

บทที่ 4

ผลการวิจัย

4.1 การกำหนดรูปแบบการศึกษาทางคลินิกที่เหมาะสม

4.1.1 การทดสอบประสิทธิภาพของวิธีการสกัดสาร

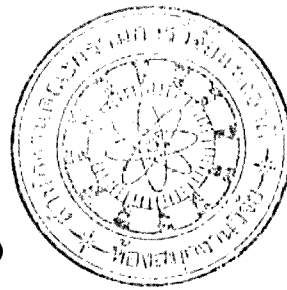
การสกัดสารจาก plasma ในครั้งนี้ใช้วิธี liquid-liquid extraction โดยใช้ 90% acetonitrile เป็นตัวสกัดแยก genistein ออกจากสารประกอบอื่นใน plasma เช่น plasma protein การศึกษานี้เป็นการเปรียบเทียบปริมาณการสกัด genistein จาก whole blood และจาก plasma free protein (ไม่ผ่านการสกัด) เพื่อตรวจสอบประสิทธิภาพของวิธีการสกัดสาร โดยเลือกทำที่ความเข้มข้นต่ำ (2.858 µg/ml)

ผลการศึกษา

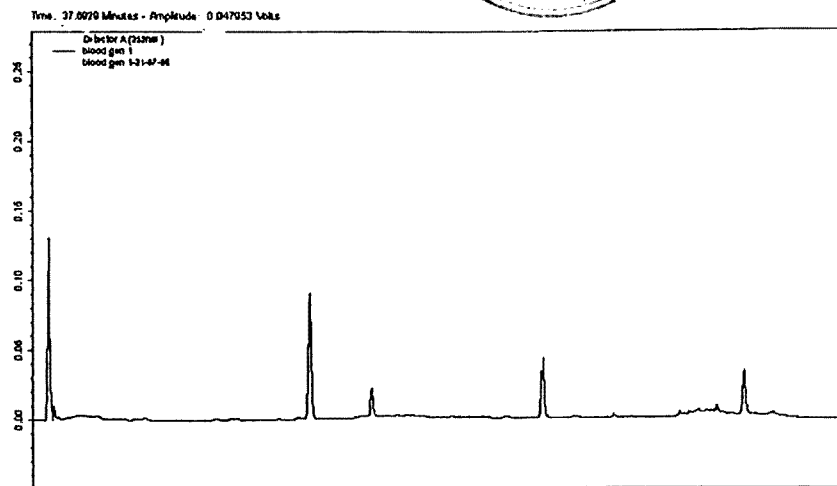
ตารางที่ 4 แสดง % Recovery of genistein ที่ความเข้มข้นต่ำ หลังจากผ่านกระบวนการสกัดและตกตะกอนโปรตีน ด้วย acetonitrile (ACN) ผลการศึกษา พบว่า % Recovery มีค่าเท่ากับ 94.25, 93.85 (average = 94.05%) ซึ่งเป็นค่าที่สูงและใกล้เคียงกัน บ่งชี้ถึงความน่าเชื่อถือของวิธีการสกัด chromatogram ของ genistein (2.858 mcg/ml) ใน pre-และ post-extraction procedures ดังแสดงในภาพที่ 4

ตารางที่ 4 แสดง % Recovery of genistein

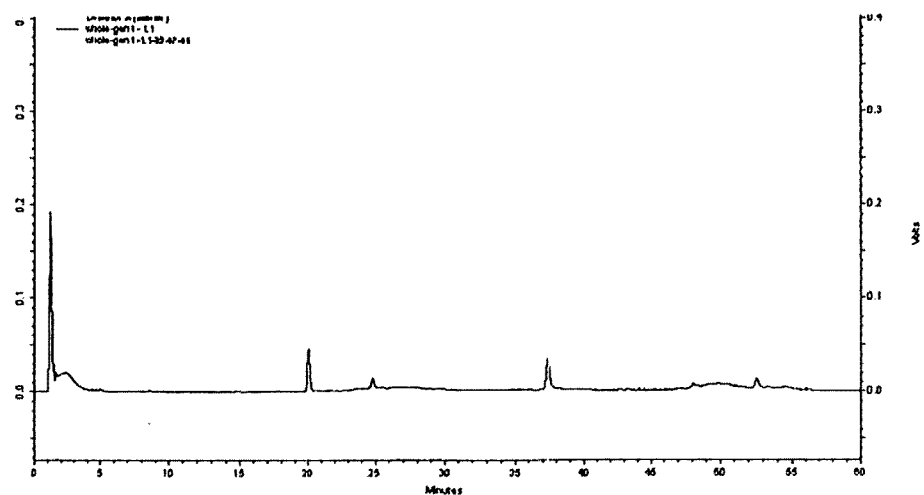
Genistein (n=2)	Concentration (ug/ml)	% Recovery
1	2.858	94.25
2	2.858	93.85
Average	2.858	94.05



(a)



(b)

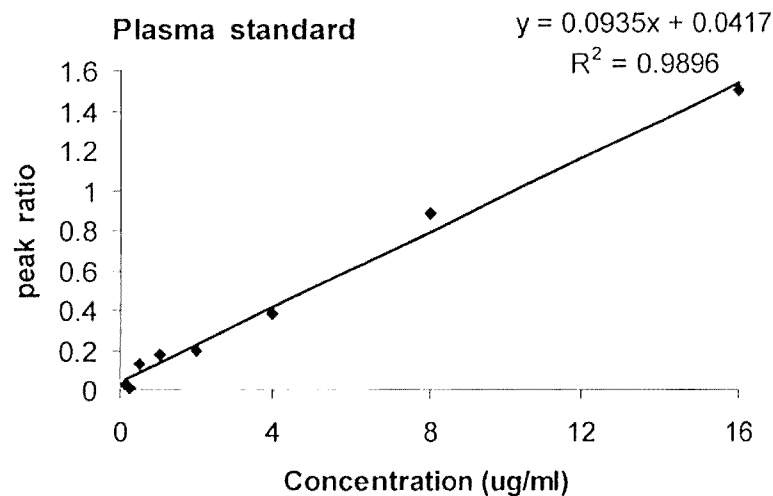


ภาพที่ 4 แสดง Chromatogram ของ genistein (2.858 mcg/ml, RT=37 min) ใน
(a) pre-extraction และ (b) post-extraction procedures

4.1.2 Genistein plasma standard

จากการทำ regression line ของ standard curve พบว่า slope มีค่าเท่ากับ 0.0935 ซึ่งใกล้เคียงกับ 1 intercept มีค่าเท่ากับ 0.0417 ซึ่งใกล้เคียงกับ 0 และ r^2 มีค่าเท่ากับ 0.9896 แสดง

ความเป็นเส้นตรง (linearity) standard curve จึงมีความน่าเชื่อถือและสามารถยอมรับได้ genistein plasma standard (ภาพที่ 5)



ภาพที่ 5 กราฟ genistein plasma standard

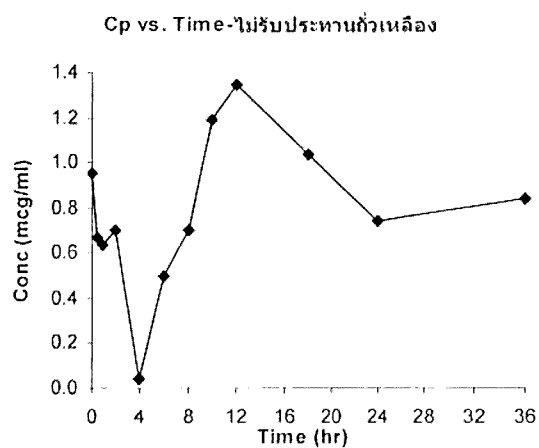
4.1.3 การวิเคราะห์ปริมาณ genistein ในกระแสเลือด

การเปลี่ยนแปลงปริมาณ genistein ในกระแสเลือด ของอาสาสมัครผู้ไม่บริโภคถั่วเหลืองแสดงไว้ในตารางที่ 5 และภาพที่ 6 ขณะที่การเปลี่ยนแปลงปริมาณ genistein ในกระแสเลือดของอาสาสมัครผู้บริโภคถั่วเหลืองเป็นประจำ แสดงไว้ในตารางที่ 6 และภาพที่ 7

ผลการศึกษาพบว่า อาสาสมัครที่ไม่บริโภคถั่วเหลืองมีค่าความเข้มข้นสูงสุดของ genistein ในกระแสเลือด (Cmax) 1.339 $\mu\text{g}/\text{m}$ เวลาที่ความเข้มข้นสูงสุด (Tmax) ประมาณชั่วโมงที่ 12 หรือ 8 ชั่วโมงนับแต่เริ่มเห็นการดูดซึม พื้นที่ใต้กราฟของ Cp VS Time ($\text{AUC}_{4-\infty}$) เท่ากับ 72.25 $\mu\text{g}\cdot\text{hr}/\text{ml}$ ค่าคงที่การกำจัดยา (Kcl) 0.019 hr^{-1} ขณะที่อาสาสมัครบริโภคถั่วเหลืองเป็นประจำ มีค่าความเข้มข้นสูงสุดของ genistein ในกระแสเลือด (Cmax) 0.967 $\mu\text{g}/\text{ml}$ เวลาที่ความเข้มข้นสูงสุด (Tmax) ที่ ชั่วโมงที่ 8 พื้นที่ใต้กราฟของ Cp VS Time ($\text{AUC}_{0-\infty}$) เท่ากับ 19.93 $\mu\text{g}\cdot\text{hr}/\text{ml}$ ค่าคงที่การกำจัดยา (Kcl) 0.016 hr^{-1} ค่าเภสัชจลนศาสตร์ได้แสดงเปรียบเทียบไว้ในตารางที่ 7

ตารางที่ 5 ความเข้มข้นของ genisteine ณ เวลาต่างๆ ของผู้ไม่บริโภคถั่วเหลือง

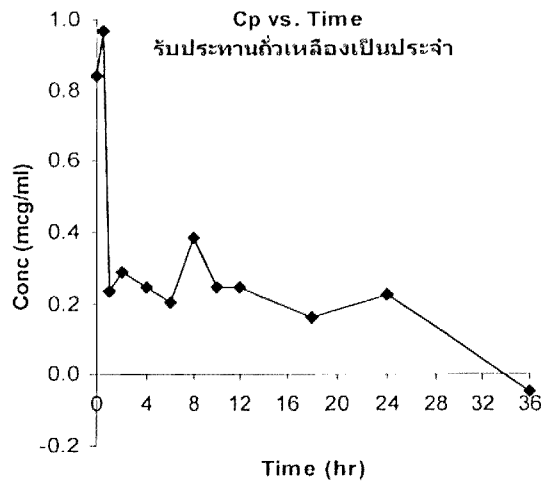
เวลา (hr)	0	0.5	1	2	4	6	8	10	12	18	24	36
ความ เข้มข้น (ug/ml)	0.956	0.669	0.637	0.701	0.041	0.499	0.701	1.190	1.399	1.031	0.744	0.839



ภาพที่ 6 การเปลี่ยนแปลงความเข้มข้นของ genisteine ของผู้ที่ไม่บริโภคถั่วเหลือง

ตารางที่ 6 ความเข้มข้นของ genisteine ณ เวลาต่างๆ ของผู้ที่บริโภคถั่วเหลือง

เวลา (hr)	0	0.5	1	2	4	6	8	10	12	18	24
ความ เข้มข้น (ug/ml)	0.839	0.967	0.233	0.286	0.244	0.201	0.382	0.244	0.240	0.159	0.222



ภาพที่ 7 การเปลี่ยนแปลงความเข้มข้นของ genistein ณ เวลาต่างๆ ของผู้บริโภควัวเหลือง

ตารางที่ 7 ค่าเภสัชจลนศาสตร์ของ genistein ในผู้ที่ไม่บริโภควัวเหลืองและผู้บริโภควัวเหลือง

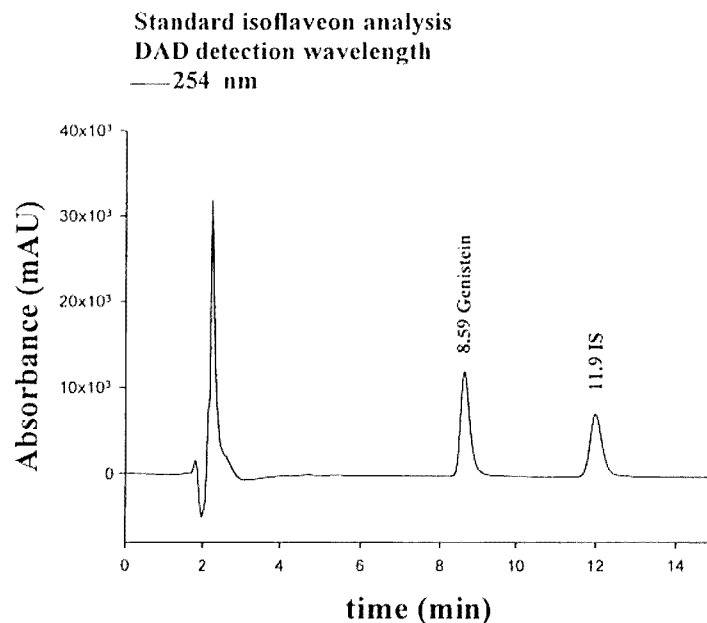
ค่าเภสัชจลนศาสตร์	ไม่บริโภควัวเหลือง	บริโภควัวเหลือง
Kel (hr ⁻¹)	0.019	0.016
t1/2 (hr)	36.470	43.313
C _{max} (ug/ml)	1.339	0.967
AUC _{inf} (ug.hr/ml)	72.250	19.930

4.2 การพัฒนาและตรวจสอบวิธีวิเคราะห์ genistein ในกระแสเลือด

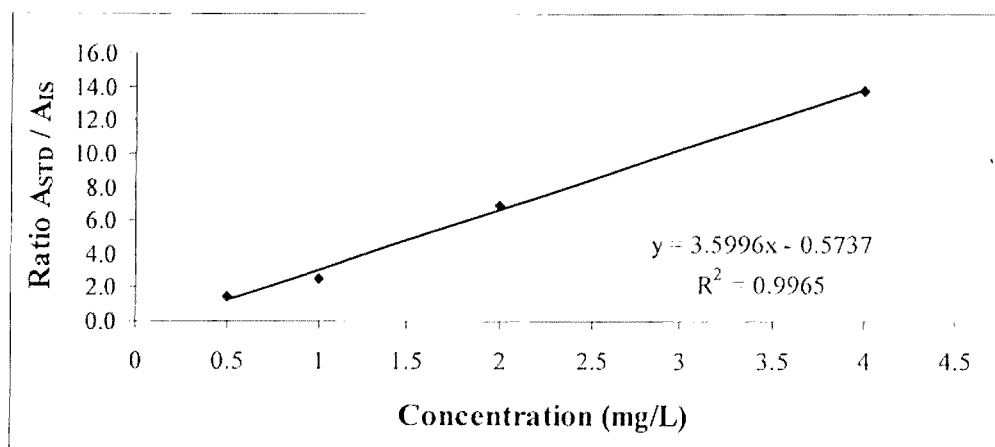
4.2.1 การสร้างกราฟมาตรฐานและวิเคราะห์ปริมาณของ genistein ในกระแสเลือด โดย HPLC

1. การสร้างกราฟมาตรฐาน

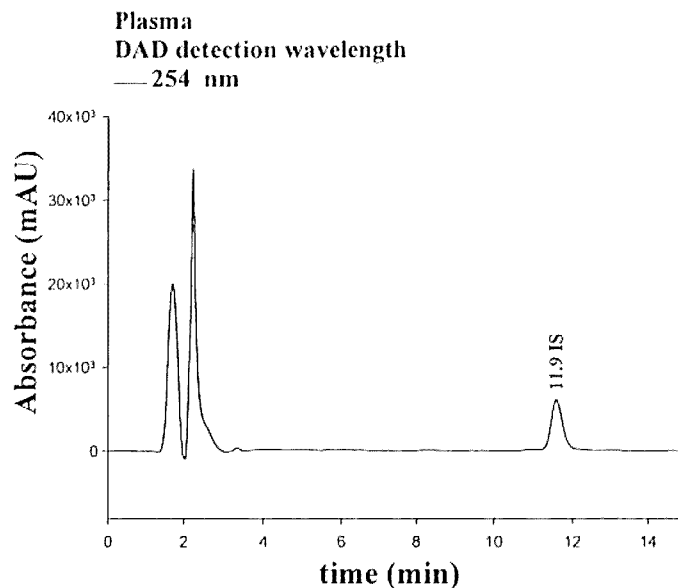
ในการสร้างกราฟมาตรฐานเพื่อใช้ในการวิเคราะห์หาปริมาณ genistein ในกระแสเลือด ใช้สารละลายมาตรฐานความเข้มข้น 0.5 – 4 mg/L จากการทดลองความเข้มข้นสูงกว่า 10 mg/L จะทำให้ความเป็น linear range ลดลง ภาพที่ 8 แสดง chromatograms ของสารมาตรฐาน genistein ความเข้มข้น 1.0 mg/L และ internal standard (Fluorecien) ความเข้มข้น 2 mg/L. ส่วนกราฟมาตรฐานแสดงดังภาพที่ 9 และเมื่อประยุกต์ใช้วิธีวิเคราะห์กับ blank plasma ได้ chromatogram ดังภาพที่ 10



ภาพที่ 8 HPLC-DAD chromatograms ของสารมาตรฐาน Genistein ความเข้มข้น 1.0 mg/L และ IS (Fluorecien) ความเข้มข้น 2 mg/L (HPLC พารามิเตอร์ – mobile phase: 0.2% acetic acid (A) และ acetonitrile (B); column temperature: 40⁰C/ detection wavelength: 254 nm; Genistein ความเข้มข้น 1 mg/L Atlantis dC18 reversed-phase chromatographic column (150 mm x 2.1 mm, 5.0 μm particle size, Waters, USA) อัตราส่วน A:B; 50:50. Flow rate 0.4 mL/min)



ภาพที่ 9 แสดงกราฟมาตรฐานสารละลายมาตรฐาน Genistein ความเข้มข้น 0.5 – 4 mg/L



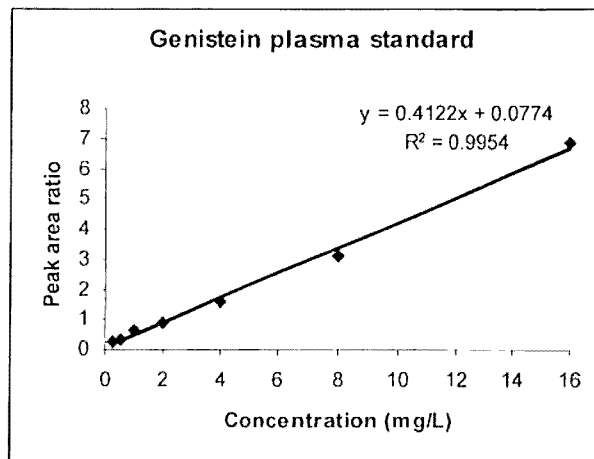
ภาพที่ 10 HPLC-DAD chromatograms ของ Blank plasma และ IS (Fluorecien); HPLC พารามิเตอร์ – mobile phase: 0.2% acetic acid (A) และ acetonitrile (B); column temperature: 40°C/ detection wavelength: 254 nm; Genistein ความเข้มข้น 1 mg/L. Atlantis dC18 reversed-phase chromatographic column (150 mm x 2.1 mm, 5.0 μ m particle size, Waters, USA) อัตราส่วน A:B; 50:50. Flow rate 0.4 mL/min

2. การวิเคราะห์ปริมาณของ genistein ในกระแสดเลือด

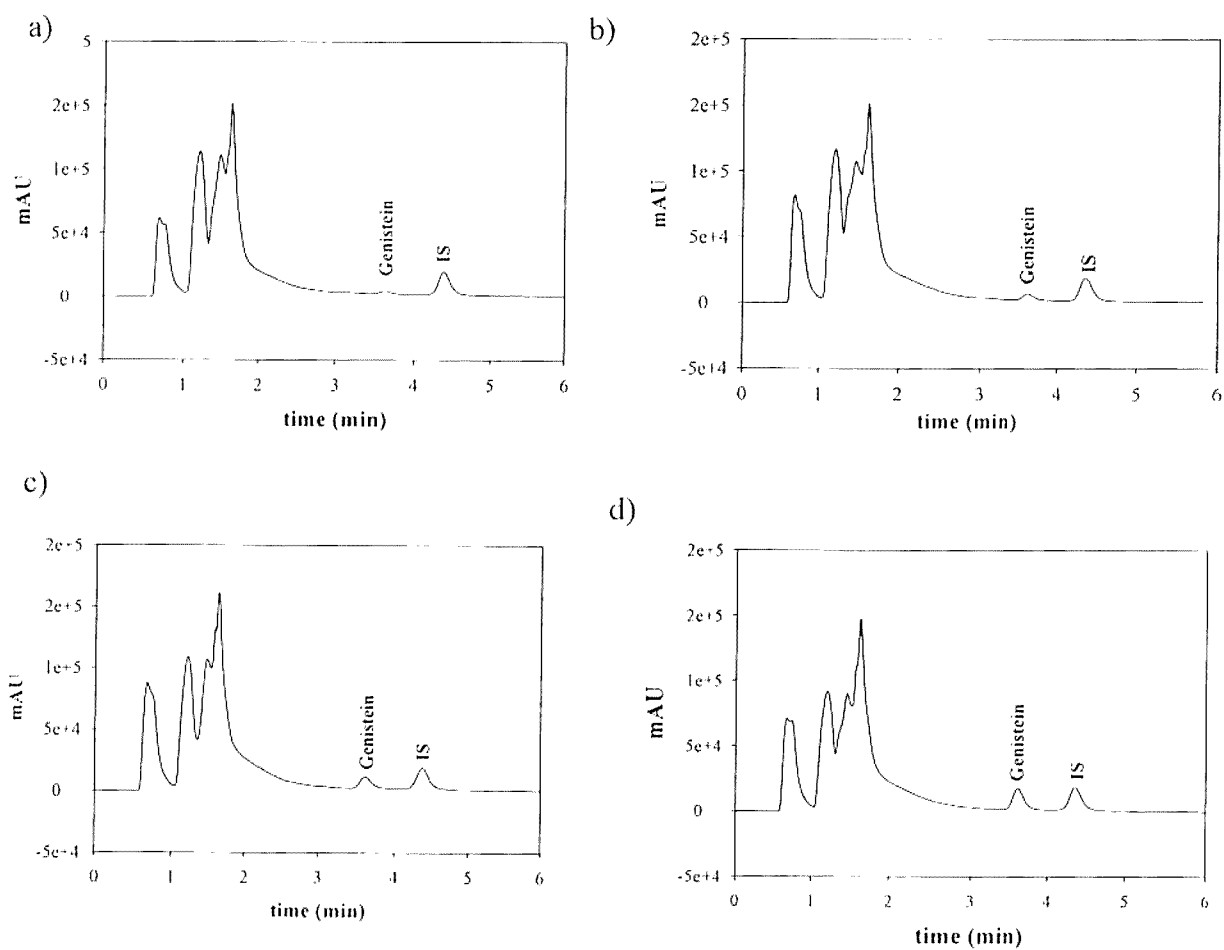
การวิเคราะห์ปริมาณ genistein ในกระแสดเลือดโดย HPLC ระบบในการวิเคราะห์มีผลต่อการวิเคราะห์เป็นอย่างมาก นั่นคือ matrix ที่ใช้ต้องเป็นระบบเดียวกันเมื่อจะวิเคราะห์หาปริมาณ genistein ในกระแสดเลือด ดังนั้น matrix ที่จะใช้ต้องเป็น plasma solution ในการเตรียมสารละลายมาตรฐาน genistein เพื่อทำการสร้าง standard curve ของ genistein ใน plasma นั้น พบว่าสามารถใช้ในการวิเคราะห์ด้วยวิธี HPLC ได้ ดังภาพที่ 10 โดยที่ matrix ไม่มีผลต่อการวิเคราะห์

2.1 การสร้างกราฟมาตรฐานโดยใช้ Plasma เป็น maxtrix ในการเตรียมสารละลาย

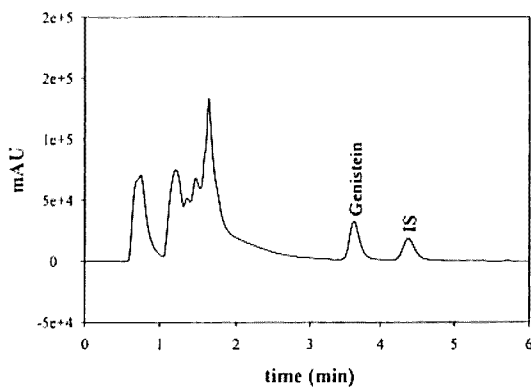
กราฟมาตรฐานของ genistein ในกระแสดเลือดในช่วงความเข้มข้น 0.25 – 16 mg/L แสดงไว้ในภาพที่ 11 โดยภาพที่ 12 แสดง chromatograms ของสารมาตรฐาน genistein ในความเข้มข้นต่างๆ และ internal standard (Fluorecien) ความเข้มข้น 5 mg/L



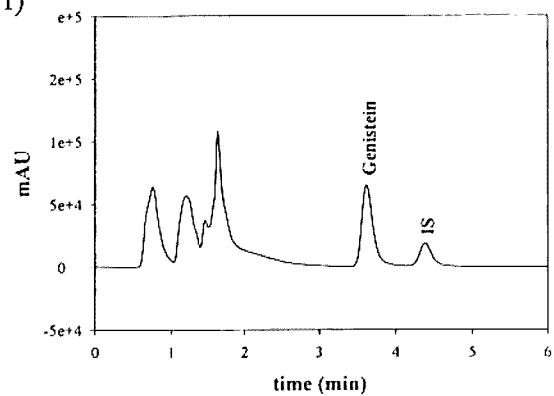
ภาพที่ 11 แสดงกราฟมาตรฐานสารละลาย Genistein ใน plasma ความเข้มข้น 0.25 – 16 mg/mL



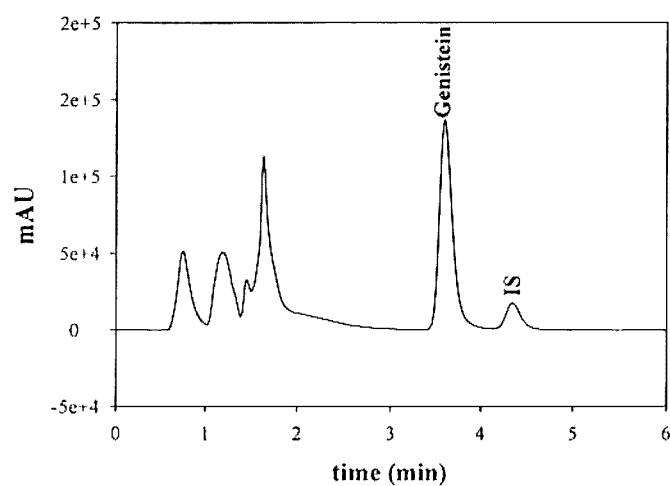
e)



f)



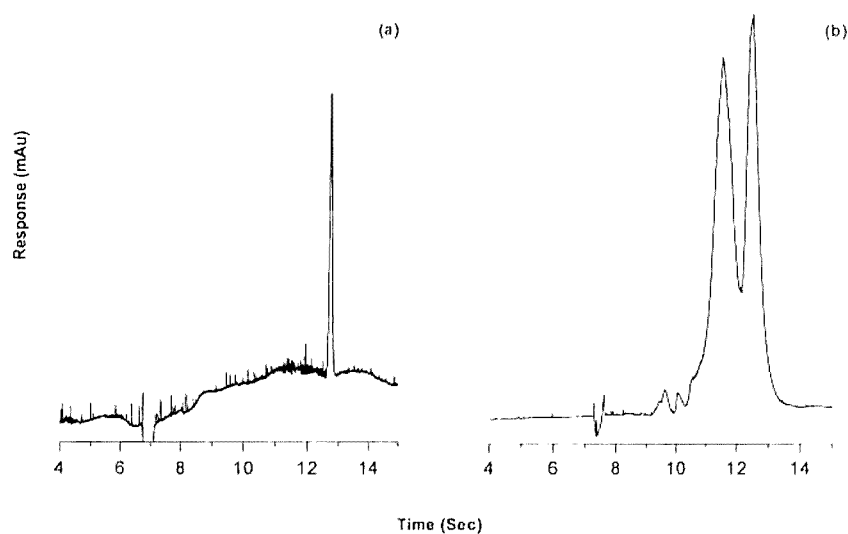
g)



ภาพที่ 12 HPLC-DAD chromatograms ของสารมาตรฐาน Genistein ใน plasma ความเข้มข้น a) 0.25, b) 0.50, c) 1.00, d) 2.00, e) 4.00 f) 8.00 และ g) 16.00 mg/L ตามลำดับ และ IS (Fluorecien) ความเข้มข้น 5 mg/L; HPLC พารามิเตอร์ – mobile phase: 0.2% acetic acid (A) และ acetonitrile (B); column temperature: 40⁰C/ detection wavelength: 254 nm; Atlantis dC18 reversed-phase chromatographic column (150 mm x 2.1 mm, 5.0 m particle size, Waters, USA) อัตราส่วน A:B; 60:40. Flow rate 0.4 mL/min

4.2.การวิเคราะห์ปริมาณของ genistein ในกระแสเลือด ด้วย CE

ในการวิเคราะห์หาปริมาณ genistein ในกระแสเลือดโดย CE พบว่าไม่สามารถวิเคราะห์หรือสร้างกราฟมาตรฐานโดยมี plasma เป็น matrix เนื่องจากผลการเกิด interference ในการดูดกลืนแสงของ plasma มีผลทำให้เกิดการบิดเบือนสารตัวอย่างที่ต้องการวิเคราะห์ แสดงดังภาพที่ 13 ซึ่งเปรียบเทียบการวิเคราะห์ของสารละลายมาตรฐานที่เตรียมในสารละลายบัฟเฟอร์และสารละลายมาตรฐานที่เตรียมใน plasma



ภาพที่ 13 Electropherogram เปรียบเทียบผลการเกิดพีคของสาร genistein

(a) genistein ใน buffer solution

(b) genistein ใน plasma solution