บทที่ 5

สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ

5.1 สรุปผลการทดลอง

ในงานวิจัยนี้ได้วิเคราะห์หาปริมาณสตีรอยด์ฮอร์โมนบางชนิดในตัวอย่างยาเม็ดคุมกำเนิด โดยวิธี HPLC เริ่มจากการตรวจเอกสารเกี่ยวกับงานวิเคราะห์ด้านนี้ และทดลองใช้เครื่องมือ HPLC เช่น การเริ่มใช้เครื่องปั๊ม การเปลี่ยนคอลัมน์ หรือการ์ดคอลัมน์ เป็นต้น ได้เลือกใช้ระบบ HPLC แบบ reversed-phase เนื่องจากอนุภาคที่ใช้บรรจุคอลัมน์ประเภทนี้มีความสามารถในการแยกสารได้ดี ทำให้เครื่องมือ HPLC มีประสิทธิภาพสูง[68] และพบว่ามีการใช้ reversed-phase HPLC วิเคราะห์สารตัวอย่างกันอย่างแพร่หลาย คือมีประมาณ 80% ของเทคนิค HPLC[69] มีผู้รายงานไว้ว่าตัวทำละลายที่ใช้ในระบบ RP-HPLC มีผลต่อมลภาวะสิ่งแวดล้อมน้อยกว่า และราคาถูกว่าตัวทำละลายที่ใช้ในระบบ normal phase ทำให้ระบบแยกสารได้ง่าย และสะดวกต่อการใช้งาน[45] การวิเคราะห์โดยใช้วิธีโครมาโตกราฟีของเหลว มีจุดประสงค์หลักคือ สามารถแยกสารที่ต้องการออกจากสารตัวอย่างได้ดีและมากชนิด ใช้เวลาวิเคราะห์สั้นที่สุด และใช้ปริมาณตัวทำละลายน้อยที่สุด นั่นคือ ควรจะประหยัดค่าใช้จ่ายให้มากที่สุด[47]

ได้ศึกษาพฤติกรรมการแยกสตีรอยด์ฮอร์โมนทั้งหมด 13 ชนิด ในคอลัมน์นี้แบบ Radial-Pak μ Bondapak C_{18} (10 cm. x 8 mm.,i.d., 10 μm) และตรวจสอบสารที่แยกได้ด้วยเครื่องตรวจวัดแบบอุลตราไวโอเลท สเปคโตรโฟโตมิเตอร์ ที่ความยาวคลื่น 213 นาโนเมตร ได้สภาวะที่เหมาะสมในการแยกสตีรอยด์ฮอร์โมนที่เป็นตัวยาสำคัญในตัวอย่างยาเม็ดคุมกำเนิด 3 ระบบ คือ (1) ใช้ MeOH/H_2O (85:15,v/v)ที่อัตราการไหลเท่ากับ 2.0 มล.ต่อนาที แยกสารผสมของ ethinyloestradiol (t_r = 3.0 นาที), progesterone as I.S. (t_r = 4.2 นาที), mestranol (t_r = 5.4 นาที) และ lynoestrenol (t_r = 9.6 นาที) (2) ใช้ ACN/H_2O (60:40, v/v) ที่อัตราการไหลเท่ากับ 2.0 มล.ต่อนาที แยกสารผสมของ ethinyloestradiol (t_r = 4.4 นาที), levonorgestrel (t_r = 6.0 นาที) และ progesterone as I.S. (t_r = 9.2 นาที) และ (3) ใช้ ACN/H_2O (80:20, v/v) ที่อัตราการไหลเท่ากับ 1.5 มล.ต่อนาที

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

แยกสารผสมของ ethinyloestradiol (t_r = 3.4 นาที), levonorgestrel (t_r = 4.2 นาที) และ progesterone as I.S. (t_r = 5.6 นาที) นอกจากนี้ได้ศึกษาพฤติกรรมการแยกสารผสมของ levonorgestrel กับ norethynodrel และสามารถแยกสารทั้งสองนี้ออกจากกันได้ โดยใช้ ternary solvent ของระบบ MeOH/H_2O (54:46, v/v) + di-isopropyl ether (95:5, v/v) ที่อัตราการไหลเท่ากับ 2.0 มล.ต่อนาที

จากอิทธิพลของ mobile phase ที่มีต่อการแยกสตีรอยด์ฮอร์โมนในระบบ reversed-phase HPLC พบว่า สตีรอยด์ฮอร์โมนแสดงพฤติกรรมการแยกตามสภาพขั้วของโครงสร้างโมเลกุลซึ่งต่างกันทั้งชนิดและจำนวน functional group มีการจัดสภาพขั้วของ functional group บางชนิดของสตีรอยด์เรียงตามลำดับจากน้อยไปหามาก ดังนี้:- OCH_3 < -COOR < -C = O < - OH[40] ได้ศึกษาพฤติกรรมการแยกสตีรอยด์ฮอร์โมนที่มีโครงสร้างคล้ายๆกัน โดยใช้อีเทอร์ชนิดต่างๆ เป็น organic modifier ในระบบ binary solvent ของ MeOH/H_2O (v/v) และพบว่าไดไอโซโปรพิล อีเทอร์เป็น organic modifier ที่ทำให้ระบบการแยกมีความจำเพาะเพิ่มขึ้น และลดค่า capacity factor ลงอย่างเห็นได้ชัด สอดคล้องตามรายงานของ Lee et al.[50] และ McCormick และ Karger[53] อย่างไรก็ตาม การแยกสตีรอยด์ฮอร์โมนที่จะหาปริมาณในตัวอย่างยาเม็ดคุมกำเนิด ที่ศึกษาในงานวิจัยนี้ยังไม่จำเป็นต้องใช้ระบบ ternary solvent ดังกล่าว แต่มีรายงานของ Gluck และ Shek[21] ใช้ส่วนผสมของ H_2O/ACN/THF (50;30:20,v/v/v) แยก norethisterone, ethinyloestradiol และ mestranol และ Bond et al.[45] ใช้ส่วนผสมของ MeOH/H_2O/THF (60:30:10, v/v/v) แยก norethisterone ออกจาก ethinyloestradiol ได้เช่นเดียวกัน

ได้ทดลองเปลี่ยนแปลงอัตราการไหลของระบบ mobile phase ที่ใช้แยกสารผสมดังกล่าว พบว่า คอลัมน์ที่ใช้นี้มีค่าจำนวนแผ่นทางทฤษฎีประมาณ 1,000 แผ่น ที่ช่วงอัตราการไหลระหว่าง 0.5-1.0 มล.ต่อนาที เมื่อเปรียบเทียบกับคอลัมน์ประเภท Stainless steel ซึ่งมีขนาดยาวกว่าปกติแล้วยาว 25-30 ซม. เส้นผ่าศูนย์กลางภายในประมาณ 3-4 มม.[3] เนื่องจากคอลัมน์ที่ใช้เป็นแบบ Radial-Pak มีขนาดสั้นกว่า (ยาว 10 ซม.) และมีเส้นผ่าศูนย์กลางภายในยาวกว่า (8 มม.) ทำให้จำนวนแผ่นทางทฤษฎีต่อความยาวคอลัมน์มีค่าน้อย

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

กว่า และพบว่ามีการเปลี่ยนแปลงค่า HETP อย่างชัดเจนที่ช่วงอัตราการไหล 1.5-2.0 มล.ต่อนาที โดยทั่วไปแล้ว ทั้งอัตราการไหล และการเลือกใช้ความยาวคลื่นแสง UV หรือผลของ pH ก็ตามสามารถเลือกใช้จากเอกสารอ้างอิงได้ อย่างไรก็ตามถ้าหากสตีรอยด์-ฮอร์โมนที่อยู่ในรูปของเกลือหรือมี functional group ที่สามารถแตกตัวได้อาจต้องศึกษาผลของ pH หรือ ionic strength ของ mobile phase(46)

จากการหาค่า reproducibility ของเครื่องมือวิเคราะห์ (ตารางที่ 27) โดยการฉีดสารละลายมาตรฐานฮอร์โมน mestranol เข้มข้น 50 ppm จำนวน 11 ครั้ง ได้ค่าเฉลี่ย ($\bar{x}$) เท่ากับ 50.69 ppm ค่าความเบี่ยงเบนมาตรฐาน (SD) เท่ากับ 0.48 และค่าความเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ (RSD) เท่ากับ 0.95%

ได้ตรวจสอบสมรรถนะของคอลัมน์ เพื่อศึกษาประสิทธิภาพของคอลัมน์ โดยพิจารณาจากจำนวนแผ่นทางทฤษฎี (N) และ peak asymmetry (S) ตามวิธีของ Knox และ Vasvari(69) ในที่นี้ได้ทดลองแยกสารผสมของ ethinyloestradiol (25 ppm), levonorgestrel (250 ppm) และ progesterone (50 ppm) โดยใช้ ACN/H_2O (80:20, v/v) เป็น mobile phase ที่อัตราการไหลเท่ากับ 1.5 มล.ต่อนาที เพิ่มค่าความเร็วกระดาษของเครื่องบันทึกสัญญาณเท่ากับ 2.5 ซม.ต่อนาที เพื่อความสะดวกในการวัดความกว้างของพีคและคำนวณค่า N และค่า S จากพีคของ progesterone ซึ่งแยกออกหลังสุด ได้ค่า N ประมาณ 943 แผ่น (t_r = 340.8 วินาที, และ W_t = 44.4 วินาที) และค่า S = 1.31 ($S = \frac{a}{b}$ เมื่อ a = 1.05 ซม. และ b = 0.8 ซม. ดังโครมาโตแกรมในรูปที่ 48) จำนวนแผ่นทางทฤษฎีของคอลัมน์ที่ใช้จะแสดงถึง band broadening ในระหว่างที่สารเคลื่อนที่ผ่านอนุภาคที่บรรจุคอลัมน์ ค่า N จะขึ้นอยู่กับความหนืดของ mobile phase, อัตราการไหล, อุณหภูมิ และตัวแปรอื่นๆ ของคุณสมบัติของสารที่จะแยก(21) เนื่องจากการวัดความกว้างของพีค และ retention time ใช้วิธีวัดโดยใช้ไม้วัดมาตรฐาน อาจทำให้ค่า N หรือ HETP ที่ได้มีค่าเปลี่ยนแปลงไปบ้างพอสมควร เพราะว่าค่า N จะไวมากต่อวิธีการวัด(51) ถ้าใช้เครื่องอินติเกรเตอร์บันทึกผลอาจช่วยเพิ่มความแม่นยำได้มากขึ้น ส่วนค่า S นั้นจะบ่งบอกถึงประสิทธิภาพของคอลัมน์นี้ในเทอมของความสมมาตรของพีคที่แยกได้ว่ามี tailing มากน้อยแค่ไหน เป็นการบ่งบอกถึงความเสื่อมของอนุภาคที่บรรจุคอลัมน์ปกติแล้วคอลัมน์ที่ดีจะให้พีคที่มีความสมมาตรสูง อย่างไรก็ตามพีคที่ได้จากระบบโครมาโตกราฟีจะไม่

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

สมมาตรเหมือนอย่างรูปแบบ gaussian[89] คอลัมน์ที่ใช้นี้ได้ใช้งานมาประมาณ 2 ปี และมีประสิทธิภาพการแยกอยู่ในขั้นดีพอสมควร Gluck และ Shek[21] รายงานว่า คอลัมน์ประเภทเดียวกัน แต่ผลิตจากบริษัทต่างกันจะแสดงพฤติกรรมการแยกสตีรอยด์ฮอร์โมนได้แตกต่างกันอย่างเห็นได้ชัด

เมื่อพิจารณาสภาวะที่เหมาะสมของการแยกสารผสมที่ต้องการได้แล้ว นำมาศึกษาปริมาณวิเคราะห์ ในงานวิจัยนี้ได้วิเคราะห์หาปริมาณ ethinyloestradiol mestranol lynoestrenol และ levonorgestrel จากตัวอย่างยาเม็ดคุมกำเนิด จำนวน 20 ตัวอย่างที่ซื้อจากร้านขายยาในจังหวัดเชียงใหม่ พบว่าสามารถวิเคราะห์หาปริมาณ ethinyloestradiol จากตัวอย่างยาเม็ดคุมกำเนิดจำนวน 17 ตัวอย่าง ในจำนวนนี้มี 14 ตัวอย่างที่มีปริมาณที่ระบุไว้ในฉลากยา อยู่ในช่วง 97.52-105.58% ตัวอย่างยา Batterfly และ Ovostat 28 มีปริมาณ ethinyloestradiol ต่ำกว่า 90% คือมี 88.30 และ 88.60% ของปริมาณที่ระบุไว้ ส่วนตัวอย่างยา Neogynon-21 มีปริมาณ ethinyloestradiol เท่ากับ 95.50% ของปริมาณที่ระบุไว้ ซึ่งถือว่าอยู่ในเกณฑ์ใช้ได้ ได้วิเคราะห์หาปริมาณ mestranol จากตัวอย่างยา 2 ตัวอย่าง พบว่ายา Lyndiol 2.5 มีปริมาณ mestranol เท่ากับ 102.60% ส่วน Noracyclin มีปริมาณ mestranol เท่ากับ 95.03% ของปริมาณที่ระบุไว้วิเคราะห์หาปริมาณของ lynoestrenol จากตัวอย่างยาเม็ดคุมกำเนิด รวม 5 ชนิด พบว่าทุกตัวอย่างมีปริมาณตัวยาตรงตามที่ระบุไว้ตามฉลากยา คือในยา Minilyn, Ovostat 28, Lyndiol 2.5,Noracyclin 22 และ Exluton มีปริมาณของ lynoestrenol เท่ากับ 102.80, 106.00, 106.00, 99.20 และ 106.00% ตามลำดับ ส่วนการวิเคราะห์หาปริมาณ levonorgestrel ในตัวอย่างยา 8 ชนิด พบว่ามีอยู่ 4 ชนิดที่มีปริมาณ levonorgestrel มากกว่า 95.82% ของปริมาณที่ระบุไว้ ตัวอย่างยา Ovidon-richter มีปริมาณ levonorgestrel อยู่เพียง 84.24% เท่านั้น อย่างไรก็ตาม การที่ปริมาณของ levonorgestrel มีค่าต่ำกว่าที่ระบุไว้ อาจเป็นเพราะตัวยาชนิดนี้เกิดการสลายตัวหรือตัวอย่างยาเม็ดคุมกำเนิดมีปริมาณของตัวยาดังกล่าวไม่ตรงตามที่ระบุไว้ก็อาจเป็นได้

ได้ศึกษาช่วงของความเข้มข้นที่สารให้สัญญาณเป็นเส้นตรง (linear response) โดยฉีดสารละลายฮอร์โมน ethinyloestradiol (ช่วง 0.05-0.50 ไมโครกรัม), mestranol (ช่วง 0.025-0.50 ไมโครกรัม) และ lynoestrenol (ช่วง 0.5-

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

12.5 ไมโครกรัม) ได้ค่า correlation coefficient (r) > 0.9993 ส่วนสารละลายฮอร์โมน levonorgestrel (ช่วง 0.05-1.25 µg) ได้ค่า เท่ากับ 0.9993 ปกติแล้วค่าจะมีค่ามากที่สุดเท่ากับ 1.0000 เท่านั้น และพบว่าสัญญาณตอบสนองที่ได้อยู่ในแนวเส้นตรงตลอดช่วงความเข้มข้นของฮอร์โมนที่ศึกษา

ได้ศึกษาขีดต่ำสุดของการตรวจวัดที่ความยาวคลื่น 213 นาโนเมตรใช้ความไวของเครื่องตรวจวัดสูงสุด (0.0005 AUFS) พบว่าสามารถวัดปริมาณสารน้อยที่สุดของ ethinyloestradiol, levonorgestrel, mestranol และ lynoestrenol ได้ค่าเท่ากับ 2.0, 5.0, 5.0 และ 10.0 ไมโครกรัม ตามลำดับ

ได้ศึกษาวิธีการสกัดโดยการเตรียมยาเตรียมขึ้นให้มีองค์ประกอบของ mestranol, lynoestrenol, ethinyloestradiol และ levonorgestrel แล้วสกัดด้วยตัวทำละลายที่เป็นส่วนผสมของเมทานอล หรืออะซิโตไนไตรกับน้ำ และเมทานอล หรืออะซิโตไนไตร อย่างใดอย่างหนึ่งพบว่าสามารถใช้ระบบ MeOH/H_2O (4:1, v/v) และ ACN/H_2O (4:1 v/v) สกัด mestranol และ lynoestrenol ได้ % recovery ในช่วง 97.66-100.99 และ 97.66-99.01 ตามลำดับ ส่วน ethinyloestradiol และ levonorgestrel สามารถใช้ ACN/H_2O (4:1 , v/v) หรือ mobile phase สกัดได้ % recovery เท่ากับ 95.92 และ 99.88 (จากการวัดความสูงของพีค) หรือ 96.16 และ 99.48 (จากการหาพื้นที่ใต้พีค)

ได้ศึกษาปริมาณสารคืนกลับ โดยการเตรียมยาเตรียมที่มีส่วนผสมของ mestranol, lynoestrenol, ethinyloestradiol และ levonorgestrel ชนิดละ 50 ไมโครกรัมต่อเม็ด แล้วนำมาสกัดด้วยตัวทำละลายที่เหมาะสม พบว่าสามารถหา % recovery ของ mestranol, lynoestrenol, ethinyloestradiol และ levonorgestrel จากการทดลองชนิดละ 10 ซ้ำ ได้ค่าเท่ากับ 97.09, 98.29, 97.78 และ 98.46 และได้ค่า RSD เท่ากับ 1.48, 2.98, 2.21 และ 4.14% ตามลำดับ นอกจากนี้ได้ศึกษาปริมาณสารคืนกลับจากการวิเคราะห์โดยวิธี standard addition โดยการนำสารละลายตัวอย่างที่สกัดไว้มาเติมสารละลายมาตรฐานที่ต้องการศึกษาลงไป แล้วฉีดเข้าเครื่องมือ HPLC

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

จากการทดลองวิเคราะห์หาปริมาณ mestranol, lynoestrenol และ ethinyloestradiol ได้ % recovery เท่ากับ 101.62, 100.94 และ 103.66 ตามลำดับ

5.2 ข้อเสนอแนะ

5.2.1 ข้อสังเกตจากการใช้เครื่องมือ HPLC

ในงานวิจัยทางเคมีวิเคราะห์จำเป็นต้องรู้จักวิธีการใช้เครื่องมือวิเคราะห์ การดูแลรักษาเพื่อให้เครื่องทำงานเป็นไปอย่างสม่ำเสมอ โดยเฉพาะเครื่องมือที่มีส่วนประกอบหลายๆอย่าง มีลักษณะบอบบาง และมีราคาแพง เครื่องมือ HPLC เป็นเทคนิคหนึ่งที่ได้รับความนิยมกันอย่างแพร่หลายในงานวิเคราะห์ มีการจัดระบบแบบอัตโนมัติ ปัจจุบันนี้มีการประยุกต์เข้ากับระบบ microprocessor หรืออินติเกรเตอร์ เพื่อเพิ่มความสะดวกในการวิเคราะห์ข้อมูล และลดข้อผิดพลาดต่างๆ จากวิธีการวัด response จากเครื่องบันทึกสัญญาณ เนื่องจากเครื่องมือ HPLC มีราคาแพง ต้องใช้ทุนทรัพย์มากในการจัดหามาใช้ในห้องปฏิบัติการ ต้องใช้ความชำนาญสูงในการปฏิบัติต่อเครื่องมือ ปกติแล้วใช้เวลาฝึกหัด 6-12 เดือน[67,71,90]

ก่อนการทดลองแต่ละครั้ง จะต้องมีการตรวจสอบสภาวะความพร้อมของเครื่องมือ HPLC เสมอ เพื่อที่จะตรวจสอบ reproducibility ของผลการทดลอง และความปกติของเครื่องมือที่ใช้ สภาพของคอลัมน์โดยการใช้สารละลายมาตรฐานมาวิเคราะห์เป็นประจำ และควรจะเป็นสาร.ชนิดเดียวกันกับสารประกอบที่จะแยก แล้วพิจารณาค่า retention time ค่า resolution และ baseline ที่ได้[49] จากการใช้เครื่องมือ HPLC วิเคราะห์สารครั้งนี้ ได้พบปัญหาบางอย่างเกี่ยวกับการขจัดฟองอากาศออกจากตัวทำละลาย และมี pulse เกิดขึ้นในระบบ ปกติแล้ว mobile solvent ที่นำมาใช้ได้ผ่านการกรองผ่าน filter membrane ที่เหมาะสม และไล่ฟองอากาศที่ละลายอยู่ภายในตัวทำละลาย โดยการพ่นด้วยก๊าซไนโตรเจน และสั่นด้วยคลื่นเสียงมาแล้ว แต่ขณะที่ใช้แยกสารกลับมีฟองอากาศปุดออกมาจาก filter ที่อยู่ในแหล่งเก็บตัวทำละลายสามารถแก้ไขได้โดยนำ filter นี้มาขจัดฟองอากาศที่สะสมไว้ออก และไม่พบปัญหาเช่นนี้เกิดขึ้นอีก กรณีที่ระบบมี pulse เกิดขึ้น โดยไม่ทราบสาเหตุโดยที่จังหวะของ pulse เกิดขึ้นสลับกันตามจังหวะของหัวลูกสูบของเครื่องปั๊ม พบว่าบริเวณ filter ในหัวปั๊มเกิดการสะสมสิ่งสกปรก ทำให้การส่งตัวทำละลายไม่สะดวก

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

เสมือนว่าตัวทำละลายถูกส่งออกจากหัวลูกสูบข้างเดียว และเกิดเป็น pulse ขึ้นในระบบดังกล่าว

การใช้การ์ดคอลัมน์ จะช่วยกักสิ่งสกปรกที่ปนมากับตัวทำละลายหรือสารละลายตัวอย่างที่ฉีดได้เป็นอย่างดี และยังช่วยยืดอายุการทำงานของคอลัมน์อีกด้วย ดังนั้นเมื่อใช้การ์ดคอลัมน์ไปนานๆ จะทำให้เกิดการสะสมสิ่งสกปรกมากขึ้นเรื่อยๆ สังเกตจากการเพิ่มขึ้นของ pressure drop สามารถฟื้นฟูกำลังการ์ดคอลัมน์ได้โดยการถอดการ์ดคอลัมน์ออกจากระบบแล้วกลับทิศ และ flusk ด้วยเมทานอลหรือตัวทำละลายที่เหมาะสมด้วยอัตราการไหลสูงๆ ประมาณ 5-10 นาที จะทำให้สิ่งสกปรกหลุดออกได้บ้าง และทำให้ pressure drop ของระบบลดลง

ในการเริ่มใช้เครื่องมือ HPLC ก่อนอื่นจะต้องปฏิบัติต่อเครื่องปั๊ม โดยการดูดฟองอากาศที่อาจแทรกตัวอยู่ในช่องว่างในเครื่องปั๊มออกให้หมด โดยใช้ syringe ดูดออกที่ draw-off valve หรือที่ drain solvent บนเครื่องปั๊ม การเริ่มใช้เครื่องปั๊มนี้อาจจะปฏิบัติเพียงครั้งเดียว หรือนานๆ ครั้งก็ได้ แต่ในระหว่างนั้นจะต้องมีการเดินเครื่องปั๊มเป็นประจำ การมีฟองอากาศแทรกในหัวปั๊ม อาจทำให้ระบบมี pulse เกิดขึ้นก็ได้ และทำให้ปั๊มทำงานผิดปกติ หลังจากการใช้เครื่องมือ HPLC ทุกครั้งจะต้อง flusk เครื่องด้วยเมทานอลเสมอ เพื่อให้เมทานอลเข้าแทนที่ตัวทำละลายอื่นๆ ในทุกๆส่วนของเครื่อง เมื่อต้องการแยกสารด้วย mobile solvent อื่น ก็ค่อยๆเพิ่มอัตราการไหลขึ้นทีละ 0.1 มล.ต่อนาที ปกติแล้วจะใช้เวลาประมาณ 20-30 นาที ตัวทำละลายใหม่จึงเข้าแทนที่ตัวทำละลายเก่าหมด ดูจากการเปลี่ยนแปลงค่าการดูดกลืนแสงของเครื่องตรวจวัดก็ได้ คือเมื่อระบบมีตัวทำละลายใหม่จะทำให้ค่าการดูดกลืนแสงคงที่ และสามารถปรับค่าการดูดกลืนแสงเป็นศูนย์ตาม baseline ได้ ในการเปลี่ยนตัวทำละลายแต่ละครั้งจะทำให้เสียเวลาปรับสภาวะสมดุลย์นานพอสมควร คือจะต้องลดอัตราการไหลลงเป็นศูนย์ก่อนแล้วเปลี่ยนตัวทำละลายใหม่ จากนั้นก็ค่อยๆเพิ่มอัตราการไหลขึ้น จนกระทั่งถึงอัตราการไหลที่ต้องการและปล่อยไว้อีกชั่วครู่เพื่อให้ระบบเข้าสู่สภาวะสมดุลย์ใหม่ (equilibration) แล้วจึงค่อยฉีดสารที่ต้องการแยก[79]

กรณีที่ mobile solvent มีความหนืดมาก เช่น ระบบ MeOH/H_2O มีความหนืดมากกว่าระบบ ACN/H_2O ที่สัดส่วนเดียวกัน เนื่องจากเมทานอล (η = 0.60) มีความหนืดมากกว่าของอะซิโตไนไตร (η = 0.37) จะทำให้ pressure drop ของ

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ระบบมีค่าสูงขึ้นด้วย ดังนั้นเมื่อใช้ระบบ ACN/H_2O เป็น mobile solvent ระบบจะมี pressure drop ต่ำคอลัมน์ที่ใช้ครั้งนี้เป็นแบบ Radial-Pak สามารถทน pressure drop ได้แค่ 2,000 psi เท่านั้น(46) การใช้ระบบ radial compression separation ร่วมกับ คอลัมน์แบบ Radial-Pak จะทำให้คอลัมน์แน่นขึ้น และมี pressure drop เพิ่มขึ้นด้วย เป็นผลให้ระบบที่ฉีดเกิดรั่ว (leak) มีตัวทำละลายบางส่วนไหลออกมาจากรูที่สอดปลายเข็มของ syringe ปัญหานี้แก้ไขโดยการขันหัวน็อตบริเวณหัวฉีดของ U6K injector ให้แน่นเข้า

5.2.2 ข้อเสนอแนะเกี่ยวกับงานวิเคราะห์สารตัวอย่าง

HPLC เป็นเทคนิคที่มีการพัฒนาและประยุกต์ใช้วิเคราะห์สารตัวอย่างกันอย่างกว้างขวางมาก เนื่องจากมีข้อดีหลายอย่าง โดยเฉพาะใช้แยกและ/หรือวิเคราะห์สารได้หลายชนิดในเวลาเดียวกัน ให้ผลรวดเร็ว และวิเคราะห์สารที่มีปริมาณน้อยๆ ได้ดี ทั้งนี้จะต้องหาสภาวะที่เหมาะสมได้เสียก่อน เนื่องจากส่วนประกอบของตัวทำละลายมีอิทธิพลต่อค่า retention , selectivity และรูปร่างของพีค จุดมุ่งหมายของการแยก (separation goal) คือใช้เวลาสั้นที่สุด และพยายามที่จะให้เกิดการแยกสารตัวอย่างได้ดีที่สุดเท่าที่เป็นไปได้(71)

ในงานวิจัยนี้ได้เสนอข้อมูลการวิเคราะห์หาปริมาณตัวยาฮอร์โมนในตัวอย่างยาเตรียมที่ใช้คุมกำเนิด โดยการตรวจสอบว่ามีปริมาณตรงตามที่ระบุไว้หรือไม่ ไม่พบรายงานการวิเคราะห์ผลิตภัณฑ์ที่เกิดจากการสลายตัวของตัวยาฮอร์โมนดังกล่าว นอกจากการศึกษาสตีรอยด์ฮอร์โมนธรรมชาติที่มีอยู่ใน biological sample (36,38) ดังนั้นผลการวิเคราะห์ตัวอย่างยาเม็ดคุมกำเนิดที่มีปริมาณต่ำกว่าที่ระบุไว้ในฉลากยา คาดได้ว่าอาจมีการสลายตัวไปเป็นสารประกอบอื่น หรือตกค้างอยู่ใน binder หรือตัวอย่างยาที่นำมาวิเคราะห์มีปริมาณตัวยาไม่ตรงตามที่ระบุไว้ อย่างไรก็ตาม เนื่องจากสตีรอยด์ฮอร์โมนที่ใช้คุมกำเนิดเป็นสตีรอยด์-สังเคราะห์ เช่น mestranol ซึ่งมีฟีนอลิคไฮดรอกซี กรุ๊ป อยู่ในรูปของอีเทอร์(1) อาจจะเกิดสลายตัวกลายเป็น ethinyloestradiol ก็ได้เนื่องจากเมื่อรับประทาน mestranol เข้าไปจะถูกเปลี่ยนแปลงในตับเป็น ethinyloestradiol ก่อนจึงจะออกฤทธิ์(2) ในระหว่างการศึกษาหาสภาวะที่เหมาะสมของการแยก พบว่า เมื่อฉีดสารละลายฮอร์โมน norethynodrel จะปรากฏพีคเล็ก (minor peak) เสมอที่ retention time ของ

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

สารฮอร์โมน norethisterone และเมื่อทิ้งสารละลายมาตรฐาน norethynodrel ไว้นอกตู้เย็น และนำมาฉีดใหม่ พบว่าพีคเล็กมีความสูงพีคเพิ่มขึ้น และพีคของ norethynodrel มีขนาดเล็กลง แสดงว่าสตีรอยด์ฮอร์โมนทั้งสองชนิดนี้มีการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างเกิดขึ้น และเปลี่ยนรูปได้ ปกติแล้ว $\Delta^{5(10)}$ double bond ของ norethynodrel สามารถ shift ไปที่ตำแหน่ง Δ^{4} ได้ง่าย[1]

จากการวิเคราะห์หาปริมาณ levonorgestrel ในตัวอย่างยาเม็ด พบว่ามีปริมาณตัวยาต่ำกว่าที่ระบุไว้ในฉลากยา ผู้เขียนคาดว่าอาจมีการสลายตัวเป็นสารอื่น หรือมีปริมาณตัวยาไม่ตรงตามที่ระบุไว้ Johnston[12] ได้วิเคราะห์หาปริมาณทั้ง norgestrel และ levonorgestrol ในตัวอย่างยาเม็ดคุมกำเนิดได้ผลดี (มีปริมาณยาที่ระบุไว้เฉลี่ยเท่ากับ 99.2 และ 100.7% ตามลำดับ) ปกติแล้ว norgestrel จะมี 2 รูป คือ dl-Norgestrel และ d-Norgestrel (levonorgestrel) ซึ่งออกฤทธิ์ยาได้แรงกว่าชนิดแรกประมาณ 2 เท่า สารประกอบทั้งสองชนิดนี้มี stereochemistry ต่างกันเฉพาะเอทธิล กรุ๊ปที่ C_{13} เท่านั้น เป็นไปได้ว่าสารประกอบชนิดนี้มีการเปลี่ยนแปลง stereochemistry ของมัน และทำให้ความไวของการดูดกลืนแสง UV ลดลง เป็นผลให้การหาปริมาณตัวยามีค่าน้อยกว่าที่ควรจะเป็น อย่างไรก็ตามไม่พบรายงานสนับสนุน และยังต้องการศึกษาต่อไป[7,55]

ในการวิเคราะห์หาปริมาณสารตัวอย่างโดยวิธี HPLC จะต้องมีการวางแผนการทดลองให้พร้อม รวมทั้งการจัดเตรียมสารละลายต่างๆ ให้พร้อมที่จะฉีดเข้าเครื่อง HPLC ได้อย่างต่อเนื่อง วิธี HPLC จะเป็นเทคนิคที่ใช้ผลรวดเร็วได้ ก็ต่อเมื่อได้สภาวะที่เหมาะสมแล้ว และทำการทดลองได้อย่างต่อเนื่องโดยไม่มีการหยุดพักขณะทดลองหรือหยุดเครื่องไว้ เนื่องจากอาจมีการเปลี่ยนแปลงความไวได้บ้าง โดยเฉพาะอย่างยิ่งเมื่อเติม mobile solvent ใหม่ หรือเดินเครื่อง HPLC ในเวลานานๆ (มากกว่า 12 ชั่วโมง) ดังนั้นการวิเคราะห์หาปริมาณสารตัวอย่างแต่ละครั้งจะต้องฉีดสารละลายมาตรฐานสร้างกราฟมาตรฐานเสมอ เพื่อขจัดข้อผิดพลาดที่อาจเกิดจากผลของความไวของเครื่องตรวจวัดที่ใช้ ผู้ทดลองได้พบปัญหาเกี่ยวกับความไวต่ำลงเมื่อเติม mobile solvent ลงในแหล่งเก็บตัวทำละลายโดยไม่ต้องลดอัตราการไหลลง และขณะที่เดินเครื่อง HPLC เป็นเวลานานๆ และพบว่าความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐานชุดเดียวกัน แต่ฉีดเข้าเครื่อง HPLC คนละวัน จะ

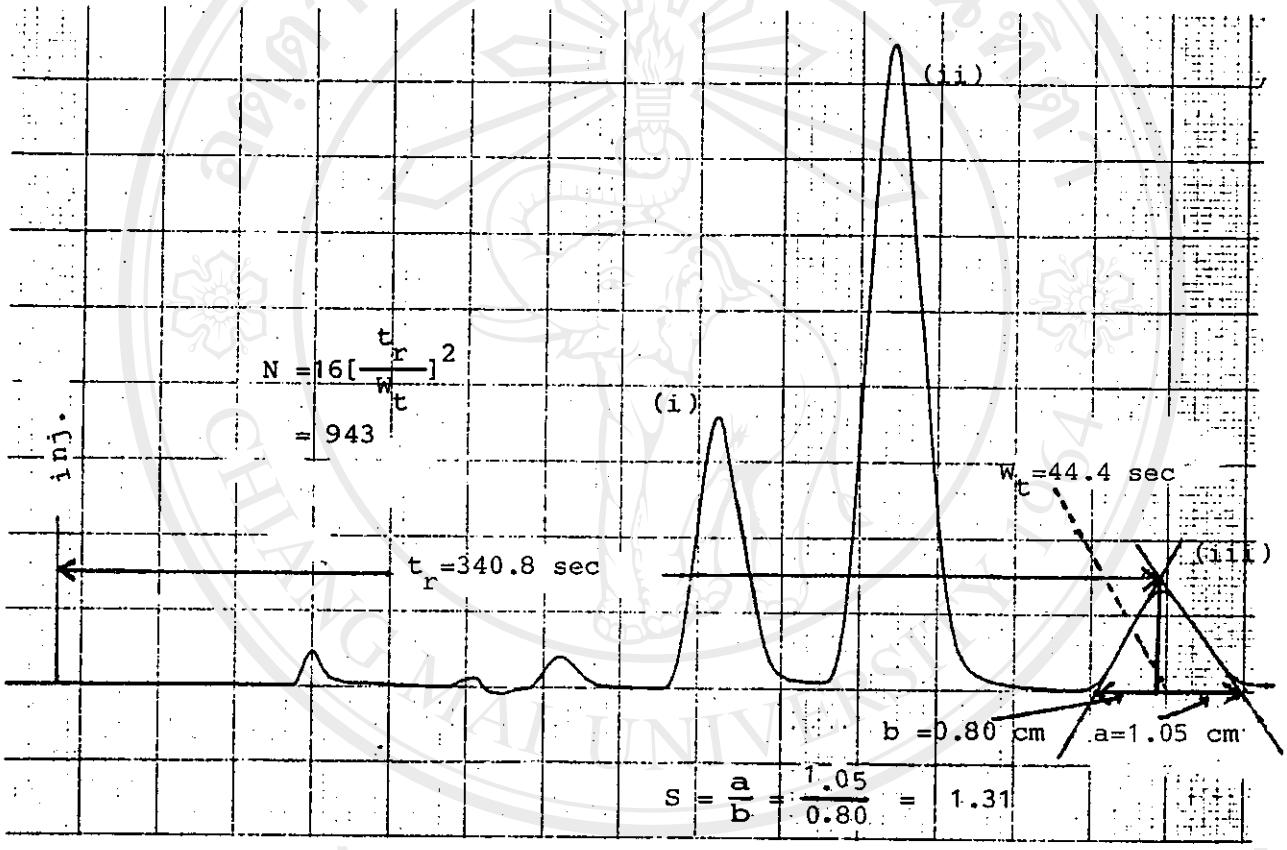
ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ให้สัญญาณต่างกันด้วย

ได้เสนอข้อมูลแสดงพฤติกรรมการแยกสตีรอยด์ฮอร์โมนธรรมชาติบางชนิดไว้ในบทที่ 3 แต่ยังไม่ได้หาสภาวะที่เหมาะสมของการแยก เพียงแต่ใช้เป็นข้อมูลในการศึกษาต่อไปเท่านั้น ที่จริงแล้วงานวิจัยสตีรอยด์ฮอร์โมนธรรมชาติจาก biological sample เป็นงานที่ท้าทายอย่างหนึ่ง แต่จะต้องมีวัตถุประสงค์ที่มีขอบเขตพอสมควร เนื่องจากใน biological sample มีสารประกอบอื่นๆ ที่อาจรบกวนการวิเคราะห์โดยวิธี HPLC ได้

งานวิจัยนี้ได้ผลเป็นที่น่าพอใจ สามารถประยุกต์ใช้วิธี HPLC วิเคราะห์หาปริมาณสารตัวอย่างได้ผลรวดเร็ว มีความถูกต้องและแม่นยำสูง เหมาะสำหรับใช้เป็นวิธีวิเคราะห์ในงานประจำในห้องปฏิบัติการ ทำให้ผู้เขียนได้เรียนรู้และมีประสบการณ์ในการใช้เครื่องมือ HPLC เรียนรู้วิธีการหาสภาวะที่เหมาะสม และวิธีการหาปริมาณสารตัวอย่าง แม้ว่าในงานวิจัยนี้จะได้ทดลองข้อมูลหลายๆอย่างก็ตาม ในการประยุกต์ใช้วิเคราะห์สารตัวอย่างทั่วๆไปในห้องปฏิบัติการนั้น สามารถย่นเวลาการทดลอง และประหยัดตัวทำละลายได้ตามความเหมาะสมของงานวิจัย

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved



รูปที่ 48 โครมาโตแกรมของการแยก ethinyloestradiol(i), levonorgestrel(ii) และ progesterone (iii) as I.S. เมื่อใช้ CH_3CN/H_2O (80:20,v/v) เป็น mobile phase ที่ flow-rate 1.5 ml/min และ chart speed 2.5 cm/min

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved