



## รายงานการวิจัยฉบับสมบูรณ์

การพัฒนาวิธีใหม่เพื่อใช้ในการวัดค่าสัมประสิทธิ์การกระจายตัวของยา  
Development of a New Partition Coefficient Measurement of Drugs

ดร. เสาวภาคย์ ชีราทรง

ได้รับทุนสนับสนุนงานวิจัยจากเงินรายได้ ประจำปีงบประมาณ 2555

คณะวิทยาศาสตร์

RCH สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

RS

189

เลขหมู่.....  
เลขทะเบียน.....

เลขที่.....

วัน, เดือน, ปี.....

b.12602735  
i.....

ชื่อโครงการ (ภาษาไทย) การพัฒนาวิธีใหม่เพื่อใช้ในการวัดค่าสัมประสิทธิ์การกระจายตัวของยา  
แหล่งเงินทุน เงินรายได้

ประจำปีงบประมาณ 2555 จำนวนเงินที่ได้รับการสนับสนุน 50,000 บาท

ระยะเวลาทำการวิจัย 1 ปี ตั้งแต่ ตุลาคม 2554 ถึง กันยายน 2555 ✓

ชื่อ-สกุล หัวหน้าโครงการ ดร. เสาวภาคย์ ชีราทรง

หน่วยงานต้นสังกัด สาขาวิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

### บทคัดย่อ

ค่าสัมประสิทธิ์การกระจายตัวของสารในชั้นน้ำและชั้นน้ำมันเป็นค่าที่ใช้บ่งชี้ถึงคุณสมบัติในการละลายในตัวกลางที่เป็นสารออร์แกนิกและตัวกลางที่เป็นสารละลายของสารชนิดหนึ่งๆ ณ เวลาสมดุล ค่าดังกล่าวนิยมใช้วัดความสามารถในการดูดซึมยาของเซลล์สิ่งมีชีวิต โดยวิธีที่เป็นที่นิยมในการวัดค่าสัมประสิทธิ์การกระจายตัวของสารในชั้นน้ำและชั้นน้ำมัน ได้แก่ วิธีการสั่นแบบเขย่า (shake-flask method) ซึ่งวิธีนี้จะต้องมีการหาค่าความเข้มข้นของสารที่ละลายอยู่ทั้งในตัวกลางที่เป็นสารออร์แกนิกและตัวกลางที่เป็นสารละลาย โดยคำนวณได้จากกราฟมาตรฐานซึ่งสร้างขึ้นสำหรับสารที่ละลายอยู่ในตัวกลางแต่ละชนิด ดังนั้นในโครงการนี้ จึงได้มีการพัฒนาวิธีใหม่เพื่อใช้ในการวัดค่าสัมประสิทธิ์การกระจายตัวของสารในชั้นน้ำและชั้นน้ำมัน ซึ่งวิธีที่ได้รับการพัฒนานี้ไม่จำเป็นต้องสร้างกราฟมาตรฐานอีกแล้ว จึงทำให้เกิดความสะดวกรวดเร็ว และลดเวลาที่ใช้ในการวิเคราะห์ผล โดยวิธีดังกล่าวจะถูกนำไปใช้ในการวิเคราะห์คุณสมบัติของยาที่ได้รับการคิดค้นขึ้นใหม่ต่อไป

คำสำคัญ : ค่าสัมประสิทธิ์การกระจายตัว, การวิเคราะห์คุณสมบัติของยา

**Research Title:** Development of a New Partition Coefficient Measurement of Drugs

**Researcher:** Dr. Saowapak Teerasong

**Faculty:** Science

**Department:** Chemistry

King Mongkut's Institute of Technology Ladkrabang

### ABSTRACT

The partition coefficient ( $P_{ow}$ ) is a value representing soluble property of compounds in two immiscible phases at equilibrium. This value can be used for indicating the ability of drug compounds partitioning through cell membrane. The conventional procedure for measurement of the  $P_{ow}$  is a shake-flask method. By this method, the concentration of compound in each phase is determined using individual calibration. In this work, a new procedure for determination of  $P_{ow}$  was developed. The developed method has a remarkable advantage since calibration curves are no longer required. The method is thus more rapid than the conventional operating procedure and can be applied for screening the  $P_{ow}$  of new drug candidates.

**Keywords:** Partition coefficients, Drug screening

### กิตติกรรมประกาศ

การวิจัยครั้งนี้ได้รับทุนสนับสนุนการวิจัยจากสถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง จากแหล่งทุนเงินรายได้ ประจำปีงบประมาณ พ.ศ. 2555

ดร.เสาวภาคย์ ชีราทรง  
(นักวิจัย)



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย .....	I
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ .....	II
กิตติกรรมประกาศ .....	III
สารบัญ .....	IV
สารบัญตาราง .....	VI
สารบัญภาพ .....	I
บทที่ 1 บทนำ .....	1
1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา .....	1
1.2 วัตถุประสงค์ของการวิจัย .....	2
1.3 ขอบเขตของการวิจัย .....	3
1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ .....	3
บทที่ 2 ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง .....	4
2.1 สัมประสิทธิ์การกระจายตัว (partition coefficient, $P_{ow}$ ) .....	4
2.2 วิธีดั้งเดิมที่ใช้ในการหาค่าสัมประสิทธิ์การกระจายตัว (partition coefficient, $P_{ow}$ ) .....	5
2.3 วิธีใหม่สำหรับการวิเคราะห์หาค่า $\log P_{ow}$ .....	10
บทที่ 3 วิธีดำเนินการวิจัย .....	12
3.1 สารเคมีที่ใช้ในการทดลอง .....	12
3.2 อุปกรณ์และเครื่องมือที่ใช้ในการทดลอง .....	12
3.3 การเตรียมสารเคมี .....	12
3.4 วิธีดำเนินการทดลอง .....	13
3.5 การพัฒนาวิธีการคำนวณแบบใหม่ .....	14
บทที่ 4 ผลการวิจัย .....	17
4.1 การหาค่าสัมประสิทธิ์การกระจายตัวของพาราเซตามอล .....	17
4.2 การหาค่าสัมประสิทธิ์การกระจายตัวของอะนีสีน .....	22
4.2 การหาค่าสัมประสิทธิ์การกระจายตัวของโรโบฟลาวิน .....	27

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## สารบัญ (ต่อ)

	หน้า
บทที่ 5 สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ.....	32
บรรณานุกรม/เอกสารอ้างอิง.....	33
ภาคผนวก.....	34
ประวัตินักวิจัย.....	36



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## สารบัญตาราง

ตารางที่	หน้า
1.1 เปรียบเทียบข้อดีข้อเสียของแต่ละวิธีในการวิเคราะห์หาค่าสัมประสิทธิ์การกระจายตัวของสาร.....	10
4.1 แสดงปริมาตรสารละลายตัวอย่างยา ออกทานอล และฟอสเฟตบัพเฟอร์ที่ใช้ในการทดลอง.....	20
4.2 สรุปค่าการดูดกลืนแสงของสารละลายพาราเซตามอลในชั้นออกทานอลหลังการสกัด ที่สัดส่วนปริมาตรต่างๆ ของสารละลายพาราเซตามอล.....	20
4.3 สรุปค่าการดูดกลืนแสงของสารละลายอะนิลีนในชั้นออกทานอลหลังการสกัด ที่สัดส่วนปริมาตรต่างๆ ของสารละลายอะนิลีน.....	25
4.4 สรุปค่าการดูดกลืนแสงของสารละลายโรโบฟลาวินในชั้นฟอสเฟตบัพเฟอร์หลังการสกัด ที่สัดส่วนปริมาตรต่างๆ ของสารละลายโรโบฟลาวิน.....	30

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## VII

## สารบัญภาพ

ภาพที่	หน้า
2.1 การแยกสารด้วยวิธี Shake-flask.....	5
2.2 การแยกสารด้วยวิธี Stir-flask.....	6
2.3 ส่วนประกอบของเครื่อง High-Performance Liquid Chromatography (HPLC).....	7
2.4 แสดงการเทียบค่า Retention time ของตัวอย่างยากับสารมาตรฐานยาที่ทราบค่า $P_{ow}$ เพื่อวิเคราะห์หาค่า $P_{ow}$ ของสารตัวอย่าง.....	8
2.5 ส่วนประกอบของเครื่อง Flow injection สำหรับการวิเคราะห์หาค่า $P_{ow}$ .....	9
3.1 แสดงสัดส่วนปริมาตรของสารละลายตัวอย่าง ออกทานอล และฟอสเฟตบัฟเฟอร์ ที่ใช้ในการทดลองเพื่อหาค่า $P_{ow}$ ของยา.....	14
4.1 แสดงยูวีสเปกตรัมของยาพาราเซตามอล (Paracetamol) ซึ่งมีค่าการดูดกลืนแสงสูงสุดที่ 250 nm.....	18
4.2 แสดงผลการหาเวลาเข้าสู่สมดุลของการสกัดยาพาราเซตามอล โดยการติดตามการเปลี่ยนแปลงค่าการดูดกลืนแสงของสารละลายในชั้นออกทานอล.....	19
4.3 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่าง ค่า $A_f/A_r$ กับ $1/V_{drug}$ ของการทดลอง หาค่าสัมประสิทธิ์การกระจายตัวของพาราเซตามอลทั้งสามครั้ง.....	21
4.4 แสดงยูวีสเปกตรัมของอะนิลีน (Aniline) ซึ่งมีค่าการดูดกลืนแสงสูงสุดที่ 235 nm.....	23
4.5 แสดงผลการหาเวลาเข้าสู่สมดุลของการสกัดอะนิลีน โดยการติดตามการเปลี่ยนแปลงค่าการดูดกลืนแสงของสารละลายในชั้นออกทานอล.....	24
4.6 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่าง ค่า $A_f/A_r$ กับ $1/V_{drug}$ ของการทดลอง หาค่าสัมประสิทธิ์การกระจายตัวของอะนิลีนทั้งสามครั้ง.....	26
4.7 แสดงยูวีสเปกตรัมของไรโบฟลาวิน (Riboflavin) ซึ่งมีค่าการดูดกลืนแสงสูงสุดที่ 265 nm.....	28
4.8 แสดงผลการหาเวลาเข้าสู่สมดุลของการสกัดไรโบฟลาวิน โดยการติดตามการเปลี่ยนแปลงค่าการดูดกลืนแสงของสารละลายในชั้นฟอสเฟตบัฟเฟอร์.....	29
4.9 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่าง ค่า $A_f/A_r$ กับ $1/V_{drug}$ ของการทดลอง หาค่าสัมประสิทธิ์การกระจายตัวของไรโบฟลาวิน.....	30

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## บทที่ 1

### บทนำ

#### 1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา

การค้นหายาใหม่ (drug discovery) เกี่ยวข้องกับกระบวนการค้นหาโครงสร้างสารประกอบที่อาจมีฤทธิ์ทางเภสัช การสังเคราะห์ การตรวจสอบและวิเคราะห์คุณสมบัติของสาร รวมทั้งการศึกษาฤทธิ์ทางเภสัช เมื่อพบว่าสารประกอบมีคุณสมบัติดังกล่าวที่เหมาะสมแล้ว จึงจะเข้าสู่กระบวนการทดสอบการรักษาในทางคลินิกเป็นขั้นตอนต่อไป ก่อนที่จะได้การยอมรับและผลิตเป็นยาดำรับใหม่ขึ้นมา จากกระบวนการค้นหายาใหม่ที่กล่าวมาข้างต้นนี้ ในส่วนของการตรวจวิเคราะห์คุณสมบัติของสารที่คาดว่าจะนำมาผลิตเป็นยาใหม่ จำเป็นต้องตรวจสอบคุณสมบัติทั้งทางกายภาพและเคมี (physicochemical properties) อันได้แก่ การดูดซึม (absorption) การกระจายตัวของยา (distribution) กระบวนการเมตาบอลิซึม (metabolism) และกระบวนการกำจัดยาออกจากร่างกาย (excretion) ซึ่งการทดสอบสมบัติเหล่านี้จะทำทั้งแบบภายในหลอดทดลอง (in-vitro) และทำในสัตว์ทดลอง (in vivo)

โดยทั่วไปคำว่า “ไลโปฟิลิซิตี (lipophilicity)” จะหมายถึง ความสามารถในการละลายได้ของสารชนิดหนึ่งๆ ระหว่างในชั้นน้ำและในชั้นไขมัน ณ สภาวะสมดุล (equilibrium) ค่าไลโปฟิลิซิตีของสารนิยมรายงานเป็นตัวเลขในรูปของค่าสัมประสิทธิ์การกระจายตัวของสาร (partition coefficient, P หรือบางครั้งอาจใช้คำว่า distribution coefficient, D) ความหมายของคำว่า ไลโปฟิลิซิตี ในเชิงเภสัชของยานั้น จะบ่งบอกถึงความสามารถของตัวยาในการกระจายตัวผ่านเข้าสู่เซลล์ผ่านทางเยื่อหุ้มเซลล์ (cell membrane) ซึ่งใน ส่วนประกอบของเยื่อหุ้มเซลล์นั้น จะประกอบไปด้วยไบเลเยอร์ของฟอสโฟลิปิด (phospholipid bilayer) โดยมีโครงสร้างส่วนที่มีหมู่ฟอสเฟตเป็นแบบชอบน้ำ (hydrophilic) และส่วนโครงสร้างสายยาวของกรดไขมัน เป็นส่วนที่ไม่ชอบน้ำ (hydrophobic) โดยทั่วไปการทดสอบหาค่าไลโปฟิลิซิตีของยาแบบภายในหลอดทดลอง จะนิยมใช้ออกทานอล (1-octanol) เป็นแบบจำลองแทนเยื่อหุ้มเซลล์ เนื่องจากออกทานอลมีสมบัติ คล้ายคลึงกับเยื่อหุ้มเซลล์ในแง่ที่ว่ามีส่วนที่เป็นหมู่ไฮดรอกซิล (-OH) ซึ่งชอบน้ำ และส่วนของ ไฮโดรคาร์บอนสายยาวที่ไม่ชอบน้ำ ดังนั้นการหาค่าไลโปฟิลิซิตีของยา จึงทำได้โดยหาค่าสัมประสิทธิ์การกระจายตัวของยาระหว่างในชั้นน้ำกับชั้นออกทานอล ณ สภาวะสมดุล ค่าตัวเลขที่คำนวณได้มักคำนวณให้อยู่ในรูปลอการิทึม ( $\log P$ ) ค่าไลโปฟิลิซิตี เป็นสมบัติที่สำคัญอย่างหนึ่งที่มีมักจะนำมาใช้เป็นเกณฑ์ตัดสินว่า สารประกอบที่ค้นพบขึ้นมาใหม่มีคุณสมบัติที่เหมาะสมต่อการนำไปพัฒนาเป็นยาหรือไม่

นอกเหนือจากการใช้ค่า  $\log P$  ในการทำนายการนำส่งยาเข้าสู่เซลล์แล้ว ค่า  $\log P$  นี้ยังสามารถใช้ในการทำนายโอกาสการสะสมหรือการตกค้างของสารเคมีในสิ่งแวดล้อมได้ด้วย หน่วยงานทางสิ่งแวดล้อม

ของสหรัฐอเมริกาที่มีชื่อว่า The Environmental Protection Agency (EPA) ใช้ค่า log P ในการประเมินหาโอกาสการตกค้างและความเป็นพิษของสารเคมีจำพวก ยาฆ่าแมลง และยากำจัดวัชพืช ในแหล่งน้ำหรือในดิน ปัจจุบันหลายประเทศเริ่มมีการใช้ค่า log P เป็นดัชนีในการประเมินค่าการสะสมของสารเคมีในสิ่งแวดล้อมแล้วเช่นกัน

วิธีดั้งเดิมสำหรับการวิเคราะห์หาค่า log P เป็นวิธีที่เรียกว่า shake flask method หลักการของวิธีนี้ก็คือ เติมหตัวอย่างยาที่สนใจจะวิเคราะห์ลงในกรวยแยก (separation funnel) ที่บรรจุของผสมระหว่างออกทานอลและน้ำไว้ จากนั้นทำการเขย่าเพื่อให้ตัวยาระบายเข้าสู่ทั้งชั้นออกทานอลและชั้นน้ำ จนกระทั่งถึงจุดสมดุล จากนั้นจึงนำของเหลวแต่ละชั้นมาวัดค่าการดูดกลืนแสงในช่วงยูวี (UV spectrometry) เพื่อหาปริมาณของตัวยาที่กระจายอยู่ในของเหลวแต่ละชั้น ด้วยวิธีเช่นนี้ การคำนวณหาปริมาณของตัวยา จะต้องมีการทำการทดลองเพื่อสร้างกราฟมาตรฐาน (calibration curve) ขึ้นมาสำหรับการเปรียบเทียบและคำนวณเป็นความเข้มข้นของตัวยาในของเหลวแต่ละชั้น ข้อดีสำหรับวิธี shake flask ก็คือ เป็นวิธีการหา log P โดยตรง (direct measurement) มีขั้นตอนที่ง่าย ไม่ซับซ้อน และที่สำคัญวิธีนี้ยังถือเป็นวิธีมาตรฐานสำหรับการหาค่าสัมประสิทธิ์การกระจายตัวของสาร ตามที่กำหนดไว้โดย the Organization for Economic Co-operation and Development (OECD) แต่ข้อเสียสำหรับวิธีนี้ก็คือ จะต้องมีการสร้างกราฟมาตรฐานสองเส้น ทั้งที่เป็นของชั้นออกทานอลและชั้นน้ำก่อนเสมอ เพื่อใช้ในการเทียบหาค่าความเข้มข้นของตัวยาที่สนใจวิเคราะห์หลังจากเกิดการกระจายตัวในของเหลวทั้งสองชั้น ซึ่งขั้นตอนนี้จะทำให้เสียเวลาในการวิเคราะห์เป็นอย่างมาก

ข้อเสนอโครงการวิจัยขั้นนี้ จะทำการพัฒนาวิธีการวิเคราะห์หาค่าสัมประสิทธิ์การกระจายตัวแบบใหม่ ซึ่งวิธีใหม่จะมีจุดเด่นตรงที่ไม่ต้องสร้างกราฟมาตรฐานในการเทียบหาความเข้มข้นของยาที่สนใจทั้งในชั้นออกทานอลและของเหลว ดังนั้น เมื่อไม่มีการสร้างกราฟมาตรฐาน วิธีการใหม่นี้จึงมีขั้นตอนซับซ้อนน้อยลง และใช้เวลาในการวิเคราะห์ที่น้อยลงด้วย ข้อเสนอโครงการวิจัยนี้จึงถูกคาดหวังว่า จะเป็นวิธีใหม่ที่รวดเร็วและเหมาะสมกับการนำไปประยุกต์ใช้หาค่าสัมประสิทธิ์การกระจายตัวของยา เพื่อใช้ในขั้นตอนการตรวจสอบคุณสมบัติสำหรับงานทางด้านเภสัชวิทยาใหม่

## 1.2 วัตถุประสงค์ของการวิจัย

1.2.1 เพื่อพัฒนาวิธีการใหม่สำหรับการวิเคราะห์หาค่าสัมประสิทธิ์การกระจายตัวของยา

1.2.2 นำวิธีที่ได้พัฒนาขึ้นไปใช้ในการประยุกต์หาค่าสัมประสิทธิ์การกระจายตัวของยา ในขั้นตอนการตรวจสอบคุณสมบัติของยาใหม่

### 1.3 ขอบเขตของการวิจัย

ค่าสัมประสิทธิ์การกระจายของสาร เป็นข้อมูลที่มีประโยชน์มากในแง่ของการพัฒนาใหม่ และยังเป็นพารามิเตอร์สำคัญที่ใช้ในการติดตามและเฝ้าระวังทางสิ่งแวดล้อม แต่ในข้อเสนอโครงการวิจัยชิ้นนี้ จะเน้นไปทางด้านการพัฒนาวิธีการหาค่าสัมประสิทธิ์การกระจายของยา เพื่อใช้เป็นข้อมูลในงานทางด้านการศึกษา ค้นคว้าใหม่เท่านั้น โดยคาดหวังว่าวิธีที่จะพัฒนาขึ้นนี้ จะมีความถูกต้อง (accuracy) และแม่นยำ (precision) รวมทั้งเป็นวิธีที่ง่ายและสะดวกต่อการนำไปใช้ตรวจสอบคุณสมบัติยาใหม่ โดยมีขอบเขตของการวิจัย ดังนี้

- 1.3.1 พัฒนาการคำนวณสมการหาค่าสัมประสิทธิ์การกระจายตัว (partition coefficient,P)
- 1.3.2 ทำการทดลองเพื่อหาค่าสัมประสิทธิ์การกระจายตัวของตัวชนิดต่างๆ ด้วย สมการที่พัฒนาขึ้น
- 1.3.3 ทำการเปรียบเทียบค่าสัมประสิทธิ์การกระจายตัว ที่ได้จากวิธีที่พัฒนาขึ้นกับสัมประสิทธิ์การกระจายตัวที่ได้จากเอกสารอ้างอิง

### 1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

ได้วิธีการคำนวณหาค่าสัมประสิทธิ์การกระจายตัวแบบใหม่ ซึ่งมีข้อดีกว่าวิธีแบบเดิมคือ ไม่ต้องใช้กราฟมาตรฐาน ทำให้วิธีการทดลองง่ายและรวดเร็วขึ้น

## บทที่ 2

### แนวคิด ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง/การทบทวนวรรณกรรม

#### 2.1 สัมประสิทธิ์การกระจายตัว (partition coefficient, $P_{ow}$ )[1]

ในการหาค่า lipophilicity ของยา ทำได้โดยการหาสัมประสิทธิ์การกระจายตัว (partition coefficient,  $P$ ) ซึ่งเป็นค่าที่บอกถึงความสามารถในการละลายของสารในตัวทำละลาย 2 ชนิด ที่ไม่สามารถผสมกันได้ (immiscible) โดยทั่วไปจะใช้ตัวทำละลายอินทรีย์คือ ออกทานอล (n-octanol) แทนชั้นไขมันของเยื่อหุ้มเซลล์ (membrane) และใช้ฟอสเฟตบัพเฟอร์แทนของเหลวที่อยู่ภายนอกเซลล์ และจะเรียกค่าสัมประสิทธิ์การกระจายตัวนี้เรียกว่า ค่าสัมประสิทธิ์การกระจายตัวของสารในชั้นน้ำและชั้นออกทานอล (n-octanol/water partition coefficient,  $P_{ow}$ )

ขั้นตอนการหาค่าสัมประสิทธิ์การกระจายตัวของสารในชั้นน้ำและชั้นออกทานอลทำได้โดย ปล่อยให้สารกระจายตัวในตัวทำละลายทั้ง 2 ชนิด จนถึงภาวะสมดุล แล้วหาความเข้มข้นของสารในสารละลายแต่ละชนิด จากนั้นนำมาคำนวณหาค่าสัมประสิทธิ์การกระจายตัว ดังสมการ

$$P_{ow} = \frac{C_{oct}}{C_{water}} \quad (1)$$

เมื่อ  $P_{ow}$  คือ สัมประสิทธิ์การกระจายตัวของสารในระหว่างชั้นออกทานอลและชั้นน้ำ

$C_{oct}$  คือ ความเข้มข้นเป็นโมลาร์ของสารในชั้นออกทานอล

$C_{water}$  คือ ความเข้มข้นเป็นโมลาร์ของสารในชั้นน้ำ

โดยปกติค่าสัมประสิทธิ์ที่ได้จะแสดงอยู่ในรูปของลอการิทึม หรือ  $\log P_{ow}$  เพื่อให้ค่าอยู่ในหลักหน่วยซึ่งง่ายต่อการอ้างอิงและเปรียบเทียบความเป็นขั้วของโมเลกุล ดังนั้น

$$\log P_{ow} = \log \frac{C_{oct}}{C_{water}} \quad (2)$$

ค่า  $\log P_{ow}$  จะบอกถึงความชอบในกระจายตัวเข้าไปอยู่ในชั้นน้ำหรือชั้นน้ำมันของสารเคมี โดยถ้าค่า  $\log P_{ow} < 1$  แสดงว่าสารละลายในชั้นน้ำได้ดีกว่าชั้นน้ำมัน ถ้าสารนี้เข้าไปอยู่ในร่างกายก็จะกระจายตัวใน

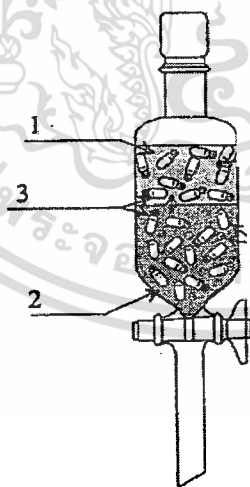
ส่วนที่เป็นของเหลวในร่างกายได้ดี แต่ถ้าค่า  $\log P_{ow} > 1$  แสดงว่าสารชอบที่จะละลายในชั้นน้ำมันมากกว่า นั่นคือสารนี้จะสะสมในร่างกายบริเวณที่เป็นชั้นไขมัน ได้ดีกว่านั่นเอง

## 2.2 วิธีดั้งเดิมที่ใช้ในการหาค่าสัมประสิทธิ์การกระจายตัว (partition coefficient, $P_{ow}$ )

ในการทำการทดลองหาค่าสัมประสิทธิ์การกระจายตัว (partition coefficient,  $P_{ow}$ ) นั้นสามารถทำได้หลากหลายเทคนิควิธี โดยในแต่ละวิธีจะมีข้อดีและข้อเสียแตกต่างกันไป ซึ่งวิธีในการหาค่า  $P_{ow}$  ของยาในชั้นออกทานอล และน้ำ มีหลายวิธี ดังนี้

### 2.2.1 Shake - flask method [2,3]

วิธีนี้เป็นมาตรฐาน ของ OECD (Organisation for Economic Cooperation and Development) [3] เป็น การทำการสกัดยาในระหว่างชั้นออกทานอลและชั้นน้ำ เขย่าด้วยยาให้กระจายตัวใน separation funnel จากนั้น ตั้งทิ้งไว้จน equilibrium แล้วทำการดูดสารแต่ละชั้นที่จุด equilibrium มาวิเคราะห์หาความเข้มข้น เพื่อใช้ในการหาค่าสัมประสิทธิ์การกระจายตัว (partition coefficient,  $P_{ow}$ )



ภาพที่ 2.1 การแยกสารด้วยวิธี Shake-flask 1 = ชั้นออกทานอล, 2 = ชั้นน้ำ, 3= โมเลกุลของยา

**ข้อดี**

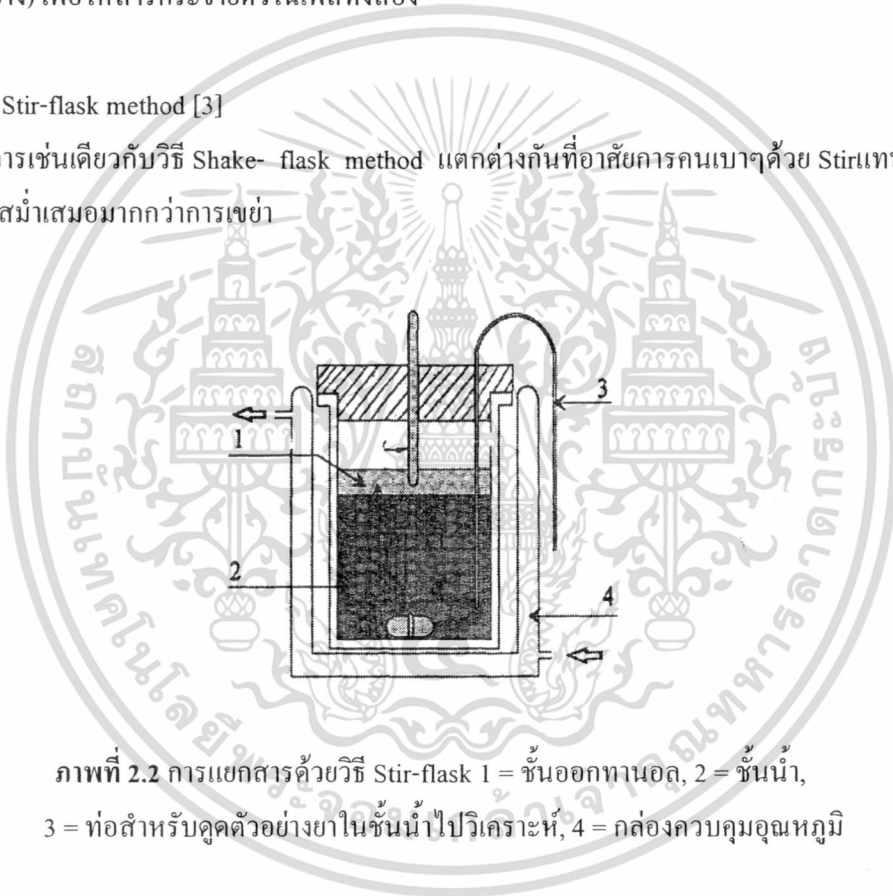
เป็นวิธีมาตรฐาน OECD ทำให้ข้อมูลที่ได้มีความน่าเชื่อถือ นอกจากนี้ วิธี Shake - flask method ยังสามารถทำได้ง่าย เนื่องจากใช้เครื่องมือพื้นฐานที่มีในห้องปฏิบัติการ

**ข้อเสีย**

ในการทำการทดลองใช้เวลาในการวิเคราะห์นาน เนื่องจากต้องใช้เวลาในการเขย่านาน (มากกว่า 30 นาทีต่อตัวอย่าง) เพื่อให้สารกระจายตัวในเฟสทั้งสอง

**2.2.2 Stir-flask method [3]**

หลักการเช่นเดียวกับวิธี Shake - flask method แตกต่างกันที่อาศัยการคนเบาๆ ด้วย Stir แทนการเขย่า ซึ่งจะมีความสม่ำเสมอมากกว่าการเขย่า



ภาพที่ 2.2 การแยกสารด้วยวิธี Stir-flask 1 = ชั้นออกทานอล, 2 = ชั้นน้ำ, 3 = ท่อสำหรับดูดตัวอย่างยาในชั้นน้ำไปวิเคราะห์, 4 = กล้องควบคุมอุณหภูมิ

**ข้อดี**

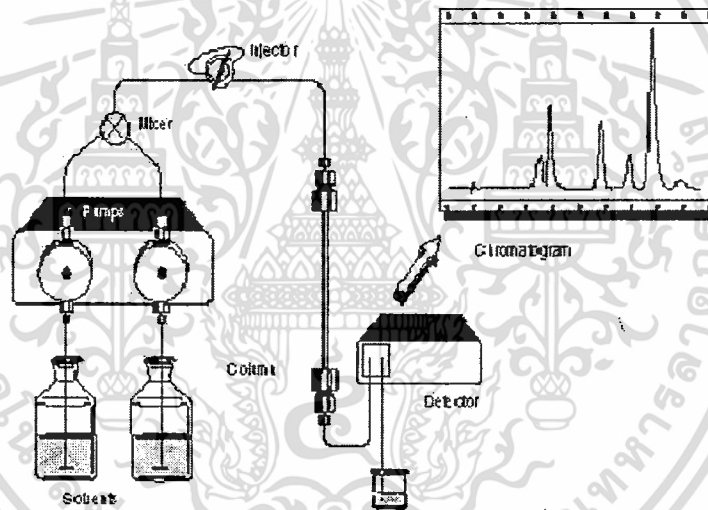
วิธี Stir-flask method จะแรงในการคนคงที่ และสามารถควบคุมได้ ทำให้มีโอกาสเกิดอิมัลชันน้อยกว่าวิธี Shake flask

**ข้อเสีย**

เนื่องจากวิธีนี้จะใช้การคนเบาๆ ด้วย Stirrer จึงทำให้การสกัดเข้าสู่ equilibrium ช้า

### 2.2.3 High-Performance Liquid Chromatography (HPLC) [4-6]

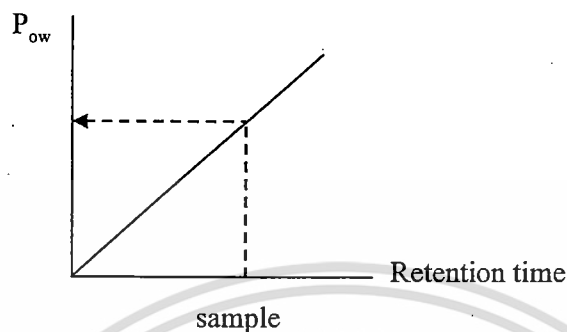
เป็นเครื่องมือสำหรับแยกสาร โดยใช้เฟส 2 เฟส คือ เฟสอยู่กับที่ (column) กับ เฟสเคลื่อนที่ (mobile phase) สารจะถูกแยกออกมาในเวลาที่แตกต่างกัน (Retention time, RT) ซึ่งสารผสมที่อยู่ในตัวอย่างสามารถถูกแยกออกจากกันได้นั้นขึ้นอยู่กับความสามารถในการ ละลายได้ดีของสารนั้นกับ mobile phase หรือ stationary phase สารประกอบตัวไหนที่ สามารถละลายได้ดีกับ mobile phase สารนั้นก็就会被แยกออกมา ก่อนส่วนสารที่ละลายได้ไม่ดีกับ mobile phase หรือละลายได้ดีกับ stationary phase ก็จะถูกแยกออกมาที หลัง โดยสารที่ถูกแยกออกมาได้นี้จะถูกตรวจวัดสัญญาณด้วยตัวตรวจวัด สัญญาณที่บันทึกได้จากตัวตรวจวัด จะมีลักษณะเป็นพีค ซึ่งจะเรียกว่า โครมาโตแกรม



ภาพที่ 2.3 ส่วนประกอบของเครื่อง High-Performance Liquid Chromatography (HPLC)

ค่า  $P_{ow}$  สามารถหาได้จากการทำงานทดลอง โดยฉีดสารละลายมาตรฐานยาต่างๆ ที่ทราบค่า  $P_{ow}$  เข้าเครื่อง HPLC แล้วนำค่า retention time ของสารละลายมาตรฐานยาต่างๆ ที่ได้มาทำการเปรียบเทียบกับค่า retention time ของสารละลายตัวอย่างยา เพื่อทำการเทียบหาเป็นค่า  $P_{ow}$  ของตัวอย่างยา ดังแสดงในรูปที่ 2.4

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



ภาพที่ 2.4 แสดงการเทียบค่า Retention time ของตัวอย่างกับสารมาตรฐานยาที่ทราบค่า  $P_{ow}$  เพื่อวิเคราะห์หาค่า  $P_{ow}$  ของสารตัวอย่าง

#### ข้อดี

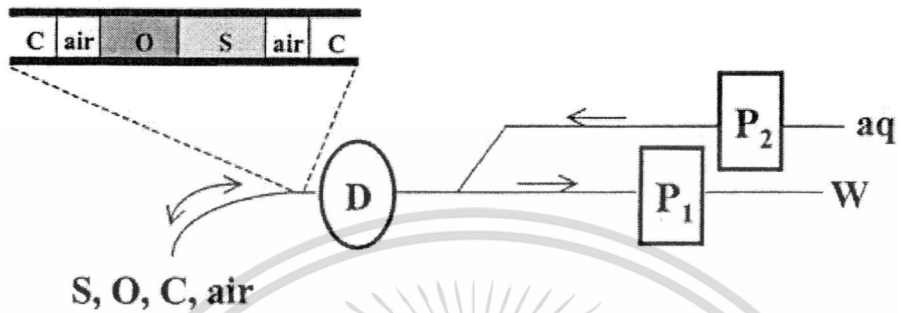
วิธี High-Performance Liquid Chromatography (HPLC) รวดเร็วกว่า Stir-flask method และ Shake-flask method เนื่องจากไม่ต้องทำกราฟมาตรฐานทั้งสองเฟส ทำกราฟมาตรฐานของค่า retention time, RT ก็สามารถหาค่า  $P_{ow}$  ได้แล้ว

#### ข้อเสีย

เครื่องมือมีราคาแพง วิธีนี้เป็นวิธีการวิเคราะห์ทางอ้อม เนื่องจากค่า  $P_{ow}$  ที่ได้จากการเปรียบเทียบกับค่าอ้างอิงที่ได้จากวิธีมาตรฐานไม่ได้ นอกจากนี้ในการวิเคราะห์ต้องใช้ Referent standard หลายๆตัว ที่มีค่าสัมประสิทธิ์การกระจายตัว แตกต่างกันมาใช้ในการสร้าง  $P_{ow}$  calibration และต้องทราบโครงสร้างของยา เพื่อที่จะหาสารมาตรฐานที่มีสูตร โครงสร้างใกล้เคียงกัน มาทำการเปรียบเทียบ เพื่อให้ได้ค่า  $P_{ow}$  ที่ถูกต้องมากที่สุด

#### 2.2.4 Flow injection method (FIA) [7-9]

เป็นการสกัดภายในท่อ โดยอาศัยวิธีการลำเลียงสารตัวอย่างยา ออกทานอลและน้ำ เข้ามาได้ลักษณะเป็นท่อนแบบต่อเนื่อง แล้วไหลเข้าสู่ detector เพื่อทำการตรวจวัดสัญญาณโดยอัตโนมัติ ตัวอย่างการสกัดโดยอาศัยระบบ FIA แสดงดังในภาพที่ 2.5



ภาพที่ 2.5 ส่วนประกอบของเครื่อง Flow injection สำหรับการวิเคราะห์หาค่า  $P_{ow}$  s, aqueous sample; o, octanol; c, carrier solution (water); air, airplugs introduced before and after the sample and octanol phases;  $P_1$  and  $P_2$ , pumps; D, detector

### ข้อดี

วิธี Flow injection method สามารถวิเคราะห์สารได้ต่อเนื่องโดยไม่ต้องเขย่าหรือกวนซึ่งสามารถวิเคราะห์แสดงผลออกมาได้เลย ทำให้วิธีนี้รวดเร็วกว่า Stir-flask method และ Shake-flask method

### ข้อเสีย

เครื่องมือมีราคาแพง อุปกรณ์เยอะ ในการตั้งระบบมีความยุ่งยากและซับซ้อน

วิธีวิเคราะห์หาค่าสัมประสิทธิ์การกระจายตัว (partition coefficient,  $P_{ow}$ ) ที่กล่าวมาข้างต้น สามารถเปรียบเทียบข้อดีข้อเสียของแต่ละวิธี ได้ดังตารางที่ 1.1

ตารางที่ 1.1 เปรียบเทียบข้อดีข้อเสียของแต่ละวิธีในการวิเคราะห์หาค่าสัมประสิทธิ์การกระจายตัวของสาร

วิธีที่ใช้ในการหาค่า partition coefficient ( $P_{ow}$ )	ข้อดี	ข้อเสีย
Shake-flask method	<ul style="list-style-type: none"> <li>- เป็นวิธีมาตรฐาน OECD ให้ข้อมูลน่าเชื่อถือ</li> <li>- สามารถทำได้ง่าย</li> <li>- ใช้เครื่องมือพื้นฐานในห้องปฏิบัติการ</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- ต้องสร้างกราฟมาตรฐานของสารทั้งในชั้นออกทานอลและชั้นน้ำ ทำให้ยุ่งยาก และใช้เวลาในการวิเคราะห์นาน</li> <li>- มีโอกาสเกิด emulsion ได้ง่าย</li> </ul>
Stir-flask method	<ul style="list-style-type: none"> <li>- แรงที่ใช้ในการคนคงที่และสามารถควบคุมได้</li> <li>- โอกาสที่จะเกิด Emulsion น้อยกว่าแบบ Shake-flask method</li> <li>- ใช้เครื่องมือพื้นฐานในห้องปฏิบัติการ</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- สารใช้เวลาในการเข้าสู่จุดสมดุลนานมากขึ้น เมื่อเทียบกับวิธี shake-flask method</li> <li>- ต้องสร้างกราฟมาตรฐานของสารทั้งในชั้นออกทานอลและชั้นน้ำ ทำให้ยุ่งยาก และใช้เวลาในการวิเคราะห์นาน</li> </ul>
High-Performance Liquid Chromatography (HPLC)	<ul style="list-style-type: none"> <li>- รวดเร็วกว่า Stir-flask method และ Shake-flask method</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- ราคาแพง</li> <li>- เป็นวิธีอ้อม</li> <li>- หา standard ที่เหมาะสมได้ยาก</li> </ul>
Flow injection method (FIA)	<ul style="list-style-type: none"> <li>- วิเคราะห์ได้ต่อเนื่อง</li> <li>- ไม่ต้องเขย่าหรือกวน</li> <li>- รวดเร็วกว่า Stir-flask method และ Shake-flask method</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- อุปกรณ์เยอะ ราคาสูง</li> <li>- ตั้งระบบยุ่งยาก, ซับซ้อน</li> </ul>

### 2.3 วิธีใหม่สำหรับการวิเคราะห์หาค่า $\log P_{ow}$

เมื่อเปรียบเทียบจุดเด่นและจุดด้อยดังแสดงในตารางที่ 2 พบว่า ถึงแม้วิธี shake-flask method จะใช้เวลาในการวิเคราะห์นานกว่าเทคนิคทางโครมาโทกราฟี แต่การหาค่าสัมประสิทธิ์การกระจายตัวของสารโดยวิธีนี้ เป็นวิธีการวิเคราะห์โดยตรง ทำให้ค่าสัมประสิทธิ์การกระจายตัวของสารที่หาได้มีความสอดคล้องกับค่าการกระจายตัวของสารเข้าสู่เซลล์ในร่างกายจริง ในขณะที่การใช้เทคนิคทางโครมาโทกราฟีนั้นเป็นการหาแบบทางอ้อม (indirect measurement) โดยจะต้องอาศัยความสัมพันธ์ระหว่างค่าเวลาการคงอยู่ของ

สารในคอลัมน์ (retention time) และค่า capacity factor ของระบบในการคำนวณเปรียบเทียบกับเป็นค่า  $\log P$  ซึ่งวิธีนี้มีโอกาสให้ผลการวิเคราะห์ที่คลาดเคลื่อนมากกว่าวิธี shake-flask method เนื่องจากมีข้อจำกัดในเรื่องการเลือกใช้เฟสคงที่ (stationary phase) และเฟสเคลื่อนที่ (mobile phase) ที่เหมาะสม สารมาตรฐานที่เลือกใช้ต้องมีโครงสร้างใกล้เคียงกับสารตัวอย่าง และสภาวะที่ใช้ในการทดลองจะต้องคงที่ตลอดทุกครั้งที่ทดลอง เป็นต้น

นอกจากนี้ วิธี shake-flask method ยังมีช่วงกว้างในการวิเคราะห์หาค่า  $\log P$  ได้ตั้งแต่ -2 ถึง 4 ซึ่งโดยปกติแล้วยาจะถูกออกแบบให้มีค่า  $\log P$  อยู่ในช่วง 1 ถึง 4 เนื่องจากช่วงดังกล่าวนี้เป็นค่าที่เหมาะสมของการแพร่กระจายเข้าสู่เซลล์ วิธี shake-flask method นี้จึงน่าจะเหมาะสมกับการนำไปประยุกต์ใช้หาค่า  $\log P$  ของสารประกอบที่สนใจ เพื่อใช้เป็นเกณฑ์ในการตัดสินใจในการคัดเลือกเพื่อพัฒนาเป็นยาขึ้นมาใหม่ต่อไป

ดังนั้นในข้อเสนองานวิจัยชิ้นนี้ จึงได้ทำการพัฒนาวิธีการวิเคราะห์หาค่า  $\log P$  แบบใหม่โดยอาศัยการพัฒนาต่อยอดมาจากวิธี shake-flask method แต่ไม่อาศัยกราฟมาตรฐานในการเทียบหาความเข้มข้น โดยคาดหวังว่าวิธีใหม่นี้จะช่วยลดขั้นตอนการวิเคราะห์และลดเวลาในการวิเคราะห์ให้น้อยลงด้วย

## บทที่ 3

### วิธีดำเนินการวิจัย

#### 3.1 สารเคมีที่ใช้ในการทดลอง

1. Dibasic Sodium Phosphate
2. Monobasic Sodium Phosphate
3. n-Octanol
4. สารตัวอย่างยา เช่น พาราเซตามอล, คาเฟอีน, อะนิลีน และไรโบฟลาวิน เป็นต้น

#### 3.2 อุปกรณ์และเครื่องมือที่ใช้ในการทดลอง

1. Beaker 2 ใบ ขนาด 250 และ 50 mL
2. ขวดวัดปริมาตรขนาด 1 L 3 ขวด
3. หลอดทดลองขนาด 50 mL 10 หลอด
4. ปิเปตขนาด 10 mL 3 อัน
5. บิวเรตขนาด 50 mL 2 อัน
6. ที่จับยึดบิวเรตพร้อมขาตั้ง 2 อัน
7. หลอดหยด และแท่งแก้วคนสาร
8. ขวดน้ำกลั่น
9. เครื่องวัด pH
10. เครื่องชั่งสาร
11. เครื่อง shaker
12. เครื่อง UV-visible Spectrophotometer (Perkin Elmer)

#### 3.3 การเตรียมสารเคมี

##### 3.3.1 ขั้นตอนการเตรียมสารละลายบัฟเฟอร์ pH=7.4

ชั่ง Dibasic Sodium Phosphate มา 7.8 กรัม เติมน้ำกลั่นและปรับปริมาตร 1000 mL จะได้ Dibasic Sodium Phosphate 0.05 M และชั่ง Monobasic Sodium Phosphate มา 8.9 กรัม เติมน้ำกลั่นและปรับปริมาตร 1000 mL จะได้ Monobasic Sodium Phosphate 0.05 M จากนั้นนำ Dibasic Sodium Phosphate 0.05 M และ

Monobasic Sodium phosphate 0.05 M ผสมกันในอัตราส่วน 40.50 : 9.50 (mL) ตามลำดับ จะได้ปริมาตรเท่ากับ 50 mL ซึ่งเป็น Phosphate Buffer pH = 7.4

### 3.3.2 การเตรียมสารละลายอิมิตัวของออกทานอล และบัฟเฟอร์

ทำโดยการนำออกทานอลและบัฟเฟอร์เทลงใน separation funnel เดียวกันจากนั้นเขย่าและ ตั้งทิ้งไว้ 24 ชั่วโมง จากนั้นไขสารละลายที่ละชั้นออกมาจาก separation funnel แยกเก็บใส่ขวดจะได้สารละลายออกทานอลอิมิตัว (octanol sat.with PBS) และสารละลายบัฟเฟอร์ที่อิมิตัว (PBS sat.with octanol)

### 3.3.3 การเตรียมสารละลายตัวอย่างยา

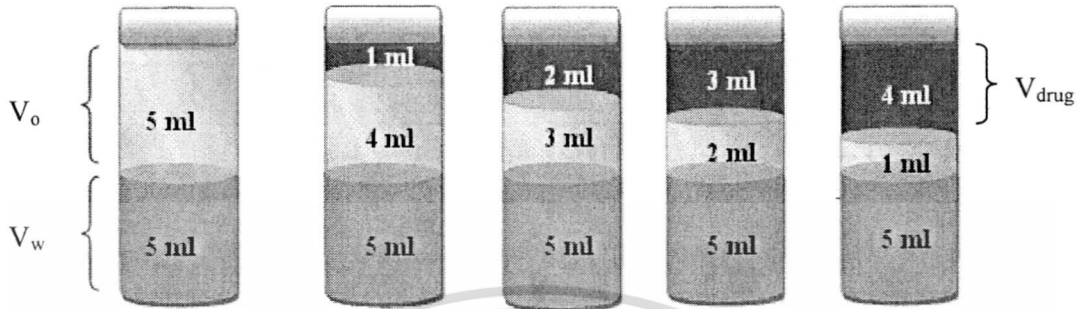
ซึ่งเตรียมได้จาก ชั่งน้ำหนักยาที่แน่นอน ความละเอียด 4 ตำแหน่ง นำมาละลายใน octanol (sat.with PBS) นำไปเขย่าด้วย เครื่อง shaker แล้วตรวจวิเคราะห์ด้วยเครื่อง UV-visible Spectrophotometer ให้ได้ค่าการดูดกลืนแสงของสาร (absorbance) อยู่ในช่วง 1.0 - 1.5 ค่าการดูดกลืนแสงนี้ เรียกว่า ค่าการดูดกลืนแสงเริ่มต้น หรือค่าการดูดกลืนแสงหลังการสกัด (Initial Absorbance,  $A_0$ )

## 3.4 วิธีดำเนินการทดลอง

### 3.4.1 ขั้นตอนการทดลอง

ทำการปิเปตสารตัวอย่างที่เตรียมในชั้นออกทานอลมา 5 mL ใส่ลงในหลอดทดลอง แล้วเติมสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ pH 7.5 ลงไปอีก 5 mL จากนั้นจึงทำการเขย่าเพื่อให้สารตัวอย่างกระจายตัวเข้าสู่ของเหลวทั้งสองเฟส จนกระทั่งการกระจายตัวของสารตัวอย่างเข้าสู่สมดุล จึงทำการดูดสารในชั้นออกทานอลมาวัดค่าการดูดกลืนแสง และค่าที่วัดได้นี้คิดเป็นค่าการดูดกลืนแสงหลังการสกัด (Final absorbance,  $A_f$ )

ทำการทดลองคล้ายกับหลอดทดลองแรกแต่ทำการปรับเปลี่ยนปริมาตรของสารตัวอย่างที่ใช้ ทำได้โดยการปิเปตสารตัวอย่างที่เตรียมในชั้นออกทานอลมาในปริมาตรต่างๆ เช่น 1, 2, 3, 4 mL ใส่ลงในหลอดทดลองแต่ละหลอด ปริมาตรนี้เรียกว่า  $V_{drug}$  จากนั้นเติมออกทานอลลงไปเพื่อปรับปริมาตรของชั้นออกทานอลรวมให้เป็น 5 mL ปริมาตรของออกทานอลที่เติมลงไปนี้เรียกว่า  $V_0$  จากนั้นทำการเติมฟอสเฟตบัฟเฟอร์ลงไป 5 mL ปริมาตรนี้คือ  $V_w$  (ในการทดลอง จะต้องควบคุมให้ปริมาตรของออกทานอลและฟอสเฟตบัฟเฟอร์คงที่เสมอ นั่นคือ 5 mL : 5 mL) ทำการเขย่าจนกระทั่งสารตัวอย่างเข้าสู่สมดุลของการกระจายตัวในทั้งสองเฟส จึงนำสารในชั้นออกทานอลไปวัดค่าการดูดกลืนแสงของสาร และค่าที่วัดได้นี้คิดเป็นค่า  $A_f$  แผนการทดลองแสดงอย่างง่ายแสดงดังในรูปที่ 3.1



รูปที่ 3.1 แสดงสัดส่วนปริมาตรของสารละลายตัวอย่าง ออกทานอล และฟอสเฟตบัฟเฟอร์ที่ใช้ในการทดลองเพื่อหาค่า  $P_{ow}$  ของยา

เมื่อเตรียมสารละลายครบทุกชุดตัวอย่าง ก็นำไปเขย่าด้วยเครื่อง shaker เพื่อให้ตัวยา Partition เข้าสู่สารละลายทั้ง 2 เฟส จากนั้นนำมาตั้งทิ้งไว้ให้เกิดการแยกชั้นคู่คั่น octanal ไปวิเคราะห์ด้วยเครื่อง UV-visible spectrophotometer จะได้ค่าการดูดกลืนแสง (absorbance) ของสารละลายตัวอย่างยาที่ความเข้มข้นต่างๆ ( $A_i$ ) นำค่า absorbance ที่ได้มาคำนวณหาค่าสัมประสิทธิ์การกระจายตัว (partition coefficient,  $P_{ow}$ ) ซึ่งวิธีการคำนวณจะกล่าวในหัวข้อถัดไป

### 3.5 การพัฒนาวิธีการคำนวณแบบใหม่

เพื่อใช้ในการหาค่าสัมประสิทธิ์การกระจายตัว (partition coefficient,  $P_{ow}$ ) โดยอาศัยกฎของ Beer's จากสมการโดยทั่วไปในการหาค่าสัมประสิทธิ์การกระจายตัว (partition coefficient,  $P_{ow}$ ) หาได้จากสมการที่ 1 คือ

$$P_{ow} = \frac{C_{oct}}{C_{water}} \quad (1)$$

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ซึ่งสมการดังกล่าวมีความยุ่งยาก และใช้เวลานานในการคำนวณ ในงานวิจัยนี้จึงได้ทำการพัฒนาวิธีการคำนวณหาค่าสัมประสิทธิ์การกระจายตัว (partition coefficient,  $P_{ow}$ ) แบบใหม่ โดยอาศัยสมการ Beer's law คือ

$$A = \epsilon b C \quad (2)$$

หรือ  $A = \epsilon b (\text{mol}/V)$

หรือ  $\text{mol} = AV / \epsilon b$

เมื่อ  $A$  = ค่าการดูดกลืนแสงของสาร (absorbance)

$\epsilon$  = เป็นสมบัติจำเพาะของสารที่ดูดกลืนและวัดที่ความยาวค่าหนึ่ง

เรียกว่า molar absorptivity ( $L \text{ mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ )

$b$  = ระยะทางที่แสงผ่านตัวอย่าง หรือความกว้างของเซลล์ (cm)

$C$  = ความเข้มข้นซึ่งมีหน่วยเป็น โมล/ปริมาตร ( $V$ , mL)

ในการคำนวณหาค่าสัมประสิทธิ์การกระจายตัว (partition coefficient,  $P_{ow}$ ) โดยอาศัยสมการ Beer's law จะคำนวณหาได้จากจำนวนโมลก่อนและหลัง partition

จำนวนโมลของยาในชั้นออกทานอล ก่อนการสกัด เท่ากับ

$$\text{mol in octanol phase (ก่อนการสกัด)} = \frac{A_i V_{\text{drug}}}{\epsilon} \quad (3)$$

เมื่อ  $A_i$  = ค่าการดูดกลืนแสงของยาในชั้นออกทานอลก่อนทำการสกัด

$V_{\text{drug}}$  = ปริมาตรของตัวอย่างยา

จำนวนโมลของยาในชั้นออกทานอลหลังการสกัด เท่ากับ

$$\text{mol in octanol phase (หลังการสกัด)} = \frac{A_f V_o}{\epsilon} \quad (4)$$

เมื่อ  $A_f$  = ค่าการดูดกลืนแสงของยาในชั้นออกทานอลหลังทำการสกัด

$V_o$  = ปริมาตรรวมของชั้นออกทานอล

เพราะฉะนั้นจำนวนโมลของยาในชั้นน้ำ (ฟอสเฟตบัฟเฟอร์) หลังการสกัดเท่ากับ

$$\begin{aligned} \text{mol in buffer phase} &= \left[ \begin{array}{c} \text{mol in octanol} \\ \text{ก่อนการสกัด} \end{array} \right] - \left[ \begin{array}{c} \text{mol in octanol} \\ \text{หลังการสกัด} \end{array} \right] \\ &= \frac{A_i V_{\text{drug}} - A_f V_o}{\varepsilon} \end{aligned} \quad (5)$$

แทนค่าจำนวนโมล (mol = CV) ลงในสมการที่ (4) และ (5) จะได้ว่า  
ความเข้มข้นของยาในชั้นน้ำหลังการสกัด =  $(A_f V_{\text{drug}} - A_f V_o) / \varepsilon V_w$  (6)

และความเข้มข้นของยาในชั้นออกทานอลหลังการสกัด =  $A_f / \varepsilon$  (7)

แทนค่าความเข้มข้นของยาในชั้นออกทานอลและน้ำหลังการสกัด ตามสมการที่ (6) และ (7) ลงในสมการที่ (1) จะได้ว่า

$$P_{ow} = A_f V_w / (A_i V_{\text{drug}} - A_f V_o) \quad (8)$$

จัดสมการใหม่ให้อยู่ในรูป

$$A_i / A_f = [(V_w / P_{ow}) + V_o] (1 / V_{\text{drug}}) \quad (9)$$

เมื่อพลอตความสัมพันธ์ระหว่าง  $A_i / A_f$  และ  $1 / V_{\text{drug}}$  ในเชิงสมการเส้นตรง จะเห็นว่าสามารถหาค่า  $P_{ow}$  ได้จากความชันของกราฟ นั่นคือ

$$P_{ow} = V_w / (\text{slope} - V_o) \quad (10)$$

ดังนั้นในการหาค่าการพัฒนาวีธีการคำนวณแบบใหม่ เพื่อใช้ในการหาค่าสัมประสิทธิ์การกระจายตัว (partition coefficient,  $P_{ow}$ ) โดยอาศัย Beer's law จะใช้สมการที่ (10) ในการคำนวณ

## บทที่ 4 ผลการวิจัย

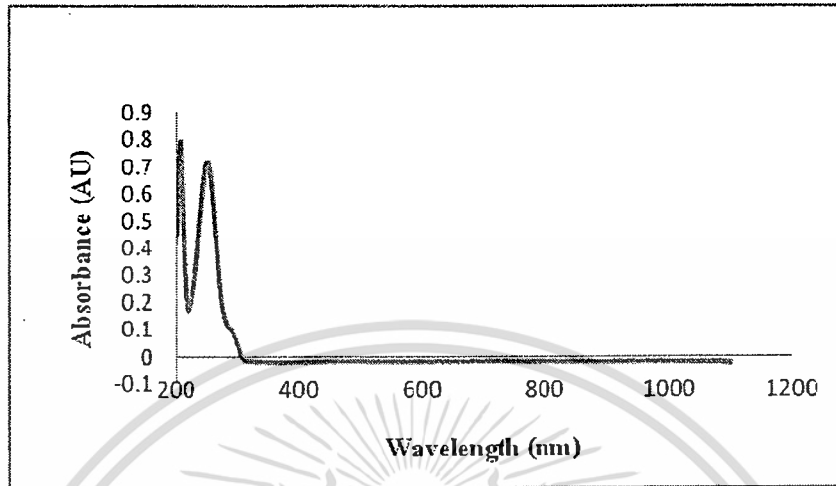
ค่าสัมประสิทธิ์การกระจายตัวของสารในชั้นน้ำและชั้นออกทานอลเป็นค่าที่ใช้ทำนายถึงความสามารถในการดูดซึมสารของเซลล์สิ่งมีชีวิต โดยวิธีที่นิยมในการวัดค่าสัมประสิทธิ์การกระจายตัวของสาร ได้แก่ วิธีการสั่นแบบเขย่า (shake-flask method) ซึ่งวิธีนี้จะต้องมีการหาค่าความเข้มข้นของสารที่ละลายอยู่ทั้งในชั้นออกทานอลและชั้นน้ำ โดยคำนวณได้จากการเทียบกราฟมาตรฐาน ในงานวิจัยนี้ จึงได้มีการพัฒนาวิธีใหม่เพื่อใช้ในการวัดค่าสัมประสิทธิ์การกระจายตัวของสารในชั้นน้ำและชั้นน้ำมัน ซึ่งวิธีที่ไม่จำเป็นต้องสร้างกราฟมาตรฐาน จึงทำให้เกิดความสะดวกมากขึ้น และลดเวลาที่ใช้ในการวิเคราะห์หลัง ซึ่งในงานวิจัยนี้จะทำการศึกษาตัวอย่างยา โดยยาที่ใช้ในการทดสอบ ได้แก่ พาราเซตามอล (Paracetamol), อะนิลีน (Aniline) และไรโบฟลาวิน (Riboflavin)

### 4.1 การหาค่าสัมประสิทธิ์การกระจายตัวของพาราเซตามอล

พาราเซตามอล (Paracetamol) หรือ อะเซตามิโนเฟน (Acetaminophen) มีสูตรโมเลกุล  $C_8H_9NO_2$  ชื่อสารเคมีในระบบ IUPAC คือ *N*-(4-hydroxyphenyl)acetamide มีค่าการดูดกลืนแสงสูงสุดที่ความยาวคลื่น 250 nm เป็นยาที่สามารถจำหน่ายได้โดยไม่ต้องมีใบสั่งแพทย์ มีฤทธิ์บรรเทาอาการปวดและลดไข้ ซึ่งเป็นยาพื้นฐานที่มักใช้เพื่อบรรเทาไข้ อาการปวดศีรษะ และอาการปวดเมื่อย และรักษาให้หายจากโรคหวัดและไข้หวัด

#### 4.1.1 การศึกษาความยาวคลื่นที่มีค่าการดูดกลืนแสงสูงสุดของพาราเซตามอล

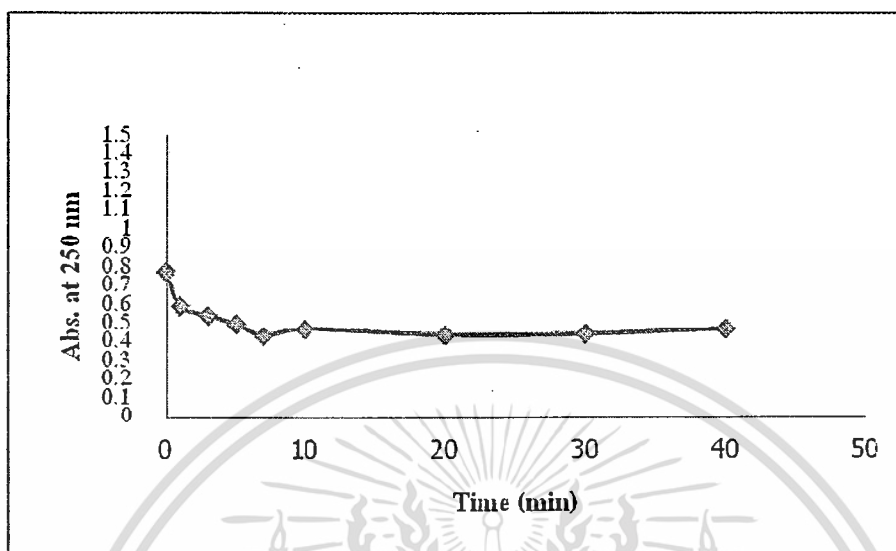
จากการทดลอง นำสารละลายพาราเซตามอล ที่เตรียมได้มา scan หาความยาวคลื่นที่มีค่าการดูดกลืนแสงสูงสุด ซึ่งได้ผลการทดลองดังภาพที่ 4.1 จากกราฟ แสดงค่าความยาวคลื่นสูงสุดของ สารละลายพาราเซตามอล เท่ากับ 250 nm



ภาพที่ 4.1 แสดงยูวีสเปกตรัมของยาพาราเซตามอล (Paracetamol) ซึ่งมีค่าการดูดกลืนแสงสูงสุดที่ 250 nm

#### 4.1.2 การหาเวลาเข้าสู่สมดุลของการสัคพาราเซตามอล (Equilibrium time of paracetamol)

ทำการทดลองโดยการบีบอัดสารละลายบัฟเฟอร์มา 5 ml และสารละลายตัวอย่างยาพาราเซตามอล (ซึ่งเตรียมโดยใช้ออกทานอลเป็นตัวทำละลาย) มา 5 ml ใส่ลงในหลอดทดลองขนาด 50 mL จากนั้นนำไปเขย่าเป็นเวลา 1 นาที และนำมาตั้งทิ้งไว้เพื่อให้เกิดการแยกชั้นเป็นเวลา 5 นาที ดูดสารละลายชั้นออกทานอลไปตรวจวัดด้วยเครื่อง UV-visible Spectrophotometer ที่ 250 nm ทำการทดลองเช่นเดียวกัน โดยนำไปเขย่าที่เวลา 3, 5, 7, 10, 20, 30 และ 40 นาที นำค่าการเปลี่ยนแปลงการดูดกลืนแสงมาพล็อตเทียบกับเวลาจะได้ผลการทดลองดังแสดงในภาพที่ 4.2



ภาพที่ 4.2 แสดงผลการหาเวลาเข้าสู่สมดุลของการสลายยาพาราเซตามอล โดยการติดตามการเปลี่ยนแปลงค่าการดูดกลืนแสงของสารละลายในชั้นออกทานอล

จากผลการทดลองพบว่าพาราเซตามอลเข้าสู่สมดุลของการสลายที่เวลาประมาณ 10 นาที ดังนั้นในการทดลองเพื่อหาค่าสัมประสิทธิ์การกระจายตัวของยาพาราเซตามอล จะใช้เวลาในการสลายเท่ากับ 10 นาที

#### 4.1.3 การหาค่าสัมประสิทธิ์การกระจายตัวของยาพาราเซตามอล

จากการทำการสกัดโดยให้อัตราส่วนปริมาตรระหว่างออกทานอลต่อสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ที่อัตราส่วน 5 mL : 5 mL โดยปรับเปลี่ยนปริมาตรของตัวอย่างยาในชั้นออกทานอลให้เพิ่มขึ้นทีละ 1 mL โดยให้ชั้นออกทานอลมีปริมาตรคงที่ที่ 5 mL สัดส่วนปริมาตรของสารที่ใช้ในการทดลองแสดงดังในตารางที่ 4.1 จากนั้นทำการเขย่าสารละลายผสมเพื่อให้เกิดการสกัดเป็นระยะเวลา 10 นาที และตั้งทิ้งไว้เพื่อให้เกิดการแยกชั้น แล้วนำสารละลายในชั้นออกทานอลไปตรวจวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่อง UV-visible Spectrophotometer ที่ 250 nm ได้ผลการทดลองแสดงดังตารางที่ 4.2

ตารางที่ 4.1 แสดงปริมาณสารละลายตัวอย่างยา ออกทานอล และพอสเฟดบัพเฟอร์ที่ใช้ในการทดลอง

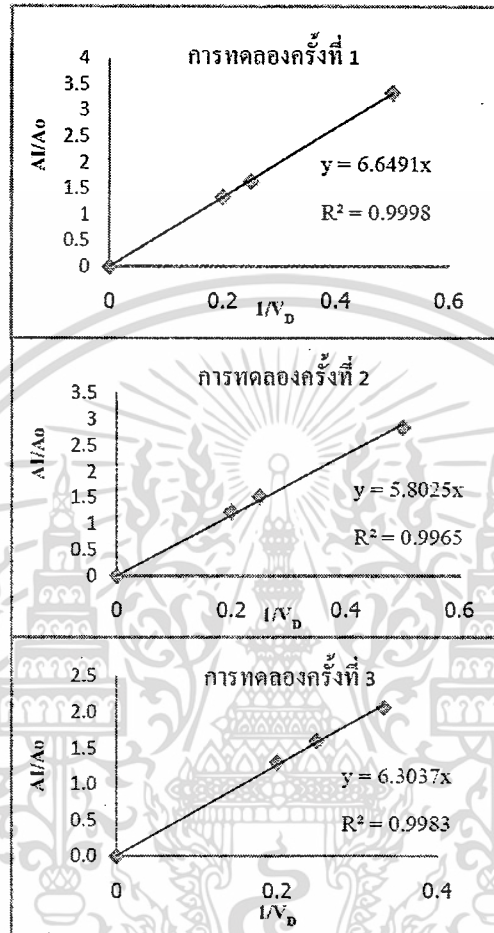
หลอดทดลองที่	ปริมาตรรวมของชั้นออกทานอล ( $V_o$ )		ปริมาตรของชั้นพอสเฟดบัพเฟอร์ ( $V_w$ )
	ปริมาตรสารละลายตัวอย่างยา ( $V_{Drug}$ )	ปริมาตรออกทานอล	
1	1.00	4.00	5.00
2	2.00	3.00	5.00
3	3.00	2.00	5.00
4	4.00	1.00	5.00
5	5.00	0.00	5.00

ตารางที่ 4.2 สรุปค่าการดูดกลืนแสงของสารละลายพาราเซตามอลในชั้นออกทานอลหลังการสกัด ที่สัดส่วนปริมาตรต่างๆ ของสารละลายพาราเซตามอล

Volume of Paracetamol, $V_D$	Final absorbance, $A_f$		
	ครั้งที่ 1*	ครั้งที่ 2*	ครั้งที่ 3*
1.00	0.1448	0.1434	0.0938
1.50	0.2145	0.2523	0.2949
2.00	0.3604	0.3200	0.3476
2.50	0.4375	0.4687	0.4478
3.00	0.5373	0.5839	0.5493

\*ค่าการดูดกลืนแสงเริ่มต้นของยาพาราเซตามอลก่อนการสกัด ( $A_i$ ) = 0.7157

เมื่อนำผลการทดลองแต่ละครั้งมา plot กราฟความสัมพันธ์ระหว่างค่า  $A_f/A_o$  กับ  $1/V_{drug}$  จะได้ดังกราฟภาพที่ 4.3



ภาพที่ 4.3 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่าง ค่า  $A_i/A_0$  กับ  $1/V_{drug}$  ของการทดลองหาค่าสัมประสิทธิ์การกระจายตัวของยาพาราเซตามอลทั้งสามครั้ง

จากภาพที่ 4.3 สามารถหาค่าสัมประสิทธิ์การกระจายตัว (partition coefficient,  $P_{ow}$ ) ของยาพาราเซตามอล (Paracetamol) ของการทดลองครั้งที่ 1 ได้โดยการนำค่า slope ที่ได้จากกราฟมาทำการคำนวณตามสมการที่ได้พัฒนาขึ้น (สมการที่ 10) คือ

$$P_{ow} = V_w / (\text{slope} - V_0)$$

เมื่อ  $P_{ow}$  = ค่าสัมประสิทธิ์การกระจายตัว (partition coefficient)

$V_w$  = ปริมาตรของชั้นสารละลายบัฟเฟอร์ (5 mL)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

$V_0$  = ปริมาตรรวมของชั้นออกทานอล ( 5 mL)

แทนค่าความชันของการทดลองครั้งที่ 1 ลงในสมการ จะได้ว่า

$$P_{ow} = 5 / (6.6491 - 5)$$

$$= 3.0319$$

$$\log P_{ow} = 0.48$$

สำหรับการหาค่า  $\log P_{ow}$  ของการทดลองครั้งที่ 2 และ 3 ก็สามารถทำได้โดยนำค่าความชันจากกราฟที่ได้มาคำนวณในลักษณะเดียวกัน จะได้ค่า  $\log P_{ow}$  เท่ากับ 0.55 และ 0.58 ตามลำดับ

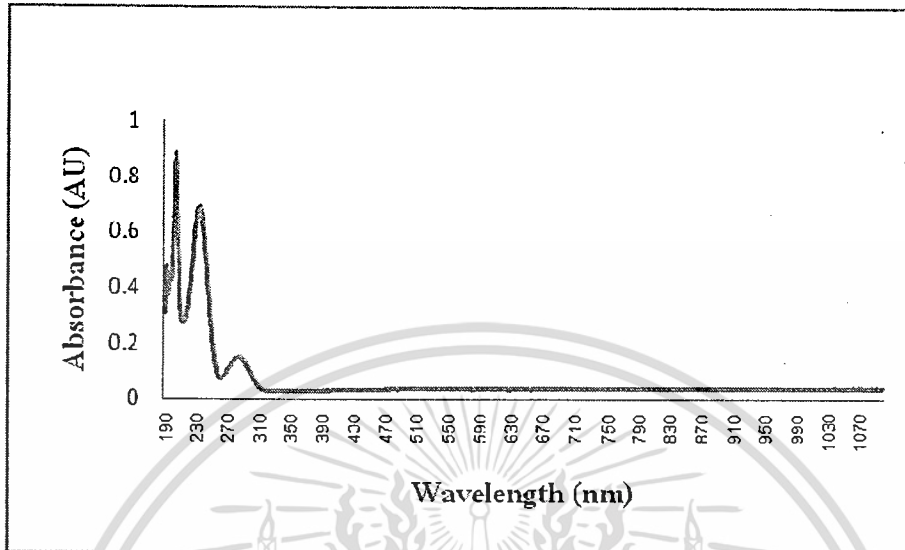
ดังนั้นค่าเฉลี่ย  $\log P_{ow}$  ของยาพาราเซตามอลของการทดลองทั้งสามครั้งมีค่าเท่ากับ  $0.53 \pm 0.05$  ซึ่งถือว่ามีความใกล้เคียงกับค่าที่ได้จากเอกสารอ้างอิง [8] ซึ่งมีค่าเท่ากับ 0.49

#### 4.2 การหาค่าสัมประสิทธิ์การกระจายตัวของอะนิลีน (Aniline)

อะนิลีนหรือฟีนิลเอมีน (Phenylamine) มีสูตรโมเลกุล  $C_6H_5(NH_2)$  ชื่อสารเคมีในระบบ IUPAC คือ Phenylamine มีค่าการดูดกลืนแสงสูงสุดที่ความยาวคลื่น 235 nm อะนิลีนมักใช้เป็นสารตั้งต้นในการผลิตยา เช่น mepivacaine, etidocaine, lidocaine, prilocaine, bupivacaine หรือ articaine เป็นต้น ซึ่งยาชากลุ่มนี้เป็นที่นิยมใช้กันมากที่สุดในปัจจุบัน

##### 4.2.1 การศึกษาความยาวคลื่นที่มีค่าการดูดกลืนแสงสูงสุดของอะนิลีน (Aniline)

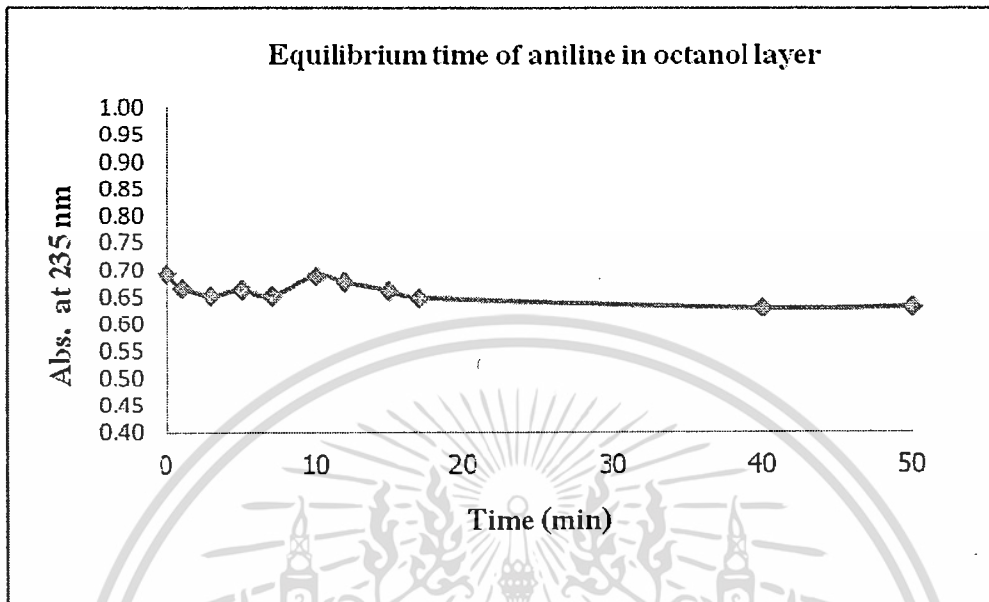
จากการทดลอง นำสารละลายอะนิลีนที่เตรียมได้มา scan หาความยาวคลื่นที่มีค่าการดูดกลืนแสงสูงสุด ซึ่งได้ผลการทดลองดังภาพที่ 4.4 จากกราฟ แสดงค่าความยาวคลื่นสูงสุดของ สารละลายอะนิลีน เท่ากับ 235 nm ดังนั้นจึงเลือกใช้ที่ความยาวคลื่นนี้ในการตรวจวัดเพื่อหาค่าสัมประสิทธิ์การกระจายตัวของอะนิลีน



ภาพที่ 4.4 แสดงยูวีวิสิเบิลสเปกตรัมของอะนิลีน (Aniline) ซึ่งมีค่าการดูดกลืนแสงสูงสุดที่ 235 nm

#### 4.2.2 การหาเวลาเข้าสู่สมดุลของการสกัดอะนิลีน (Equilibrium time of aniline)

ทำการทดลองโดยการบีบอัดสารละลายบัฟเฟอร์มา 5 ml และสารละลายอะนิลีน (ซึ่งเตรียมโดยใช้ ออกทานอลเป็นตัวทำละลาย) มา 5 ml ใส่ลงในหลอดทดลองขนาด 50 mL จากนั้นนำไปเขย่าที่เวลา 1 นาที และนำมาตั้งทิ้งไว้เพื่อให้เกิดการแยกชั้นเป็นเวลา 5 นาที ดูดสารละลายชั้นออกทานอลไปตรวจวัดด้วยเครื่อง UV-visible Spectrophotometer ที่ 235 nm ทำการทดลองเช่นเดียวกัน โดยนำไปเขย่าที่เวลา 3, 5, 7, 10, 20, 30 และ 40 นาที นำค่าการเปลี่ยนแปลงการดูดกลืนแสงมาพล็อตเทียบกับเวลาจะได้ผลการทดลองดังแสดงในภาพที่ 4.5



ภาพที่ 4.5 แสดงผลการหาเวลาเข้าสู่สมดุลของการสกัดอะนิลีน โดยการติดตามการเปลี่ยนแปลงค่าการดูดกลืนแสงของสารละลายในชั้นออกทานอล

จากผลการทดลองพบว่าอะนิลีนเข้าสู่สมดุลของการสกัดที่เวลาประมาณ 15 นาที ดังนั้นในการทดลองเพื่อหาค่าสัมประสิทธิ์การกระจายตัวของยาพาราเซตามอล จะใช้เวลาในการสกัดเท่ากับ 15 นาที

#### 4.2.3 การหาค่าสัมประสิทธิ์การกระจายตัวของอะนิลีน

จากการทำการสกัดโดยให้อัตราส่วนปริมาตรระหว่างออกทานอลต่อสารละลายฟอสเฟตบัพเฟอร์ ที่อัตราส่วน 5 mL : 5 mL โดยปรับเปลี่ยนปริมาตรของอะนิลีนในชั้นออกทานอลให้เพิ่มขึ้นทีละ 1 mL โดยให้ชั้นออกทานอลมีปริมาตรคงที่ที่ 5 mL สัดส่วนปริมาตรของสารที่ใช้ในการทดลองเหมือนกับการทดลองหาค่าสัมประสิทธิ์การกระจายตัวของพาราเซตามอล ดังแสดงในตารางที่ 4.1 จากนั้นทำการเขย่าสารละลายผสมเพื่อให้เกิดการสกัดเป็นระยะเวลา 15 นาที และตั้งทิ้งไว้เพื่อให้เกิดการแยกชั้น แล้วนำสารละลายในชั้นออกทานอลไปตรวจวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่อง UV-visible Spectrophotometer ที่ 235 nm ได้ผลการทดลองแสดงดังตารางที่ 4.3

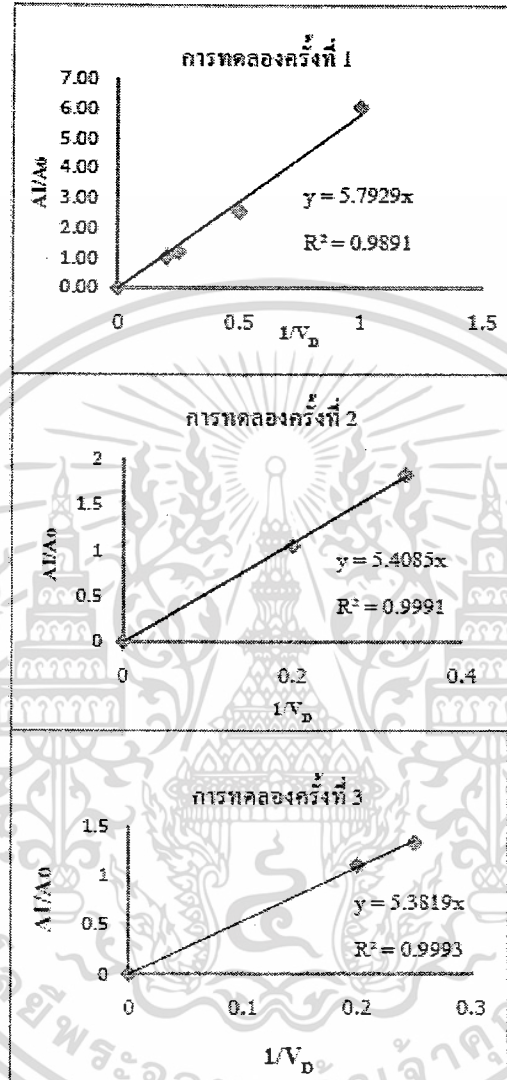
ตารางที่ 4.3 สรุปค่าการดูดกลืนแสงของสารละลายอะนิลีนในชั้นออกทานอลหลังการสกัด ที่สัดส่วน ปริมาตรต่างๆ ของสารละลายอะนิลีน

Volume of aniline, $V_D$	Final absorbance, $A_f$		
	ครั้งที่ 1 <sup>*</sup>	ครั้งที่ 2 <sup>**</sup>	ครั้งที่ 3 <sup>**</sup>
1.00	0.1169	0.2428	0.2409
1.50	0.2756	0.2964	0.3176
2.00	0.4665	0.3791	0.4143
2.50	0.5793	0.6517	0.5201
3.00	0.6814	0.6594	0.6297

\*ค่าการดูดกลืนแสงเริ่มต้นของอะนิลีนก่อนการสกัด ( $A_i$ ) = 0.7065

\*\*ค่าการดูดกลืนแสงเริ่มต้นของอะนิลีนก่อนการสกัด ( $A_i$ ) = 0.6911

เมื่อนำผลการทดลองแต่ละครั้งมาพล็อต กราฟความสัมพันธ์ระหว่างค่า  $A_i/A_f$  กับ  $1/V_{drug}$  จะได้กราฟ ดังภาพที่ 4.6



ภาพที่ 4.6 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่าง ค่า  $A_i/A_f$  กับ  $1/V_{drug}$  ของการทดลอง  
หาค่าสัมประสิทธิ์การกระจายตัวของอะนิลีนทั้งสามครั้ง

จากภาพที่ 4.6 สามารถหาค่าสัมประสิทธิ์การกระจายตัวของอะนิลีน ของการทดลองครั้งที่ 1 ได้โดย  
การนำค่า slope ที่ได้จากกราฟมาทำการคำนวณตามสมการที่ได้พัฒนาขึ้น (สมการที่ 10) คือ

แทนค่าความชันของการทดลองครั้งที่ 1 ลงในสมการ จะได้ว่า

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

$$P_{ow} = 5 / (5.7929 - 5)$$

$$= 6.3131$$

$$\log P_{ow} = 0.80$$

สำหรับการหาค่า  $\log P_{ow}$  ของการทดลองครั้งที่ 2 และ 3 ก็สามารทำได้โดยนำค่าความชันจากกราฟที่ได้มาคำนวณในลักษณะเดียวกัน จะได้ค่า  $\log P_{ow}$  เท่ากับ 1.09 และ 1.12 ตามลำดับ

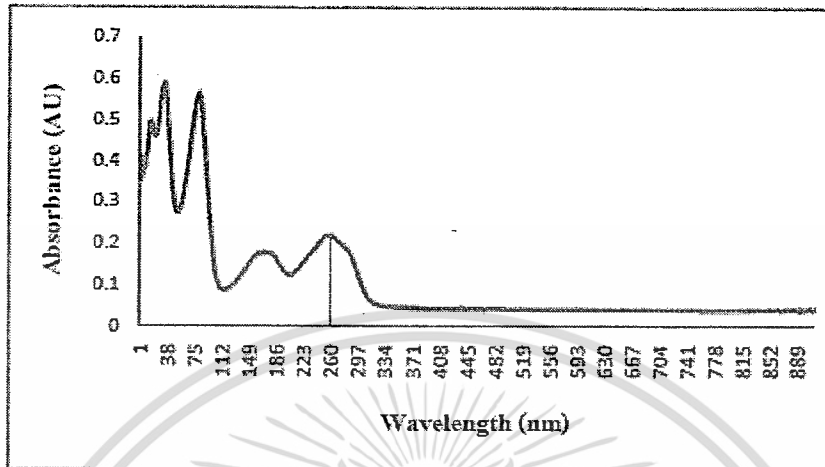
ดังนั้นค่าเฉลี่ย  $\log P_{ow}$  ของยาอะนิลีนของการทดลองทั้งสามครั้งมีค่าเท่ากับ  $1.00 \pm 0.18$  ซึ่งถือว่ามีความใกล้เคียงกับค่าที่ได้จากเอกสารอ้างอิง [10] ซึ่งมีค่าเท่ากับ 0.90

#### 4.3 การหาค่าสัมประสิทธิ์การกระจายตัวของไรโบฟลาวิน (Riboflavin)

ไรโบฟลาวินหรือวิตามินบี 2 มีสูตรโมเลกุล คือ  $C_{17}H_{20}N_4O_6$  ชื่อสารเคมีในระบบ IUPAC คือ 7,8-Dimethyl-10-[(2S,3S,4R)-2,3,4,5-tetrahydroxypentyl]benzo[g]pteridine-2,4-dione มีค่าการดูดกลืนแสงสูงสุดที่ความยาวคลื่น 267 nm วิตามินบี 2 เป็นปัจจัยสำคัญอย่างมากสำหรับการเจริญเติบโต จำเป็นต่อเอ็นไซม์และกระบวนการเมแทบอลิซึมของร่างกาย นอกจากนี้จะมีส่วนช่วยในการสร้างพลังงานให้กับร่างกายแล้ว ยังมีบทบาทในการทำหน้าที่เสมือนสารต้านอนุมูลอิสระ (antioxidant) หากได้รับวิตามินบี 2 ไม่เพียงพออาจส่งผลให้ร่างกายอ่อนล้า เติบโตช้า มีปัญหาเกี่ยวกับการย่อยอาหาร มุมปากมีแผลแตกหรือที่เรียกว่าปากนกกระจอก ลิ้นบวมช้ำ สายตาอ่อนล้า คอบวมและเจ็บ และทำให้ร่างกายมีปฏิกิริยาที่ไวต่อแสงได้

##### 4.3.1 การศึกษาความยาวคลื่นที่มีค่าการดูดกลืนแสงสูงสุดของไรโบฟลาวิน

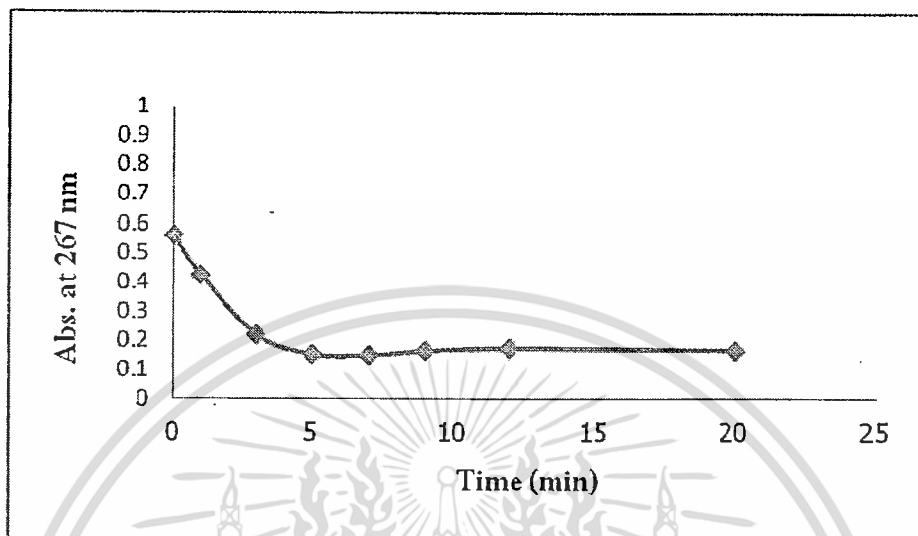
จากการทดลอง นำสารละลายไรโบฟลาวิน ที่เตรียมได้มา scan หาความยาวคลื่นที่มีค่าการดูดกลืนแสงสูงสุด ซึ่งได้ผลการทดลองดังภาพที่ 4.7 จากกราฟ แสดงค่าความยาวคลื่นสูงสุดของ สารละลายไรโบฟลาวิน เท่ากับ 265 nm ดังนั้นจึงเลือกใช้ความยาวคลื่นที่ 265 nm นี้ในการตรวจวัดเพื่อหาค่าสัมประสิทธิ์การกระจายตัวของไรโบฟลาวินต่อไป



ภาพที่ 4.7 แสดงยูวีสเปกตรัมของไรโบฟลาวิน (Riboflavin) ซึ่งมีค่าการดูดกลืนแสงสูงสุดที่ 265 nm

#### 4.3.2 การหาเวลาเข้าสู่สมดุลของการสกัดไรโบฟลาวิน (Equilibrium time of riboflavin)

ทำการทดลองโดยการบีบคั้นสารละลายบีฟเฟอร์มา 5 ml และสารละลายไรโบฟลาวิน (ซึ่งเตรียมโดยใช้ออกทานอลเป็นตัวทำละลาย) มา 5 ml ใส่ลงในหลอดทดลองขนาด 50 mL จากนั้นนำไปเขย่าเป็นเวลา 1 นาที และนำมาตั้งทิ้งไว้เพื่อให้เกิดการแยกชั้นเป็นเวลา 5 นาที เนื่องจากไรโบฟลาวินละลายได้ดีในน้ำ เพราะฉะนั้นหลังการสกัด จำนวนโมลส่วนใหญ่ของไรโบฟลาวินจึงละลายอยู่ในชั้นของฟอสเฟตบีฟเฟอร์ ดังนั้นในการทดลองนี้จึงติดตามการเปลี่ยนแปลงค่าการดูดกลืนแสงในชั้นของบีฟเฟอร์ โดยการดูดสารละลายในชั้นฟอสเฟตบีฟเฟอร์ไปตรวจวัดด้วยเครื่อง UV-visible Spectrophotometer ที่ 265 nm ทำการทดลองเช่นเดียวกัน โดยนำไปเขย่า ที่เวลา 3, 5, 7, 10, 20, 30 และ 40 นาที นำค่าการเปลี่ยนแปลงการดูดกลืนแสงมาพล็อตเทียบกับเวลาจะได้ผลการทดลองดังแสดงในภาพที่ 4.8



ภาพที่ 4.8 แสดงผลการหาเวลาเข้าสู่สมดุลของการสกัดไรโบฟลาวิน โดยการติดตามการเปลี่ยนแปลงค่าการดูดกลืนแสงของสารละลายในชั้นฟอสเฟตบัฟเฟอร์

จากผลการทดลองพบว่าไรโบฟลาวินเข้าสู่สมดุลของการสกัดที่เวลาประมาณ 7 นาที ดังนั้นในการทดลองเพื่อหาค่าสัมประสิทธิ์การกระจายตัวของตัวของยาพาราเซตามอล จะใช้เวลาในการสกัดเท่ากับ 7 นาที

#### 4.2.3 การหาค่าสัมประสิทธิ์การกระจายตัวของไรโบฟลาวิน

จากการทำการสกัดโดยให้อัตราส่วนปริมาตรระหว่างออกทานอลต่อสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ ที่อัตราส่วน 5 mL : 5 mL โดยปรับเปลี่ยนปริมาตรของไรโบฟลาวินในชั้นออกทานอลให้เพิ่มขึ้นทีละ 1 mL โดยให้ชั้นออกทานอลมีปริมาตรคงที่ที่ 5 mL สัดส่วนปริมาตรของสารที่ใช้ในการทดลองเหมือนกับการทดลองหาค่าสัมประสิทธิ์การกระจายตัวของยาพาราเซตามอล ดังแสดงในตารางที่ 4.1 จากนั้นทำการเขย่าสารละลายผสมเพื่อให้เกิดการสกัดเป็นระยะเวลา 7 นาที และตั้งทิ้งไว้เพื่อให้เกิดการแยกชั้น แล้วนำสารละลายในชั้นฟอสเฟตบัฟเฟอร์ไปตรวจวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่อง UV-visible Spectrophotometer ที่ 265 nm ได้ผลการทดลองแสดงดังตารางที่ 4.4

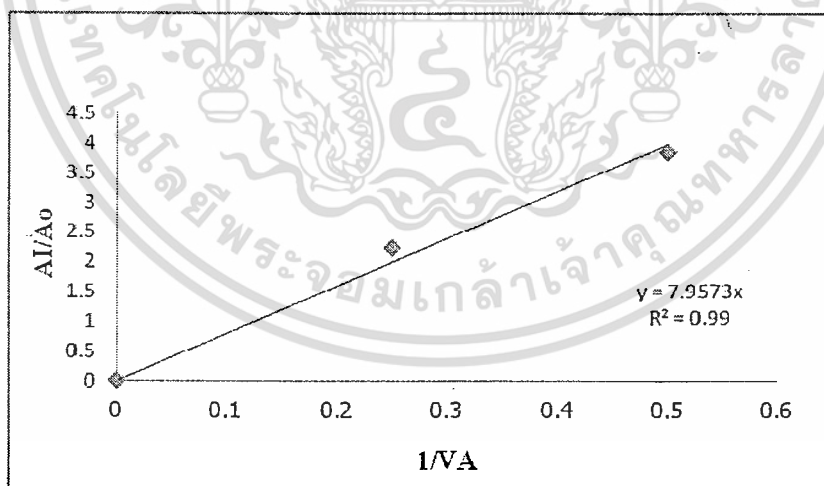
ตารางที่ 4.4 สรุปค่าการดูดกลืนแสงของสารละลายไรโบฟลาวินในชั้นฟอสเฟตบัฟเฟอร์หลังการสกัด ที่สัดส่วนปริมาตรต่างๆ ของสารละลายไรโบฟลาวิน

Volume of riboflavin, $V_D$	Final Absorbance*, $A_f$
1.00	0.1661
1.50	0.1490
2.00	0.1591
2.50	0.2572
3.00	0.2313

\*ค่าการดูดกลืนแสงเริ่มต้นของอะนิตินก่อนสกัด ( $A_i$ ) = 0.5746

เมื่อนำผลการทดลองมาพล็อตกราฟความสัมพันธ์ระหว่างค่า  $A_i/A_f$  กับ  $1/V_{drug}$  จะได้กราฟดังภาพที่

4.9



ภาพที่ 4.9 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่าง ค่า  $A_i/A_f$  กับ  $1/V_{drug}$  ของการทดลอง หาค่าสัมประสิทธิ์การกระจายตัวของไรโบฟลาวิน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

จากภาพที่ 4.9 สามารถหาค่าสัมประสิทธิ์การกระจายตัวของโรโบฟลาวินจากการทดลองได้โดยการนำค่า slope ที่ได้จากกราฟมาทำการคำนวณตามสมการที่ได้พัฒนาขึ้น (สมการที่ 10) คือ

แทนค่าความชันของการทดลองลงในสมการ แต่เนื่องจากการทดลองนี้เป็นการติดตามค่าการดูดกลืนแสงในชั้นฟอสเฟตบัพเฟอร์ จึงต้องมีการปรับสมการใหม่ จะได้ว่า

$$P_{ow} = (\text{slope} - V_w) / V_o$$

$$P_{ow} = (7.9573 - 5) / 5$$

$$= 0.5914$$

$$\log P_{ow} = -0.22$$

ค่า  $\log P_{ow}$  ของโรโบฟลาวินที่ได้จากการทดลองมีค่าเท่ากับ -0.22 ซึ่งค่าที่ได้ไม่ใกล้เคียงกับค่าที่ได้จากเอกสารอ้างอิง [11] ซึ่งมีค่าเท่ากับ -1.46 ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากสารละลายฟอสเฟตบัพเฟอร์มีความหนาแน่นสูงกว่าออกทานอล การดูดสารละลายในชั้นของบัพเฟอร์มาตรวจวัด จึงต้องทำการดูดผ่านชั้นของออกทานอลที่อยู่ด้านบน ซึ่งอาจทำให้เกิดการปนเปื้อนของสารตัวอย่างที่กระจายตัวอยู่ในทั้งสองเฟส ดังนั้นสมการที่พัฒนาขึ้นจะใช้ได้ดีสำหรับยาที่ละลายในชั้นออกทานอลได้ดีเท่านั้น หรือกล่าวอีกอย่างหนึ่งว่าสมการที่พัฒนาขึ้นนี้เหมาะสำหรับยาประเภท hydrophobic drug เท่านั้น

## บทที่ 5

### สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ

จากการทดลองเป็นการพัฒนาวิธีใหม่เพื่อใช้ในการวัดค่าสัมประสิทธิ์การกระจายตัวของยา ซึ่งในงานวิจัยนี้ได้เลือก พาราเซตามอล อะนิลีน และไรโบฟลาวินเป็นยาต้นแบบในการทดลอง จากการเปรียบเทียบผลของค่าสัมประสิทธิ์การกระจายตัวของยาพาราเซตามอล และอะนิลีนจากวิธีที่ได้พัฒนาขึ้นกับค่าอ้างอิง พบว่ามีความใกล้เคียงและสอดคล้องกัน แสดงให้เห็นว่าวิธีที่ได้พัฒนาขึ้นนี้ สามารถนำมาใช้หาค่าสัมประสิทธิ์การกระจายตัวของยาได้จริง โดยเฉพาะอย่างยิ่งกับกลุ่มยาประเภท hydrophobic drug ซึ่งวิธีนี้มีข้อดีกว่าวิธีการเขย่า (shake flask method) แบบดั้งเดิม คือ

1. ในการคำนวณไม่จำเป็นต้องสร้างกราฟมาตรฐาน (calibration curve) เพื่อใช้ในการคำนวณหาความเข้มข้นของตัวอย่างยาที่กระจายตัวอยู่ทั้งในชั้นของออกทานอลและชั้นของสารละลายบัฟเฟอร์ ทำให้ลดขั้นตอนการทำการทดลอง

2. วิธีที่ได้พัฒนาขึ้นเป็นการตรวจวัดสารละลายเพียงชั้นเดียว ทำให้เวลาการวิเคราะห์สั้นลง

3. วิธีนี้ไม่จำเป็นต้องใช้สารมาตรฐานในการสร้างกราฟมาตรฐาน ซึ่งเหมาะกับการหาค่าสัมประสิทธิ์การกระจายตัวของยาใหม่ ซึ่งยังไม่มีสารมาตรฐาน

4. การเตรียมสารละลายตัวอย่างยาสำหรับใช้ในวิธีที่พัฒนาขึ้น ไม่จำเป็นต้องเตรียมที่ความเข้มข้นที่แน่นอน เนื่องจากวิธีการคำนวณใหม่นี้ ไม่ได้ใช้เทอมของความเข้มข้นมาคำนวณ ทำให้ขั้นตอนการเตรียมสารมีความสะดวกและง่ายขึ้น

อย่างไรก็ตาม จากการทดลองพบว่าวิธีที่พัฒนาขึ้นไม่เหมาะกับการนำมาใช้หาค่าสัมประสิทธิ์การกระจายตัวของยาประเภท hydrophilic drug ซึ่งจากการทดลองเพื่อหาค่าสัมประสิทธิ์การกระจายตัวของไรโบฟลาวิน พบว่าค่าที่ได้จากการทดลองแตกต่างจากค่าอ้างอิง ทั้งนี้เนื่องมาจากไรโบฟลาวินเป็นยาที่ละลายได้ดีในชั้นน้ำ ซึ่งการตรวจวัดในชั้นน้ำมีโอกาสให้เกิดความคลาดเคลื่อนในการวิเคราะห์ได้ เพราะในขณะที่ทำการดูดสารละลายชั้นน้ำผ่านชั้นออกทานอลขึ้นมาวิเคราะห์ อาจเกิดการปนเปื้อนของสารได้

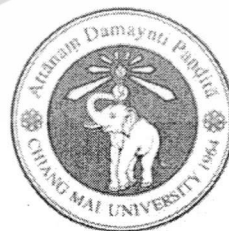
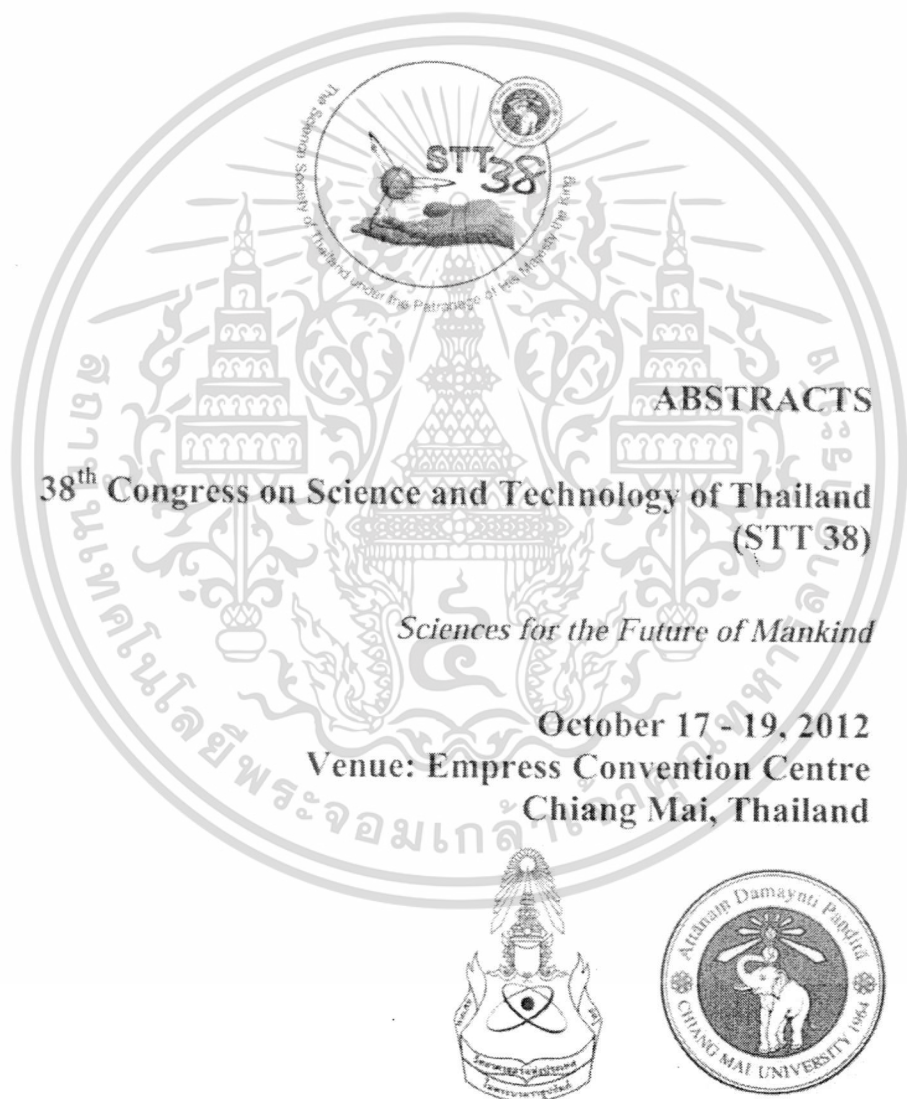
วิธีการหาค่าสัมประสิทธิ์การกระจายตัวของสารที่ได้พัฒนาขึ้นนี้มีจุดเด่นที่ วิธีการทำการทดลองง่าย ไม่ซับซ้อน รวดเร็ว เมื่อเปรียบเทียบกับวิธีดั้งเดิม นอกจากนี้วิธีใหม่นี้ยังสามารถพัฒนาต่อยอดให้มีความอัตโนมัติมากยิ่งขึ้นได้ โดยการใช้ควบคู่กับระบบการไหล (flow system)

## เอกสารอ้างอิง

- [1] Sangster, J. 1997. Octanol-Water Partition Coefficients: Fundamentals and Physical Chemistry. John Wiley & Sons, USA.
- [2] OECD guideline for the testing of chemicals No. 107. 1995. Partition Coefficient (n-octanol/water): Shake Flask Method. Organisation for Economic Co-operation and Development (OECD), Paris.
- [3] Danielsson, L-G., Zhang, Y-H. 1996. Methods for determining n-octanol-water partition constants. Trends Anal. Chem. 15: 188-195.
- [4] Valko, K. 2004. Application of high-performance liquid chromatography based measurements of lipophilicity to model biological distribution. J. Chromatogr. A. 1037: 299-310.
- [5] Pallicer, J.M., Sales, J., Rosés, M., Ràfols, C., Bosch, E. 2011. Lipophilicity assessment of basic drugs(log PO/W determination) by a chromatographic method. J. Chromatogr. A. 1218: 6356-6368.
- [6] Han, S.-Y., Liang, C., Qiao, J.-Q., Lian, H.-Z., Ge, X., Chen, H.-Y., 2012. A novel evaluation method for extrapolated retention factor in determination of n-octanol/water partition coefficient of halogenated organic pollutants by reversed-phase high performance liquid chromatography. Anal. Chim. Acta 713: 130-135.
- [7] Alimuddin, M., Grant, D., Bulloch, D., Lee, N., Peacock, M., Dahl, R. 2008. Determination of log D via Automated Microfluidic Liquid-Liquid Extraction. J. Med. Chem. 51: 5410-5412.
- [8] Carlsson, K., Karlberg, B. 2000. Determination of Octanol-water partition coefficients using a micro-volume liquid-liquid flow extraction system. Anal. Chim Acta 423: 137-144.
- [9] Marine, N. A., Klein, S. A., Posner, J. D. 2009. Partition Coefficient Measurements in Picoliter Drops Using a Segmented Flow Microfluidic Device. Anal. Chem. 81: 1471-1476.
- [10] Chen, Z., Weber, S. G. 2007. A High-Throughput Method for Lipophilicity Measurement. Anal. Chem. 79: 1043-1049.
- [11] Tetko, I. V., Jaroszewicz I., Platts J. A., Kuduk-Jaworska J. 2008. Calculation of lipophilicity for Pt(II) complexes: experimental comparison of several methods. J. Inorg. Biochem. 102: 1424-1437.

## ภาคผนวก

ผลงานวิจัยที่เกี่ยวข้องกับโครงการวิจัยชิ้นนี้ และได้รับการเผยแพร่ที่งานประชุมวิชาการ วิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย ครั้งที่ 38 ระหว่างวันที่ 17-19 ตุลาคม 2555 จังหวัดเชียงใหม่ ประเทศไทย



**Organized by:**  
**The Science Society of Thailand under the Patronage of**  
**His Majesty the King**  
**in Association with Faculty of Science,**  
**Chiang Mai University**

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
 ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

### CI\_C0048: A NEW METHOD FOR MEASUREMENT OF THE PARTITION COEFFICIENT OF DRUGS

Saowapak Teerasong,<sup>1,2,\*</sup> Panwadee Wattanasin,<sup>1,3</sup> Mayura Sukieam,<sup>2</sup> Duangjai Nacapricha<sup>1,3</sup>

<sup>1</sup>Flow Innovation–Research for Science and Technology Laboratories (FIRST Labs.), Thailand

<sup>2</sup>Applied Analytical Research Unit, Department of Chemistry, Faculty of Science, King Mongkut's Institute of Technology Ladkrabang, Bangkok 10520, Thailand

<sup>3</sup>Department of Chemistry, Faculty of Science, Mahidol University, Bangkok 10400, Thailand

\*e-mail: ktsaowap@kmitl.ac.th

**Abstract:** The partition coefficient ( $P_{ow}$ ) is a value representing soluble property of compounds in octanol and water at equilibrium. This value can be used for indicating the ability of drug compounds diffusing through cell membrane. The conventional procedure for determination of the  $P_{ow}$  is a shake-flask method. By this method, two calibration curves are crucially required to determine the concentration of compound in two-solvent phases. This procedure is therefore tedious and taking long analysis time. In this work, a new procedure for measurement of  $P_{ow}$  is developed. The method relied on Beer's law, in which only absorbance and volume of solutions are taken into calculation. Therefore, any calibration curve is no longer required, which makes a procedure much simpler and takes less time of analysis. The method is thus more simple and rapid than the conventional procedure. The developed method is applied for screening of the  $P_{ow}$  of some generic drugs, for examples, paracetamol, riboflavin and caffeine. The  $P_{ow}$  obtained by the developed method has a good correlation to available literature value ( $R^2 = 0.99$ ).

## ข้อมูลประวัติคณะผู้วิจัย

### ประวัติส่วนตัว

ชื่อ-สกุล ดร. เสาวภาคย์ ชีราทรง

ตำแหน่งปัจจุบัน อาจารย์ประจำสาขาวิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

### ประวัติการศึกษา

ชื่อย่อปริญญา	สาขา	สถาบันที่จบ	ปีที่จบ
Ph. D	Science and Technology Education	มหาวิทยาลัยมหิดล	2553
วท. บ.	เคมี	มหาวิทยาลัยขอนแก่น	2545

สาขาวิจัยที่มีความชำนาญพิเศษ Flow-based techniques, Food and drug analysis

### ทุนวิจัยที่เคยได้รับ

ปี พ.ศ.	ทุนการศึกษาและทุนวิจัย	สถาบันที่ให้
2555	ทุนสนับสนุนงานวิจัยจากเงินรายได้ ประจำปีงบประมาณ 2555 คณะวิทยาศาสตร์ สจล.	คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง
2555	ทุนพัฒนานักวิจัยใหม่ กองทุนวิจัยสถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง	สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง
2555	ทุนพัฒนาศักยภาพในการทำงานวิจัยของอาจารย์รุ่นใหม่	สำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย

**ผลงานวิจัย/งานสร้างสรรค์ที่ตีพิมพ์เผยแพร่ (ระดับชาติและนานาชาติ)**

1. Mantim T, Saetear P, **Teerasong S**, Chan-Eam S, Sreeenonchai K, Amornthammarong N, Ratanawimarnwong N, Wilairat P, Meesiri W, Uraisin K, and Nacapricha D. Reagent-free analytical flow methods for the soft drink industry: Efforts for environmentally friendly chemical analysis. *Pure and Applied Chemistry* 2012; 84: 2015-2025.
2. Chan-Eam S, **Teerasong S**, Damwan K, Nacapricha D, Chaisuksant R. Sequential injection analysis with electrochemical detection as a tool for economic and rapid evaluation of total antioxidant capacity. *Talanta* 2011; 84: 1350-1354.

**การเสนอผลงานวิชาการ**

1. Teerasong S, Wattanasin P, Sukieam M, Nacapricha, D. A new method for measurement of the partition coefficient of drugs. The 38<sup>th</sup> Congress on Science and Technology of Thailand (STT38), 17-19 October 2012.