของสารละลายมาตรฐาน ethinyloestradiol และ levonorgestrel

Conc. (ppm.)	Ethinyloestradiol			Levonorgestrel		
	Peak height (cm)		Peak area (cm ²)	Peak height (cm) of LNT		Peak area (cm ²) of LNT
	rep.1	rep.2		rep.1	rep.2	
	avg.	rep.1	rep.2	avg.	rep.1	rep.2
10	1.50	1.50	0.30	0.30	0.30	0.08
20	3.0	3.15	0.60	0.63	0.62	0.45
30	4.50	4.60	0.90	0.92	0.91	0.91
40	6.00	6.20	1.20	1.24	1.22	1.35
50	7.30	7.50	1.46	1.50	1.48	1.78

ตารางที่ 34 ปริมาณของ ethinyloestradiol และ levonorgestrel ที่สกัดได้จากตัวอย่างระบบต่าง (โดยเพิ่มค่าสูงที่สุด จากกราฟมาตรฐาน)

Sample no.	Ethinyloestradiol			Levonorgestrel		
	Peak height (cm)		Found (µg/tab)	Peak height (cm)		Found (µg/tab)
	rep.1	rep.2		rep.1	rep.2	
	avg.	rep.1	rep.2	avg.	rep.1	rep.2
3	3.65	3.70	3.68	48.81	0.90	0.90
4	3.65	3.85	3.75	48.31	0.90	0.95
5	3.55	3.70	3.63	47.81	0.85	0.95
6	3.60	3.75	3.68	47.95	0.90	0.90
7	3.65	3.70	3.68	48.09	0.90	0.90
8	3.65	3.75	3.70	47.72	0.90	0.90
9	3.80	3.75	3.78	47.89	0.95	0.95
10	3.75	3.75	3.75	49.12	0.95	0.95
11	3.55	3.65	3.60	47.11	0.85	0.90
12	3.50	3.65	3.58	47.06	0.85	0.90
					recovery	recovery
					97.61	99.60
					96.62	96.62
					95.62	99.60
					95.89	97.85
					96.17	98.14
					95.42	97.37
					95.79	105.36
					98.23	108.06
					94.21	98.14
					94.12	98.04

$\bar{X} = 95.97$

$\bar{X} = 99.88$

ตารางที่ 35 ปริมาณของ ethinyloestradiol และ levonorgestrel ที่สกัดได้จากตัวละลายระบบต่าง (โดยเทียบพื้นที่
ใต้พีคจากกราฟมาตรฐาน)

Sample no.	Ethinyloestradiol				Levonorgestrel					
	Peak area (cm ²)		Found (µg/tab)	%recovery	Peak area (cm ²)		Found (µg/tab)	%recovery		
	rep.1	rep.2			rep.1	rep.2			avg.	
3	0.73	0.74	0.74	48.81	97.61	0.23	0.23	0.23	49.80	99.60
4	0.73	0.77	0.75	48.31	96.62	0.23	0.24	0.23	48.31	96.62
5	0.71	0.74	0.73	48.81	97.61	0.21	0.24	0.23	49.80	99.60
6	0.72	0.72	0.72	46.97	93.93	0.23	0.23	0.23	48.92	97.85
7	0.73	0.74	0.74	48.09	96.17	0.23	0.23	0.23	49.07	98.14
8	0.73	0.75	0.74	47.71	95.42	0.23	0.23	0.23	48.69	97.37
9	0.76	0.75	0.76	48.85	97.70	0.24	0.24	0.24	52.68	105.36
10	0.75	0.75	0.75	49.12	98.23	0.24	0.24	0.24	54.03	108.06
11	0.71	0.73	0.72	47.11	94.21	0.21	0.23	0.22	48.09	96.17
12	0.70	0.73	0.72	47.06	94.12	0.21	0.23	0.22	48.04	96.08

$\bar{X} = 96.16$ $\bar{X} = 99.49$

ตารางที่ 36 Peak height ratio ของสารละลายมาตรฐาน ethinyloestradiol และ levonorgestrel เทียบกับ progesterone

Conc. (ppm.) of EE	Peak height of EE (cm.)			Peak height of INT (cm.)	Peak height of P (cm)			Peak height ratio EE/P				
	rep. 1	rep. 2	rep. 3		rep. 1	rep. 2	rep. 3	EE/P	INT/P			
20	2.95	2.95	2.95	1.75	1.80	1.80	1.78	1.40	1.40	1.40	2.11	1.27
30	4.35	4.35	4.35	3.65	3.65	3.65	3.65	1.40	1.40	1.40	3.11	2.41
40	5.80	5.85	5.85	5.50	5.55	5.50	5.52	1.40	1.40	1.40	4.16	3.94
50	7.50	-	-	7.50	7.00	-	7.00	1.45	-	-	5.17	4.83
60	9.35	-	-	9.35	9.15	-	9.15	1.50	-	-	6.23	6.10

ตารางที่ 37 Percentage recovery ของ ethinyloestradiol และ levonorgestrel จากสารวิเคราะห์ synthetic sample

Sample no.	Weight of synthetic sample (g)	Peak height of EE (cm.)				Peak height of LNT (cm.)				Peak height of P (cm.)				Peak height ratio of		Found (µg/tab.)		% recovery	
		rep.				rep.				rep.				EE/P	LNT/P	EE	LNT	EE	LNT
		1	2	3	avg.	1	2	3	avg.	1	2	3	avg.						
1	0.1007	4.0	4.0	4.0	4.00	1.0	1.0	1.0	1.00	1.45	1.45	1.45	1.45	2.76	0.69	51.04	54.28	103.28	108.55
2	0.1011	3.70	3.70	3.75	3.72	0.9	0.9	0.9	0.90	1.45	1.45	1.50	1.47	2.53	0.61	47.48	48.10	94.96	96.19
3	0.1012	3.75	3.80	3.85	3.80	0.90	0.95	0.95	0.93	1.45	1.50	1.50	1.46	2.56	0.63	49.41	49.27	98.87	98.54
4	0.1000	3.70	3.80	3.85	3.78	0.90	0.90	0.95	0.92	1.45	1.50	1.50	1.48	2.55	0.62	49.30	48.77	96.00	97.95
5	0.1025	3.95	3.95	3.95	3.95	0.95	0.95	0.95	0.95	1.50	1.50	1.50	1.50	2.63	0.63	48.78	48.96	97.56	97.92
6	0.1029	3.65	3.90	3.95	3.90	0.95	1.00	0.95	0.97	1.45	1.50	1.50	1.48	2.63	0.65	48.59	50.19	97.18	100.39
13	0.1009	3.75	3.80	3.85	3.80	0.90	0.90	0.90	0.90	1.50	1.50	1.50	1.50	2.53	0.60	48.56	47.12	97.13	94.25
14	0.1029	3.85	3.90	3.90	3.88	0.95	0.95	0.95	0.95	1.50	1.50	1.50	1.50	2.59	0.63	48.59	48.77	97.18	97.34
15	0.1011	3.70	3.80	3.85	3.78	0.90	0.90	0.90	0.90	1.50	1.50	1.50	1.50	2.52	0.60	48.47	47.03	96.93	94.06
16	0.1012	3.80	3.80	3.80	3.80	0.95	0.95	0.95	0.95	1.50	1.50	1.50	1.50	2.53	0.63	48.42	49.59	96.84	99.18

ข้อมูลจากการใช้สภาวะการทดลอง ดังนี้

Mobile phase : ACN/H₂O (80:20, v/v)
 Flow-rate : 1.5 ml/min
 Sensitivity : 0.08 x 10 mV.
 Chart speed : 1.0 cm./min.
 Injection volume: 5 µl.

n = 10 \bar{x} = 48.89 49.23 97.78 98.46
 S.D. = 1.08 2.04 2.16 4.08
 RSD = 2.21% 4.14% 2.21% 4.14%

(ตารางที่ 33-37)

ตารางที่ 38 ปริมาณของ ethinyloestradiol และ levonorgestrel จากสารวิเคราะห์ synthetic sample (โดยเทียบความสูงพีคจากกราฟมาตรฐาน)

Sample no.	Ethinyloestradiol					Levonorgestrel				
	Peak height (cm)			Found (µg/tab)	%recovery	Peak height (cm)			Found (µg/tab)	%recovery
	rep.1	rep.2	avg.			rep.1	rep.2	avg.		
1	3.95	3.95	3.95	50.65	101.29	0.95	0.95	0.95	50.15	100.30
2	3.65	3.65	3.65	46.49	92.98	0.85	0.85	0.85	49.46	98.91
3	3.85	3.80	3.83	48.42	96.84	0.95	0.90	0.93	49.41	98.81
4	3.75	3.80	3.78	49.00	98.00	0.90	0.90	0.90	50.00	100.00
5	3.95	3.95	3.95	49.76	99.51	0.95	0.95	0.95	49.27	98.54
6	3.90	3.90	3.90	48.59	97.18	0.95	0.95	0.95	49.08	98.15
13	3.85	3.85	3.85	49.55	99.11	0.95	0.95	0.95	50.05	100.40
14	3.85	3.90	3.88	48.59	97.18	0.95	0.95	0.95	49.08	98.15
15	3.95	3.95	3.95	50.45	100.89	0.95	0.95	0.95	49.95	99.90
16	3.85	3.85	3.85	49.41	98.81	0.95	0.90	0.93	49.41	98.81

n = 10 \bar{x} = 49.09 \bar{x} = 98.18 \bar{x} = 49.58 \bar{x} = 99.17
 SD = 1.13 SD = 2.38 SD = 0.38 SD = 0.83
 %RSD = 2.29 %RSD = 2.42 %RSD = 0.77 %RSD = 0.84

ข้อมูลการทดลองใช้สภาวะการทดลอง ดังนี้ (ตารางที่ 38)

Mobile phase : ACN/H₂O(80:20, v/v)
 Flow-rate : 1.5 ml/min
 Sensitivity: 0.08x10 mV
 Chart speed: 1.0 cm/min
 Injection volume: 10 µl

ตารางที่ 39 การเลือกใช้ระบบตัวทำละลายสกัดยา Microgynon 50-ED

Sample no.	Sample weight (g)	Extraction solvents	Extracted solution after centrifuge
1	0.0936	ACN 100 %	ใส
2	0.0925		
3	0.0904	MeOH 100 %	ใส
4	0.0907		
5	0.0922	MeOH/H ₂ O(4:1, v/v)	ขุ่น
6	0.0917		
7	0.0923	ACN/H ₂ O(3:2, v/v)	ใส
8	0.0936		
9	0.0929	ACN/H ₂ O(4:1, v/v)	ใส
10	0.0949		
11	0.0888	ACN/H ₂ O (1:1, v/v)	ขุ่น**
12	0.0943		

* นำมากรองแล้วใตสารละลายใส

** นำมากรองแล้วทำให้กระดาษกรองขุ่น

ตารางที่ 40 ความสูงพีคและปริมาณของ ethinylestradiol และ levonorgestrel

Sample no.	Peak height (cm) of EE			Peak height (cm) of LNT			Found (µg./tab)		% labelled amount	
	rep.1	rep.2	avg.	rep.1	rep.2	avg.	EE	LNT	EE	LNT
1	2.95	3.10	3.03	2.65	2.80	2.73	30.50	123.89	61.00	99.11
2	2.70	2.60	2.65	2.45	2.35	2.40	27.97	110.90	55.94	88.72
3	3.35	3.40	3.38	2.25	2.30	2.28	35.52	108.54	71.04	86.83
4	3.35	3.50	3.43	2.30	2.35	2.33	35.41	108.18	70.82	86.54
5	4.95	5.00	4.98	2.45	2.55	2.50	51.28	116.10	102.56	92.88
6	4.30	4.30	4.30	2.20	2.25	2.23	44.75	102.14	89.50	81.71
7	4.75	4.85	4.80	2.35	2.35	2.35	49.77	111.14	99.54	88.91
8	4.85	4.80	4.80	2.35	2.35	2.35	49.08	109.59	98.16	87.67
9	4.75	4.85	4.80	2.35	3.45	2.40	49.45	110.42	98.90	88.34
10	5.00	5.00	5.00	2.50	2.50	2.50	50.29	112.79	100.58	90.23

ข้อมูลได้จากผลการทดลองนี้ (ตารางที่ 40)

Mobile phase : ACN/H₂O (60:40, v/v)
 Flow-rate : 2.0 ml/min Pressure 500 psi
 Sensitivity : 0.08 x 10 mV
 Chart speed : 0.25 cm./min
 Injection volume : 10 µl

ตารางที่ 41 ปริมาณของ ethinyloestradiol, mestranol และ lynoestrenol จากการศึกษาครั้งก่อนจำนวน 8 ตัวอย่าง....[H₁]

Sample	Sample weight(g)	Ethinylloestradiol (EE)			Mestranol (MT)			Lynoestrenol(LN)			% labelled amount		
		Peak height (cm)	Found(µg/tab)	avg.	Peak height(cm)	Found(µg/tab)	avg.	Peak height(cm)	Found(µg/tab)	avg.	EE	MT	LN
Gynovlar 21, 1	0.1385	3.15	3.15	51.11	-	-	-	-	-	-	-	-	-
" 2	0.1440	3.20	3.25	50.12	50.86 a/	-	-	-	-	-	101.71	-	-
" 3	0.1406	3.20	3.25	51.33	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Ovulen 50Fe28, 1	0.1415	3.15	3.25	50.24	-	-	-	-	-	-	-	-	-
" 2	0.1481	3.35	3.30	49.89	50.22 a/	-	-	-	-	-	100.44	-	-
" 3	0.1407	3.20	3.10	50.53	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Anovlar 21, 1	0.1433	3.15	3.15	48.19	-	-	-	-	-	-	-	-	-
" 2	0.1404	3.20	3.20	50.15	49.43 a/	-	-	-	-	-	98.85	-	-
" 3	0.1410	3.15	3.20	49.94	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Minilyn , 1	0.1020	3.70	3.70	46.64	-	-	-	-	-	-	-	-	-
" 2	0.1015	3.85	3.85	48.82	48.83 b/	-	-	-	-	-	97.65	-	100.88
" 3	0.1010	3.95	3.95	51.20	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Ovostat 28, 1	0.1000	3.55	3.50	46.18	-	-	-	-	-	-	-	-	-
" 2	0.1019	3.30	3.30	42.37	43.97 b/	-	-	-	-	-	87.94	-	104.46
" 3	0.1019	3.40	3.45	43.35	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Lyndiol 2.5 , 1	0.0988	"	"	"	-	-	1.70	1.75	1.73	76.39	-	-	-
" 2	0.1012	-	-	-	-	-	1.80	1.80	1.80	78.50	75.23	-	100.30
" 3	0.1038	-	-	-	-	-	1.65	1.65	1.65	70.79	-	-	-
Noracyclin 22, 1	0.1014	-	-	-	-	-	1.70	1.50	1.60	71.28	-	-	-
" 2	0.1052	-	-	-	-	-	1.70	1.70	1.70	72.58	72.07	-	102.95
" 3	0.0999	-	-	-	-	-	1.70	1.50	1.60	72.35	-	-	-
Exluton , 1	0.1019	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
" 2	0.0997	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
" 3	0.1006	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

a/, b/ ใช้ตามมาตรฐานและชุด

c/ ส่วนผสมตัวอย่างที่วิเคราะห์ถูกเจือจางลง 10 เท่า

ใช้ตามการทดลองดังนี้

Mobile phase : MeOH/H₂O(85:15,v/v)

Flow-rate : 2.0 ml/min

Sensitivity : 0.08 x 10 mV

Chart speed : 0.5 cm/min

Injection volume : 10 µl

(ตารางที่ 41)

ตารางที่ 42 Peak height ratio ของ synthetic mixture

Steroid in admixture	Peak height (cm)				Peak height ratio w.r.t. P
	rep.1	rep.2	rep.3	avg.	
Ethinylloestradiol (25 ppm)	2.65	2.60	2.60	2.62	1.96
Mestranol (37.5 ppm)	2.30	2.20	2.25	2.25	1.69
Lyncoestrenol (1,250 ppm)	14.80	14.25	14.45	14.50	10.88
Progesterone as I.S. (50 ppm)	1.35	1.30	1.35	1.33	1.00

w.r.t. = with respect to

ตารางที่ 43 ปริมาณของ ethinyloestradiol, mestranol และ lynoestrenol จากการวิเคราะห์ค่ากำเนิด จำนวน 5 ซ้ำ โดย ใช้สูตร (13).....[S₁]

Sample Replicate	Sample weight(g)	Ethinyloestradiol(EE)			Mestranol(MT)			Lyncoestrenol (LN)			Progesterone(P) as I.S.			Peak height ratios					
		Peak height(cm)			Peak height(cm)			Peak height(cm)			Peak Height(cm)			EE/p	MT/p	LN/p			
		rep.1	rep.2	rep.3	avg.	rep.1	rep.2	rep.3	avg.	rep.1	rep.2	rep.3	avg.						
Lyndiol, 1	0.1004	-	-	-	2.45	2.45	2.40	2.40	15.20	14.80	15.00	15.00	1.35	1.30	1.30	1.32	-	1.82	11.40
" 2	0.0993	-	-	-	2.30	2.35	2.30	2.32	15.35	15.20	15.10	15.22	1.35	1.30	1.30	1.32	-	1.76	11.56
" 3	0.1005	-	-	-	2.40	2.35	2.40	2.38	15.80	15.35	15.75	15.63	1.35	1.35	1.35	1.35	-	1.77	11.58
Minilyn, 1	0.1000	2.45	2.45	2.45	2.45	-	-	-	14.85	14.55	14.70	14.70	1.30	1.30	1.30	1.30	1.89	-	11.31
" 2	0.1005	2.55	2.55	2.60	2.57	-	-	-	14.75	14.70	14.90	14.78	1.30	1.30	1.35	1.32	1.95	-	11.23
" 3	0.1012	2.65	2.65	2.70	2.67	-	-	-	15.00	15.05	15.30	15.20	1.30	1.30	1.35	1.32	2.03	-	11.49
Noracyclin, 1	0.0995	-	-	-	1.90	2.00	2.05	1.98	12.85	13.30	13.60	13.25	1.30	1.35	1.40	1.35	-	1.47	9.82
" 2	0.1024	-	-	-	2.20	2.10	2.10	2.13	13.45	13.60	13.75	13.60	1.30	1.30	1.30	1.30	-	1.64	10.46
" 3	0.1015	-	-	-	2.00	2.05	2.05	2.03	13.15	13.40	13.30	13.28	1.30	1.35	1.30	1.32	-	1.55	10.09
Ovostat, 1	0.1000	2.35	2.35	2.40	2.37	-	-	-	6.20	6.10	6.20	6.17	1.35	1.35	1.35	1.35	1.75	-	4.57
" 2	0.1005	2.35	2.35	2.35	2.35	-	-	-	5.40	5.90	6.00	5.93	1.35	1.35	1.35	1.38	1.74	-	4.48
" 3	0.1008	2.40	2.35	2.40	2.38	-	-	-	6.25	6.15	6.20	6.20	1.40	1.35	1.40	1.38	1.72	-	4.48
Exluton, 1	0.0508	-	-	-	-	-	-	-	3.10	3.15	3.15	3.13	1.35	1.35	1.35	1.35	-	-	2.32
" 2	0.0517	-	-	-	-	-	-	-	3.15	3.15	3.20	3.17	1.35	1.40	1.40	1.38	-	-	2.29
" 3	0.0522	-	-	-	-	-	-	-	3.15	3.15	3.10	3.13	1.35	1.35	1.35	1.35	-	-	2.32

ใบสภาวะการทดลองดังนี้

Mobile phase : MeOH/H₂O (85:15,v/v)
 Flow-rate : 2.0 ml/min
 Sensitivity : 0.08 x 10 mV
 Chart speed : 0.25 cm/min
 Injection volume : 5 µl

(ตารางที่ 42-43)

ตารางที่ ๒3 ปริมาณของ ethinyloestradiol, mestranol และ lynoestrenol จากการวิเคราะห์ยาเม็ดคุมกำเนิด จำนวน 5 ชนิด โดย ใช้สูตร (13)....(15) (ต่อ)

Sample	Found			% labelled amount			LN found from cali. curve (a) (mg/tab) avg.
	EE (µg/tab) avg.	MT (µg/tab) avg.	LN (mg/tab) avg.	EE	MT	LN	
Lyndiol, 1	-	80.20	2.59	-	-	-	2.65
" 2	-	78.25	2.66	-	104.88	105.20	2.72
" 3	-	77.53	2.63	-	-	-	2.75
Minilyn, 1	47.61	-	2.58	-	-	-	2.60
" 2	49.00	49.06	2.55	98.12	-	102.80	2.60
" 3	50.56	-	2.59	-	-	-	2.62
Noracyclin, 1	-	70.00	2.31	-	-	-	2.44
" 2	-	72.53	2.39	-	93.96	93.60	2.16
" 3	-	68.89	2.35	-	-	-	2.39
Ovostat, 1	45.83	-	1.05	-	-	-	1.10
" 2	44.32	44.63	1.01	89.26	-	103.00	1.04
" 3	43.74	-	1.03	-	-	-	1.16
Exluton, 1	-	-	0.53	-	-	-	0.55
" 2	-	-	0.51	-	-	-	0.56
" 3	-	-	0.51	-	-	-	0.54

(a) วิเคราะห์ยา lynoestrenol อย่างเดียวโดยเทียบกับกราฟมาตรฐาน

ตารางที่ 44 พื้นที่ใต้พีคและปริมาณของ ethinyloestradiol จากกราฟมาตรฐาน(A)

Sample (a) Replicate	Sample weight (g / tab)	Peak area (cm ²) of EE			Peak area (cm ²) of P			Peak area ratio EE/P	EE found(µg/tab) avg.	labelled amount
		rep.1	rep.2	avg.	rep.1	rep.2	avg.			
Trirordiol White (b) 1	0.0897	0.74	0.72	0.73	0.53	0.53	0.53	1.38	42.19	
" " 2	0.0893	0.73	0.70	0.72	0.53	0.53	0.53	1.36	41.34	105.59
" " 3	0.0898	0.75	0.75	0.75	0.53	0.53	0.53	1.41	43.17	
" Brown 1	0.0899	0.60	0.60	0.60	0.54	0.54	0.54	1.10	30.66	
" " 2	0.0898	0.60	0.60	0.60	0.54	0.53	0.54	1.10	30.69	101.81
" " 3	0.0910	0.60	0.60	0.60	0.54	0.54	0.54	1.10	30.29	
" Yellow 1	0.0903	0.56	0.55	0.56	0.56	0.53	0.53	1.06	30.10	
" " 2	0.0892	0.56	0.56	0.56	0.53	0.53	0.53	1.07	30.47	100.63
" " 3	0.0906	0.57	0.57	0.57	0.53	0.53	0.53	1.09	30.00	
Triquilar White (b) 1	0.0891	0.75	0.75	0.75	0.53	0.53	0.53	1.41	41.72	
" " 2	0.0902	0.75	0.77	0.76	0.51	0.53	0.52	1.45	42.19	101.63
" " 3	0.0907	0.71	0.69	0.70	0.53	0.53	0.53	1.32	38.05	
" Brown 1	0.0907	0.60	0.61	0.60	0.54	0.54	0.54	1.11	30.97	
" " 2	0.0891	0.59	0.60	0.59	0.54	0.54	0.54	1.09	30.51	103.05
" " 3	0.0898	0.61	0.61	0.61	0.54	0.54	0.54	1.12	31.28	
" Yellow 1	0.0897	0.57	0.57	0.57	0.53	0.53	0.53	1.09	29.63	
" " 2	0.0900	0.57	0.57	0.57	0.53	0.54	0.53	1.08	29.53	98.51
" " 3	0.0904	0.57	0.57	0.57	0.53	0.53	0.53	1.09	29.49	
Batterfly 1	0.0709	0.68	0.68	0.68	0.49	0.49	0.49	1.53	45.31	
" 2	0.0706	0.66	0.66	0.66	0.49	0.49	0.49	1.36	42.32	87.00
" 3	0.0697	0.69	0.68	0.68	0.49	0.49	0.49	1.39	42.87	
Ovidon-richter 1	0.1010	0.86	0.86	0.86	0.49	0.49	0.49	1.75	48.86	
" 2	0.0997	0.87	0.87	0.87	0.49	0.49	0.49	1.77	49.50	98.02
" 3	0.1014	0.86	0.87	0.86	0.49	0.49	0.49	1.76	48.67	
Ovral 1	0.0900	0.83	0.83	0.83	0.51	0.51	0.51	1.64	48.20	
" 2	0.0900	0.83	0.84	0.84	0.51	0.51	0.51	1.65	48.20	96.26
" 3	0.0904	0.84	0.83	0.84	0.51	0.51	0.51	1.65	47.99	
Duoluton 1	0.0914	0.90	0.90	0.90	0.51	0.51	0.51	1.77	49.28	
" 2	0.0910	0.90	0.90	0.90	0.49	0.49	0.49	1.84	50.69	99.62
" 3	0.0914	0.90	0.91	0.91	0.49	0.51	0.50	1.82	49.49	
Nordette 1	0.0908	0.55	0.55	0.55	0.49	0.49	0.49	1.13	30.97	
" 2	0.0904	0.55	0.55	0.55	0.49	0.49	0.49	1.13	31.10	102.26
" 3	0.0908	0.53	0.53	0.53	0.49	0.49	0.49	1.08	29.97	
Eugynon-21 1	0.0900	0.89	0.89	0.89	0.51	0.51	0.51	1.75	50.06	
" 2	0.0912	0.90	0.90	0.90	0.51	0.51	0.51	1.77	49.40	99.02
" 3	0.0918	0.90	0.90	0.90	0.51	0.51	0.51	1.77	49.07	
Microgynon-30 1	0.0906	0.53	0.54	0.53	0.51	0.51	0.51	1.05	31.47	
" 2	0.0900	0.53	0.53	0.53	0.51	0.51	0.51	1.04	31.68	106.19
" 3	0.0907	0.53	0.54	0.53	0.49	0.51	0.50	1.07	32.42	
Microgynon-50 1	0.0921	0.93	0.95	0.94	0.51	0.51	0.51	1.85	50.36	
" 2	0.0885	0.90	0.91	0.91	0.51	0.51	0.51	1.78	50.40	101.08
" 3	0.0912	0.93	0.93	0.93	0.51	0.51	0.51	1.84	50.86	
Nordioli-21 1	0.0903	0.87	0.88	0.87	0.51	0.51	0.51	1.72	47.10	
" 2	0.0905	0.89	0.91	0.90	0.51	0.51	0.51	1.77	48.95	96.95
" 3	0.0915	0.91	0.91	0.91	0.51	0.51	0.51	1.80	49.38	
Neogynon-21 1	0.0939	0.90	0.91	0.91	0.51	0.51	0.51	1.78	47.23	
" 2	0.0937	0.92	0.93	0.93	0.51	0.51	0.51	1.83	48.28	95.57
" 3	0.0927	0.90	0.90	0.90	0.51	0.51	0.51	1.77	47.84	

(a), (b) ใช้กราฟมาตรฐานคนละชุด

ข้อมูลการทดลองได้จากสภาวะการทดลองดังนี้

Mobile phase : ACN/H₂O (80:20, v/v)

Flow-rate : 1.5 ml/min

Sensitivity : 0.08 x 10 mV

Chart speed : 1.0 cm/min

Injection volume : 10 µl

(ตารางที่ 44-47)

ตารางที่ 45 พื้นที่ใต้พีคและปริมาณของ levonorgestrel จากกราฟมาตรฐาน.(A)

Sample (a)	Replicate	Peak area (cm ²) of LNT			Peak area ratios LNT/P*	LNT found (µg/tab) avg.	% labelled amount
		rep.1	rep.2	avg.			
		Microgynon-30	1	0.80			
"	2	0.80	0.80	0.80	1.57	138.60	137.94
"	3	0.80	0.80	0.80	1.59	137.53	91.96
Ovidon-richter	1	1.22	1.22	1.22	2.48	214.99	
"	2	1.23	1.22	1.22	2.49	217.79	215.64
"	3	1.22	1.23	1.22	2.49	214.14	86.26
Nordette	1	0.81	0.81	0.81	1.65	149.83	
"	2	0.81	0.81	0.81	1.65	150.50	150.06
"	3	0.80	0.80	0.80	1.62	149.83	100.04
Neogynon	1	1.38	1.40	1.39	2.73	226.71	
"	2	1.40	1.41	1.40	2.76	236.66	230.94
"	3	1.37	1.37	1.37	2.69	229.64	92.38
Nordirol-21	1	1.29	1.31	1.30	2.56	225.67	
"	2	1.34	1.37	1.35	2.66	234.96	231.01
"	3	1.35	1.35	1.35	2.66	232.39	92.40
Microgynon-50	1	0.69	0.71	0.70	1.37	121.06	
"	2	0.68	0.69	0.68	1.35	120.95	121.42
"	3	0.71	0.71	0.71	1.39	122.26	97.14
(b)							
Trinordiol(White)	1	0.41	0.41	0.41	0.76	72.03	
"	2	0.41	0.39	0.40	0.76	72.35	73.82
"	3	0.42	0.42	0.42	0.79	77.09	98.43
Triquilar(Brown)	1	0.29	0.30	0.29	0.54	49.95	
"	2	0.29	0.29	0.29	0.53	50.84	50.41
"	3	0.29	0.29	0.29	0.53	50.45	100.82
Trinordiol(Brown)	1	0.29	0.29	0.29	0.53	49.44	
"	2	0.29	0.29	0.29	0.53	49.50	49.26
"	3	0.29	0.29	0.30	0.55	48.85	98.53
(b)							
Triquilar(White)	1	0.41	0.41	0.41	0.76	69.59	
"	2	0.42	0.42	0.42	0.80	73.59	68.87
"	3	0.38	0.38	0.38	0.72	63.42	91.83
Trinordiol(Yellow)	1	0.69	0.68	0.68	1.30	115.38	
"	2	0.69	0.69	0.69	1.31	116.81	117.40
"	3	0.71	0.71	0.71	1.34	120.00	93.92
Triquilar (Yellow)	1	0.71	0.71	0.71	1.34	118.53	
"	2	0.69	0.71	0.68	1.28	113.21	116.45
"	3	0.71	0.71	0.71	1.34	117.61	93.16

* จากตารางที่ 44

(a) , (b) : ใช้กราฟมาตรฐานคนละชุด

ตารางที่ 46 Peak area ratio ของ synthetic mixture

Mixture no.	Peak area (cm ²) of EE				Peak area (cm ²) of LNT				Peak area (cm ²) of P				Peak area ratio	
	rep.1	rep.2	rep.3	avg.	rep.1	rep.2	rep.3	avg.	rep.1	rep.2	rep.3	avg.	EE/P	LNT/P
1	0.83	0.83	0.83	0.83	2.64	2.64	2.64	2.64	0.47	0.47	0.47	0.47	1.76	5.59
2	0.84	0.84	0.84	0.84	2.69	2.69	2.69	2.69	0.47	0.47	0.47	0.47	1.79	5.68
3	0.84	0.86	0.87	0.86	2.70	2.75	2.75	2.73	0.47	0.49	0.49	0.48	1.79	5.65
	เฉลี่ย			0.84				2.69				0.48	1.77	5.64

ตารางที่ 47 ปริมาณของ ethinylestradiol และ levonorgestrel จากการใช้สูตร (13)... [S₁]

Sample*	Amount of EE found (µg /tab)				Amount of LNT found (µg /tab)			
	rep.1	rep.2	rep.3	avg.	rep.1	rep.2	rep.3	avg.
Trinordiol (Brown)	30.73	30.76	30.36	30.62	46.46	46.52	47.63	46.87
" (Yellow)	30.04	30.70	30.79	30.51	115.63	117.96	118.79	117.46
Triquilar (Brown)	31.32	31.10	31.92	31.52	47.82	47.78	47.40	47.67
" (Yellow)	30.41	30.03	30.18	30.21	117.34	111.71	116.43	115.13
Batterfly	45.54	40.65	42.08	42.76	-	-	-	-
Ovidon-richter	48.11	49.30	48.20	48.54	213.98	217.65	213.99	215.21
Ovral	47.51	47.80	47.59	47.63	-	-	-	-
Duoluton	49.28	50.66	49.89	49.95	-	-	-	-
Nordette	31.89	32.03	30.48	31.46	146.12	146.12	146.76	143.45
Eugynon	49.49	49.40	49.07	49.32	-	-	-	-
Microgynon-30	29.17	29.09	29.69	29.32	136.88	137.79	138.47	137.72
Microgynon-50	50.61	50.68	50.84	50.71	117.63	120.63	120.53	119.59
Nordiol	47.67	48.95	49.24	48.62	222.67	230.87	228.34	227.29
Neogynon	47.50	48.94	47.84	48.09	228.62	231.62	228.19	229.48

* Sample ชุดเดียวกันกับในตารางที่ 45-46

ตารางที่ 48 Peak height ratio ของ synthetic mixture

Peak height (cm) of each steroid		Peak height ratio		
EE (25 ppm)	LNT (250 ppm)	P (50 ppm)	EE/P	LNT/P
4.10	9.60	1.35	3.04	7.11
4.10	9.80	1.40	2.93	7.00
4.15	9.80	1.40	2.96	7.00
avg. 4.12	9.73	1.38	2.976	7.036

ตารางที่ 49 ความสูงทีละปริมาตรของ ethinyloestradiol จากกราฟมาตรฐาน[H₂] และจากการคำนวณโดยสูตร (13) ... [S₂]

Sample	Replicate	Sample weight (g)	Peak height (cm.) of EE			Peak height (cm.) of P			Peak height ratio EE/P	Found from cali. curve (µg/tab) avg.	Found (µg/tab) formula	Avg. amount of EE from cali. curve and formula (µg/tab)	Labelled amount
			rep.1	rep.2	rep.3	avg.	rep.1	rep.2					
Ovidon-Richter	1	0.1004	3.95	4.00	4.00	3.98	1.35	1.35	1.35	1.35	49.15	48.74	98.24
	2	0.1022	4.30	4.35	4.30	4.32	1.40	1.40	1.40	1.40	49.25	50.02	
	3	0.1016	4.20	4.20	4.20	4.20	1.40	1.40	1.40	1.40	48.57	48.67	
Butterfly	1	0.0740	3.55	3.65	3.60	3.60	1.30	1.35	1.35	1.33	45.43	45.81	90.34
	2	0.0731	3.35	3.40	3.40	3.38	1.35	1.35	1.35	1.35	42.92	43.04	
	3	0.0715	3.60	3.60	3.60	3.60	1.35	1.35	1.35	1.35	47.01	46.81	
Nordette	1	0.0927	2.60	2.65	2.65	2.63	1.35	1.40	1.35	1.37	31.31	31.68	104.63
	2	0.0917	2.70	2.70	2.75	2.72	1.45	1.45	1.45	1.87	31.65	31.14	
	3	0.0927	2.50	2.55	2.55	2.53	1.30	1.35	1.35	1.35	31.31	31.23	
Ovral	1	0.0911	4.15	4.15	4.15	4.15	1.40	1.40	1.40	1.40	30.66	50.45	99.36
	2	0.0939	4.10	4.10	4.10	4.10	1.35	1.35	1.35	1.35	49.15	50.16	
	3	0.0913	4.10	4.00	4.05	4.05	1.40	1.40	1.40	1.40	48.53	49.14	
Nordiol-21	1	0.0903	3.85	3.95	3.95	3.92	1.35	1.35	1.35	1.35	47.10	47.82	97.95
	2	0.0914	4.15	4.15	4.15	4.15	1.40	1.40	1.40	1.40	48.47	48.27	
	3	0.0922	4.50	4.55	4.60	4.55	1.40	1.45	1.45	1.43	50.93	51.26	
Microgynon-30	1	0.0927	2.50	2.55	2.50	2.52	1.40	1.40	1.40	1.40	28.84	29.04	95.07
	2	0.1016	2.90	2.95	2.95	2.93	1.50	1.50	1.55	1.52	28.06	28.50	
	3	0.1050	2.90	2.95	3.00	2.95	1.45	1.45	1.50	1.47	29.00	28.69	
Duoluton	1	0.0906	4.15	4.15	4.15	4.15	1.45	1.40	1.40	1.42	47.97	48.20	97.67
	2	0.0933	4.30	4.40	4.40	4.37	1.40	1.40	1.40	1.40	49.44	49.82	
	3	0.0916	4.35	4.40	4.40	4.35	1.45	1.45	1.45	1.45	48.42	49.18	
Eugynon	1	0.0911	4.25	4.25	4.25	4.25	1.40	1.40	1.45	1.42	49.45	49.87	99.79
	2	0.0908	4.75	4.80	4.90	4.82	1.55	1.55	1.65	1.58	49.62	50.75	
	3	0.0913	4.25	4.25	4.25	4.25	1.40	1.40	1.40	1.40	49.34	50.34	
Microgynon 50	1	0.0925	4.30	4.35	4.35	4.33	1.40	1.40	1.40	1.40	50.15	50.14	102.27
	2	0.0900	4.20	4.25	4.30	4.25	1.35	1.35	1.40	1.37	51.54	51.79	
	3	0.0906	4.40	4.40	4.40	4.40	1.40	1.40	1.40	1.40	51.20	51.99	
Neogynon	1	0.0913	4.20	4.20	4.25	4.22	1.45	1.45	1.50	1.47	46.63	46.94	95.11
	2	0.0905	4.35	4.45	4.45	4.42	1.45	1.50	1.45	1.47	49.01	49.60	
	3	0.0897	4.35	4.40	4.45	4.40	1.55	1.55	1.60	1.57	46.48	46.67	

ตารางที่ 50 ความสูงพีคและปริมาตรของ levonorgestrel จากกราฟมาตรฐาน ...[H₂] และจากการคำนวณโดยสูตร (13)... [S₂]

Sample	Peak height (cm)			Peak height ratios LNT/P**	Found (µg/tab) from cali.curve avg.	Found (µg/tab) from formula avg.	Avg. amount of LNT from cali. and formula	%labelled amount	
	rep.1	rep.2	rep.3						
Ovidon-richter	1	3.95	4.00	3.95	3.97	2.94	199.07	205.25	82.31
	2	4.25	4.30	4.25	4.27	3.05	207.64	209.18	205.77
	3	4.15	4.15	4.15	4.15	2.96	208.86	204.62	206.35
Nordette	1	2.70	2.80	2.80	2.77	2.03	136.98	140.80	91.80
	2	2.85	2.80	2.85	2.83	1.95	138.47	137.35	137.71
	3	2.60	2.65	2.65	2.63	1.95	156.98	135.65	137.43
Nordiol-21	1	4.20	4.20	4.30	4.23	3.14	210.95	218.65	86.41
	2	4.45	4.45	4.45	4.45	3.18	213.26	218.99	216.02
	3	4.75	4.80	4.80	4.78	3.34	221.02	227.95	216.97
Microgynon-30	1	2.70	2.70	2.75	2.72	1.94	129.76	132.58	86.43
	2	3.15	3.20	3.15	3.17	2.09	127.16	130.12	129.64
	3	3.15	3.20	3.20	3.18	2.17	127.29	130.92	131.21
Microgynon-50	1	2.25	2.30	2.30	2.38	1.63	106.08	111.77	88.70
	2	2.20	2.25	2.25	2.23	1.64	109.02	115.16	110.88
	3	2.30	2.30	2.30	2.30	1.64	108.30	114.95	113.96
Neogynon	1	4.55	4.55	4.60	4.57	3.11	208.88	214.99	218.46
	2	4.75	4.85	4.85	4.82	3.29	220.53	228.80	214.38
	3	4.65	4.70	4.80	4.72	3.01	202.72	211.59	214.38

P** = จากตารางที่ 49
ใช้สำหรับการทดลองครั้งนี้

Mobile phase : ACN/H₂O (60:40 v/v)

Flow-rate : 2.0 ml/min

Sensitivity : 0.08 x 10 mV

Chart speed : 0.25 cm/min

Injection volume : 10 µl

(ตารางที่ 48-50)

ตารางที่ 51 ปริมาณของ ethinyloestradiol, mestranol และ lynoestrenol
โดยวิธี standard addition จำนวน 16 ตัวอย่าง

Sample	Sample weight (g/tab)	Found (µg/tab)	% labelled amount
Microgynon-30 ED	0.0910	31.84	106.13
Ovidon-richter	0.0910	51.31	102.62
Duoluton	0.0926	52.68	105.37
Batterfly	0.0755	39.58	79.15
Eugynon	0.0942	50.22	100.43
Ovral	0.0923	50.00	100.00
Nordette	0.0914	29.71	99.23
Nordiol	0.0900	49.22	98.44
Microgynon-50 ED	0.0882	50.57	101.13
Neogynon	0.0891	49.78	99.55
Trinordiol (white)	0.0697	39.73	99.32
Trinordiol (Brown)	0.0916	29.12	97.05
Trinordiol (Yellow)	0.0910	29.87	99.56
Triquilar (white)	0.0647	41.04	102.59
Triquilar (Brown)	0.0944	28.78	95.94
Triquilar (Yellow)	0.0901	29.50	98.34
Noracyclin 22	0.1052	70.16 (MT)	93.55
Lyndiol 2.5	0.0928	75.38 (MT)	100.51
Ovostat 28	0.1019	995.13 (LN)	99.51
Exluton	0.1019	504.96 (LN)	100.99

หมายเหตุ : (MT) = ปริมาณของ mestranol

(LN) = ปริมาณของ lynoestrenol

ตารางที่ 52 Standard addition ของการหาปริมาณ ethinyloestradiol (EE) ในตัวอย่างยา Ovidon-richter

Standard sol. added (ppm)	Peak height (cm)			Conc. of EE read (ppm)	Conc. of EE found (ppm)	% recovery
	rep.1	rep.2	avg.			
5	2.45	2.50	2.48	10.50	5.75	115.00
10	3.85	3.85	3.85	14.50	9.75	97.50
15	5.25	5.25	5.25	19.50	14.75	98.33
20	6.50	6.65	6.58	24.50	19.75	98.75
(กราฟรูปที่ 41)					ค่าเฉลี่ย	102.40

x - intercept = 4.75 ppm
 y - intercept = 1.25 cm
 EE = 51.31 µg/tab

ตารางที่ 53 Standard addition ในการหาปริมาณของ mestranol (MT) ในตัวอย่างยา Lyndiol 2.5

Std. sol. added (ppm.)	Peak height (cm)			Conc. read (ppm)	Conc. found (ppm)	% recovery
	rep.1	rep.2	avg.			
5	0.55	0.60	0.58	12.75	5.25	105.00
10	0.80	0.80	0.80	17.75	10.25	102.50
15	1.05	1.05	1.05	22.25	14.75	98.33
20	1.25	1.25	1.25	27.50	20.00	100.00
(กราฟรูปที่ 42)					ค่าเฉลี่ย	101.46

x - intercept = 7.5 ppm
 y - intercept = 0.35 cm
 MT = 75.38 µg/tab

ตารางที่ 54 Standard addition ของการหาปริมาณ lynoestrenol (LN) ในตัวอย่างยา Exluton

Std. Sol. added (ppm)	Peak height (cm.)			Conc. read (ppm)	Conc. found (ppm.)	% recovery
	rep.1	rep.2	avg.			
25	2.20	2.15	2.18	127.50	25.00	100.00
50	2.55	2.55	2.55	152.50	50.00	100.00
75	3.10	3.15	3.13	182.50	80.00	106.67
100	3.25	3.35	3.30	195.00	92.50	92.50
(กราฟรูปที่ 43)					ค่าเฉลี่ย	99.79

x - intercept = 102.50 ppm
 y - intercept = 1.75 cm
 LN = 504.96 µg/tab

ตารางที่ 55 standard curve ของสารประกอบที่ศึกษา

Compound	Range (ug injected)	Curve	Correlation coefficient(r)
Ethinylestradiol	0.05-0.50	y=21.248x - 0.066	0.9993
Mestranol ^{a/}	0.025-0.50	y=11.083x + 0.082	0.9998
Lynoestrenol	0.5-12.5	y=0.992 x + 0.198	0.9996
Levonorgestrel	0.05-1.25	y=7.605x - 0.391	0.9993

^{a/} ได้จากข้อมูลในตารางที่ 26

ตารางที่ 56 ปริมาณต่ำสุดของสารประกอบสตรีรอยคฮอร์โมน (2 × baseline)

Compound	Limit of detection (ng)
Ethinylestradiol *	2.0
Levonorgestrel *	5.0
Mestranol **	5.0
Lynoestrenol **	10.0

* ใช้ Acetonitrile/water (80:20, v/v) เป็น mobile phase

** ใช้ Methanol/water (85:15, v/v) เป็น mobile phase

ตารางที่ 57 Recovery ของสตรีรอยคฮอร์โมนจาก synthetic sample

Compound	Assay result			recovery		
	\bar{x} (ug/tab)	S D	RSD	\bar{x} (%)	S D	RSD
Mestranol ^{a/}	48.55	0.72	1.48	97.09	1.44	1.48
Lynoestrenol ^{a/}	49.15	1.46	2.98	98.29	2.93	2.98
Ethinylestra- diol ^{b/}	48.99 (49.09)	1.08 (1.13)	2.21 (2.29)	97.78 (98.13)	2.15 (2.38)	2.21 (2.42) ^{c/}
Levonorgestrel ^{b/}	49.23 (49.58)	2.04 (0.38)	4.14 (0.77)	98.46 (99.17)	4.08 (0.83)	4.14 (0.84) ^{c/}

^{a/} ได้จากข้อมูลในตารางที่ 31

^{b/} ได้จากข้อมูลในตารางที่ 37

^{c/} เลขในวงเล็บได้จากข้อมูลในตารางที่ 38

ตารางที่ 58 Percentage recovery ของ ethinyloestradiol mestranol และ lynoestrenol โดยวิธี standard addition

Sample trade name	% recovery of		
	Ethinyloestradiol	Mestranol	Lynoestrenol
Microgynon-30 ED	99.69	-	-
Microgynon-50 ED	101.98	-	-
Ovidon-richter	102.40	-	-
Duoluton	100.00	-	-
Batterfly	106.04	-	-
Eugynon	103.13	-	-
Ovral	101.46	-	-
Nordiol	99.17	-	-
Neogynon	100.00	-	-
Trinordiol (White)	104.06	-	-
Trinordiol (Brown)	106.36	-	-
Trinordiol (Yellow)	110.00	-	-
Triquilar (White)	105.63	-	-
Triquilar (Brown)	107.50	-	-
Triquilar (Yellow)	108.13	-	-
Noracyclin 22	-	101.77	-
Lyndiol 2.5	-	101.46	-
Ovostat 28	-	-	102.08
Exluton	-	-	97.79
Average	103.66	101.62	100.94

ลิขสิทธิ์ © by Chiang Mai University
All rights reserved

ตารางที่ 59 ปริมาณของ ethinyloestradiol ในตัวอย่างยาเม็ดคุมกำเนิด จำนวน 17 ชนิด

No.	Sample	Amount of EE found (µg/tab.)					avg.	% labelled amount
		H ₁	A	H ₂	S ₁	S ₂		
1	Gynovlar 21	50.86	-	-	-	-	50.86	101.72
2	Ovulen 50 Fe 28	50.22	-	-	-	-	50.22	100.44
3	Anovlar 21	49.43	-	-	-	-	49.43	98.86
4	Minilyn	48.83	-	-	-	49.06	48.95	87.89
5	Ovostat 28	43.97	-	-	-	44.63	44.30	88.60
6	Batterfly	-	43.50	45.12	42.76	45.22	44.15	88.30
7	Ovidon-richter	-	49.01	48.99	48.54	49.24	48.95	97.90
8	Ovral	-	48.13	49.44	47.63	49.92	48.78	97.56
9	Duoluton	-	49.81	48.61	49.95	49.07	49.36	98.72
10	Nordette	-	30.68	31.42	31.46	31.35	31.23	104.10
11	Eugynon-21	-	49.51	49.47	49.32	50.32	49.66	99.32
12	Microgynon-30 ED	-	31.86	28.30	29.32	28.74	29.56	98.53
13	Microgynon-50 ED	-	50.54	50.96	50.71	51.31	50.88	101.76
14	Nordioli-21	-	48.48	48.83	48.62	49.12	48.76	97.52
15	Neogynon-21	-	47.78	47.57	48.09	47.74	47.75	95.50
16	Trinordioli(White)	-	43.23	-	-	-	43.23	105.58
	" (Brown)	-	30.45	-	30.62	-	30.58	101.93
	" (Yellow)	-	30.19	-	30.51	-	30.35	101.17
17	Triquilar(White)	-	40.65	-	-	-	40.65	101.63
	" (Brown)	-	30.92	-	31.52	-	31.22	104.07
	" (Yellow)	-	29.55	-	30.21	-	29.88	99.60

H₁ จากตารางที่ 41
H₂ จากตารางที่ 49
A จากตารางที่ 44
S₁ จากตารางที่ 47
S₂ จากตารางที่ 43 และ 49

ตารางที่ 60 ปริมาณของ mestranol ในตัวอย่างยาเม็ดคุมกำเนิดจำนวน 2 ชนิด

No.	Sample	Amount of MT(µg./tab.)			% labelled amount
		H ₁	S ₂	avg.	
1	Lyndiol 2.5	75.23	78.66	76.95	102.60
2	Noracyclin 22	72.07	70.47	71.27	95.03

H₁ ข้อมูลจากตารางที่ 41
S₂ ข้อมูลจากตารางที่ 43

ตารางที่ 61 ปริมาณของ lynoestrenol ในตัวอย่างยาเม็ดคุมกำเนิดจำนวน 5 ชนิด

No.	Sample	Amount of LN found (mg /tab)				% labelled amount
		H ₁	(a)	S ₂	avg.	
1	Exluton	0.51	0.55	0.52	0.53	106.00
2	Ovostat 28	1.05	1.10	1.03	1.06	106.00
3	Minilyn	2.52	2.61	2.57	2.57	102.80
4	Lyndiol 2.5	2.62	2.71	2.63	2.65	106.00
5	Noracyclin 22	2.57	2.53	2.34	2.48	99.20

H₁ ค่าเฉลี่ยจากตารางที่ 41

(a) และ S₂ ค่าเฉลี่ยจากตารางที่ 43

ตารางที่ 62 ปริมาณของ levonorgestrel ในตัวอย่างยาเม็ดคุมกำเนิดจำนวน 8 ชนิด

No.	Sample	Amount of LNT found (µg/tab)					% labelled amount
		S ₁	A	H ₂	S ₂	avg.	
1	Neogynon	229.48	230.94	210.71	218.46	222.40	88.96
2	Nordiol	227.29	231.01	215.08	216.59	222.59	89.04
3	Microgynon-50 ED	119.59	121.42	107.80	113.96	115.69	92.55
4	Microgynon-30 ED	137.72	137.94	128.07	131.21	133.74	89.16
5	Nordette	145.45	150.06	137.48	137.93	143.73	95.82
6	Ovidon-richter	215.21	215.64	205.19	206.35	210.60	84.24
7	Trinordiol (white)	-	73.82	-	-	73.82	98.43
8	" (Brown)	46.87	49.26	-	-	48.07	96.14
9	" (Yellow)	117.46	117.40	-	-	117.43	93.94
10	Triquilar (white)	-	68.85	-	-	68.85	91.80
11	" (Brown)	47.67	50.41	-	-	49.04	96.08
12	" (Yellow)	115.13	116.45	-	-	115.79	92.63

S₁ = จากตารางที่ 47

A = จากตารางที่ 45

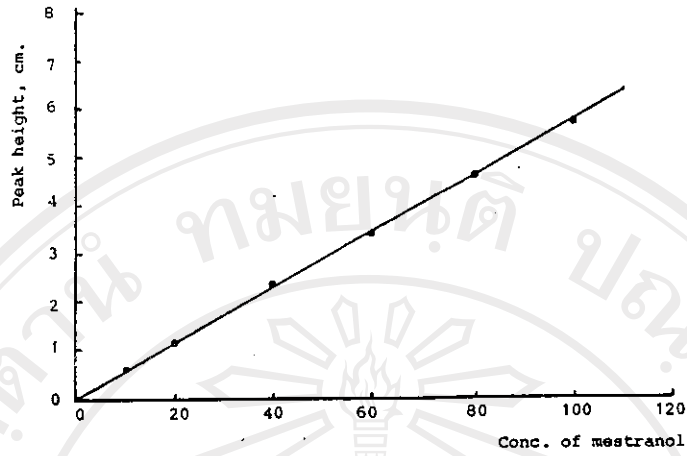
H₂ และ S₂ จากตารางที่ 50

ตารางที่ 63 ปริมาณเฉลี่ยของ ethinyloestradiol, mestranol, lynoestrenol และ levonorgestrel ในตัวอย่างยาเม็ดคุมกำเนิด จำนวน 20 ชนิด

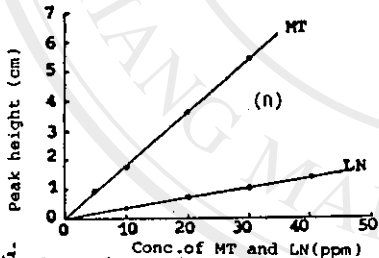
No.	Sample	Amount of steroid hormones per tablet			
		ethinyloestradiol ^(a) (µg)	mestranol ^(b) (µg)	lynoestrenol ^(c) (mg)	levonorgestrel ^(d) (µg)
1	Gynovlar 21	50.86(101.72)	-	-	-
2	Ovulen 50 Fe 28	50.22(100.44)	-	-	-
3	Anovlar 21	44.43(98.86)	-	-	-
4	Minilyn	48.95(97.89)	-	2.57(102.30)	-
5	Ovostat 28	44.30(88.60)	-	1.06(106.00)	-
6	Batterfly	44.15(88.30)	-	-	-
7	Ovidon-richter	48.95(97.90)	-	-	210.60(84.24)
8	Ovral	48.78(96.56)	-	-	-
9	Duoluton	49.36(98.72)	-	-	-
10	Nordette	31.23(104.10)	-	-	143.73(95.82)
11	Eugynon-21	49.66(99.32)	-	-	-
12	Microgynon-30 ED	29.56(98.53)	-	-	133.74(89.16)
13	Microgynon-50 ED	50.88(101.76)	-	-	115.69(92.55)
14	Nordiol-21	48.76(97.52)	-	-	222.50(89.04)
15	Neogynon-21	47.75(95.50)	-	-	222.40(88.96)
16	Trinordiol(white)	42.23(105.56)	-	-	73.82(98.43)
	" (brown)	30.58(101.93)	-	-	48.07(96.14)
	" (Yellow)	30.35(101.17)	-	-	117.43(93.94)
17	Triquilar(white)	40.65(101.63)	-	-	68.85(91.80)
	" (brown)	31.22(104.07)	-	-	49.04(98.08)
	" (Yellow)	29.88(99.60)	-	-	115.79(92.63)
18	Lyndiol 2.5	-	76.95(102.60)	2.65(106.90)	-
19	Noracyclin 22	-	71.27(95.03)	2.48(99.20)	-
20	Exluton	-	-	0.53(106.00)	-

หมายเหตุ เลขในวงเล็บคือ % labelled amount

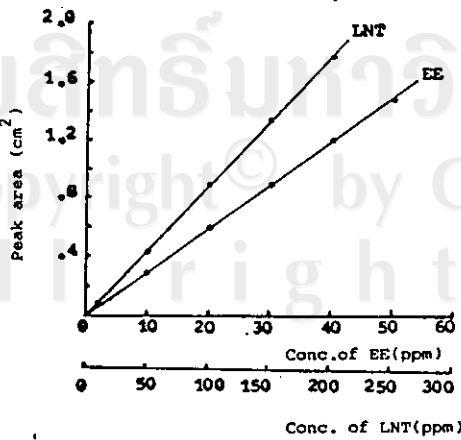
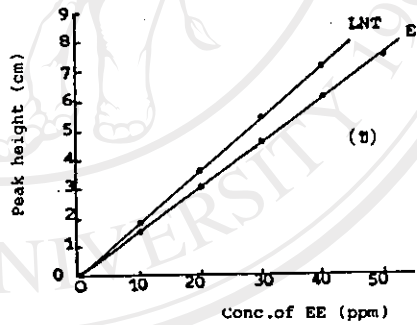
- (a) จากตารางที่ 59
- (b) จากตารางที่ 60
- (c) จากตารางที่ 61
- (d) จากตารางที่ 62



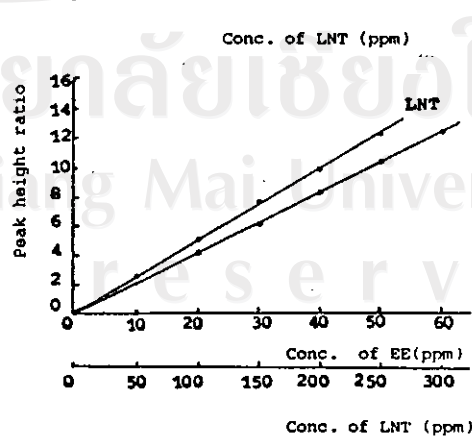
รูปที่ 35 กราฟมาตรฐานของสารละลาย mestranol



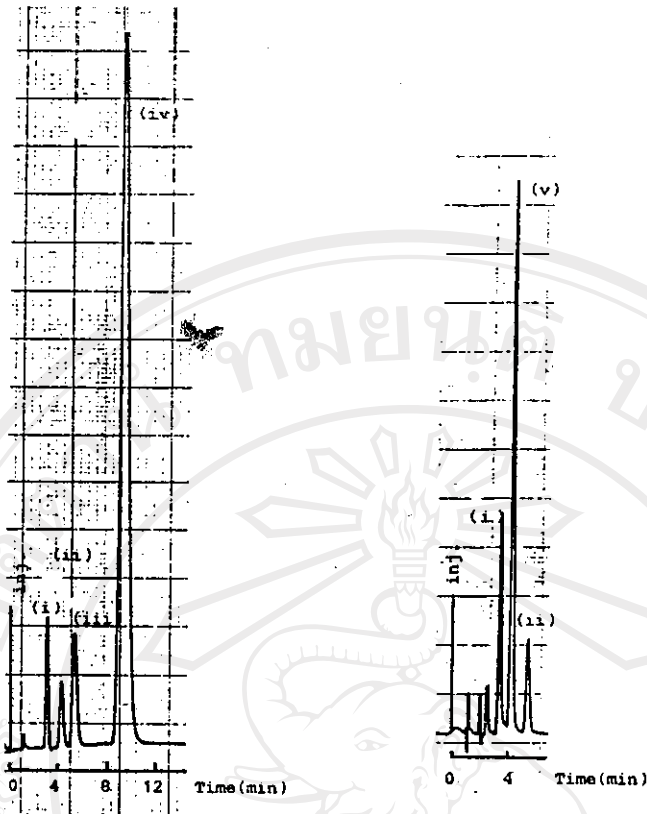
รูปที่ 36 กราฟมาตรฐานของสารละลาย: (ก) mestranol (MT) และ lynoestrenol (LN) และ (ข) ethinyloestradiol (EE) และ levonorgestrel (LNT)



รูปที่ 37 กราฟมาตรฐานของสารละลาย ethinyloestradiol และ levonorgestrel



รูปที่ 38 กราฟมาตรฐานของสารละลาย ethinyloestradiol และ levonorgestrel



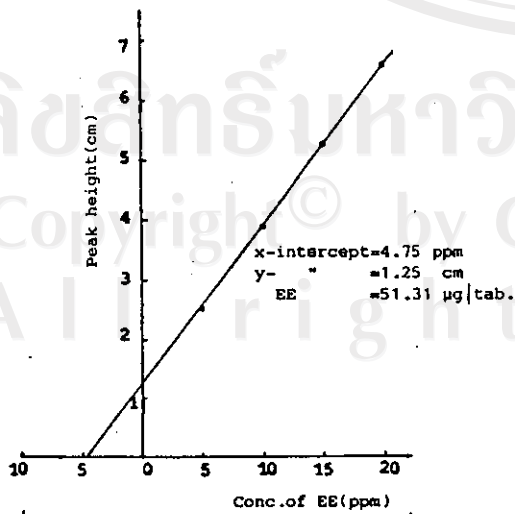
รูปที่ 39 โครมาโตแกรมของ synthetic sample ประกอบด้วย
 (i) =ethinyloestradiol (25 ppm)
 (ii) =progesterone as I.S.(50 ppm)
 (iii)=mestranol(37.5 ppm)
 (iv) =lynoestrenol (1,250 ppm)

ใช้ $CH_3OH/H_2O(85:15, v/v)$ เป็น mobile phase ที่ flow-rate 2.0 ml/min

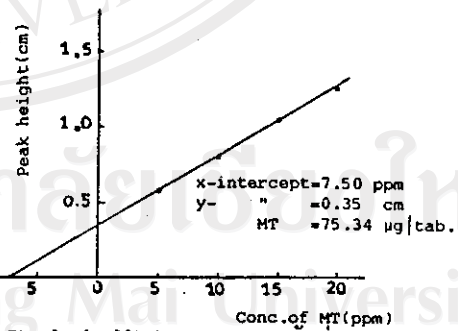
รูปที่ 40 โครมาโตแกรมของ synthetic sample ประกอบด้วย
 (i) =ethinyloestradiol (25 ppm)
 (ii) =progesterone as I.S.(50 ppm)

(v) =levonorgestrel (250 ppm)

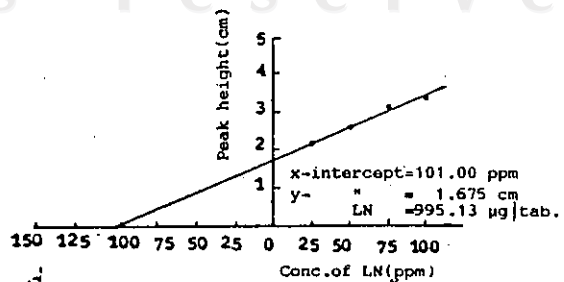
ใช้ $CH_3CN/H_2O(80:20, v/v)$ เป็น mobile phase ที่ flow-rate 1.5 ml/min



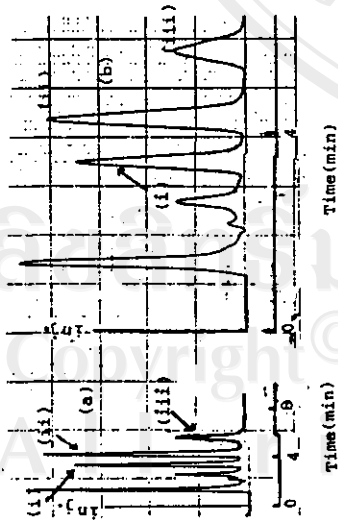
รูปที่ 41 Standard addition curve ของตัวอย่างยา Ovidon-richter



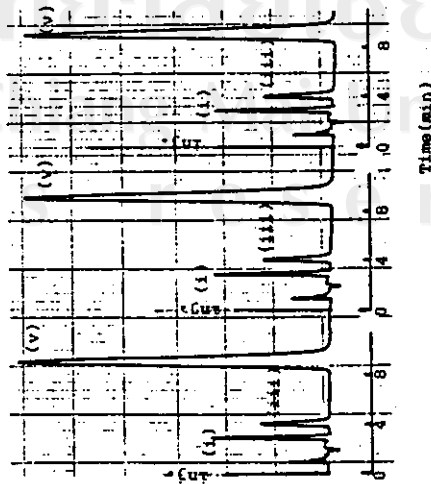
รูปที่ 42 Standard addition curve ของตัวอย่างยา Lyndiol 2.5



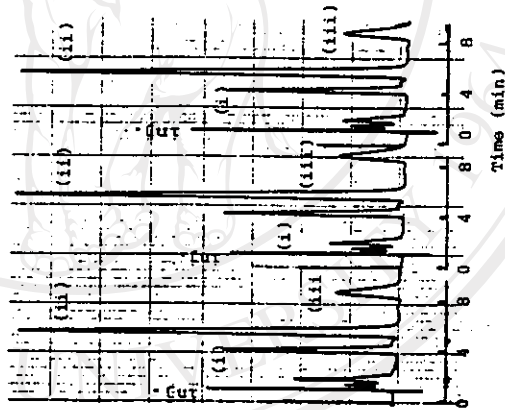
รูปที่ 43 Standard addition curve ของตัวอย่างยา Ovostat



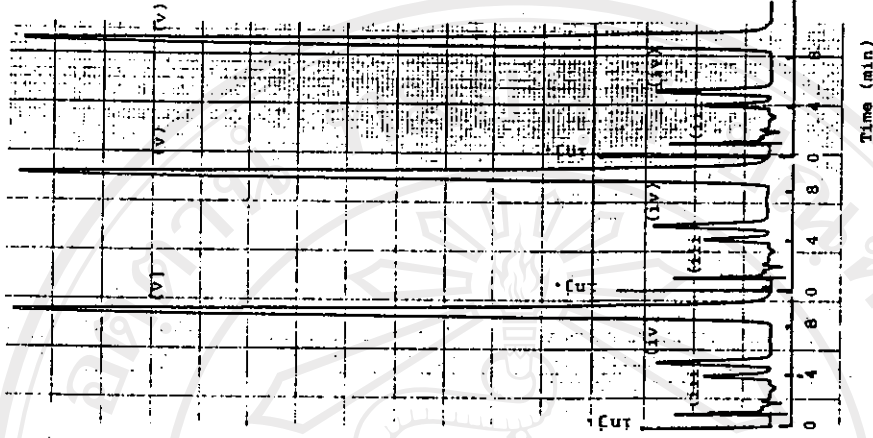
รูปที่ 44 โครมาโทแกรมของสารผสม ethinyloestradiol (i), levonorgestrel (ii) และ progesterone (iii) as I.S. สกัดจากตัวบ่งชี้ยา Norgynon 21 โดยใช้ $\text{CH}_3\text{CN}/\text{H}_2\text{O}$ (80:20, v/v) เป็น mobile phase และใช้ chart speed: (a) 0.25 cm/min และ (b) 1.0 cm/min



รูปที่ 46 โครมาโทแกรมของสารผสม ethinyloestradiol (i), progesterone (ii) as I.S. และ lyoestrenol (v) สกัดจากตัวบ่งชี้ยา Ovostat โดยใช้ $\text{CH}_3\text{OH}/\text{H}_2\text{O}$ (85:15, v/v) เป็น mobile phase



รูปที่ 47 โครมาโทแกรมของสารผสม ethinyloestradiol (i), levonorgestrel (ii) และ progesterone (iii) as I.S. สกัดจากตัวบ่งชี้ยา Butterfly โดยใช้ $\text{CH}_3\text{CN}/\text{H}_2\text{O}$ (60:40, v/v) เป็น mobile phase



รูปที่ 45 โครมาโทแกรมของสารผสม mestranol (iv), progesterone as I.S. (iii) และ lyoestrenol (v) สกัดจากตัวบ่งชี้ยา Lyndiol 2.5 โดยใช้ $\text{CH}_3\text{OH}/\text{H}_2\text{O}$ (85:15, v/v) เป็น mobile phase