

## วิธีวิเคราะห์ค่าสัมประสิทธิ์การกระจายตัวของยา

### Determination of the Partition Coefficient of Drugs

เสาวภาคย์ ชีราทรง

Saowapak Teerasong

สาขาวิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง กรุงเทพมหานคร

#### บทคัดย่อ

ไลโปฟิลิซิตีเป็นสมบัติที่เกี่ยวกับกายภาพและเคมีอย่างหนึ่งของสาร ที่นิยมศึกษาในกระบวนการพัฒนาและค้นหาใหม่ สมบัตินี้ใช้ในการอธิบายถึงความสามารถของสารในการซึมผ่านเยื่อหุ้มเซลล์ ถ้าสารมีสมบัติไลโปฟิลิซิตีอยู่ในช่วงที่เหมาะสม สารนั้นจะถูกพิจารณาว่ามาพัฒนาเป็นยาต่อไป โดยทั่วไปแล้วสมบัติไลโปฟิลิซิตีจะรายงานในรูปของค่าสัมประสิทธิ์การกระจายตัว ในบทความนี้จึงได้นำเสนอวิธีการหาค่าสัมประสิทธิ์การกระจายของสารด้วยวิธีต่างๆ โดยอธิบายในเชิงหลักการวิเคราะห์และวิธีการทดลอง รวมทั้งเปรียบเทียบข้อดีและข้อจำกัดของแต่ละวิธี

คำสำคัญ: ค่าสัมประสิทธิ์การกระจายตัว, ไลโปฟิลิซิตี

#### Abstract

Lipophilicity is one of the physicochemical parameters usually studied in drug discovery and development. This parameter can be described the capability of a compound to permeate through cell membrane. If a compound has optimal lipophilicity, it is considered to be a potential drug candidate. Lipophilicity is generally reported in number of the partition coefficient. In this article, a short overview of methods for determining the partition coefficient is presented. The different methods were described in terms of principle and methodology. Advantage and disadvantage of methods were also discussed.

**Keywords:** Partition coefficient, Lipophilicity

---

E-mail address : ktsaowap@kmitl.ac.th, Tel: 02-3298427

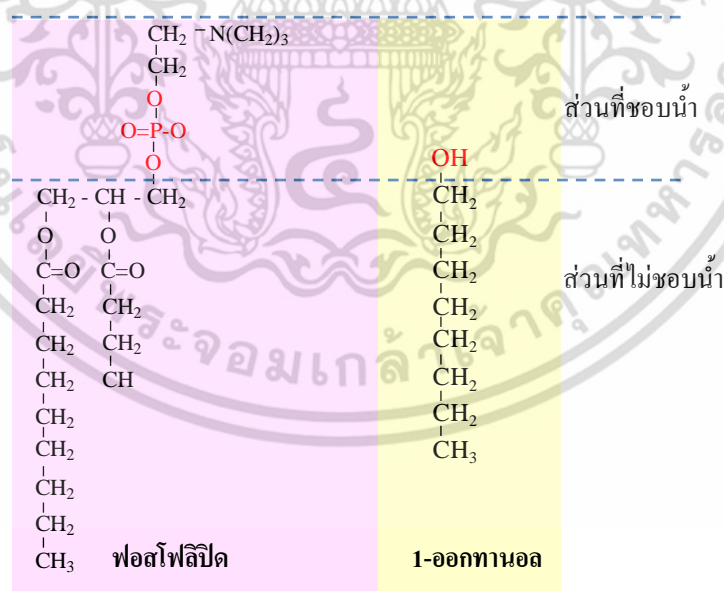
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## 1. บทนำ

ค่าสัมประสิทธิ์การกระจายตัว (partition coefficient; P) ของสาร คือ อัตราส่วนความเข้มข้นของสารที่กระจายอยู่ในชั้นสารอินทรีย์ต่อความเข้มข้นของสารที่กระจายอยู่ในชั้นน้ำ ณ สภาวะสมดุล หรือเขียนได้ว่า

$$\text{ค่าสัมประสิทธิ์การกระจายตัว (P)} = \frac{\text{ความเข้มข้นสารที่อยู่ในชั้นสารอินทรีย์ (C}_O\text{)}}{\text{ความเข้มข้นสารที่อยู่ในชั้นน้ำ (C}_W\text{)}} \dots(1)$$

ในด้านเภสัชศาสตร์ ค่า P สามารถใช้บ่งบอกถึงสมบัติไลโปฟิลิซิตี (lipophilicity) ของยา หรือความสามารถของยาในการซึมผ่านเยื่อหุ้มเซลล์ (cell membrane) โดยทั่วไปแล้วการศึกษาค่าไลโปฟิลิซิตีจะเป็นการศึกษาอัตราส่วนในการกระจายตัวของยาในชั้นออกทานอลต่อชั้นน้ำ และใช้สัญลักษณ์เป็น  $P_{OW}$  (บางตำราใช้  $K_{OW}$ ) โดยที่ชั้นน้ำ จะนิยมใช้เป็นสารละลายบัฟเฟอร์พีเอช 7.4 ซึ่งเป็นค่าพีเอชของของเหลวในร่างกาย ในขณะที่ชั้นออกทานอลจะเทียบเคียงได้กับฟอสโฟลิปิดเลเยอร์ (phospholipid layer) ของเยื่อหุ้มเซลล์ นั่นคือประกอบไปด้วยส่วนหัวที่มีขั้ว (hydrophilic head) และส่วนหางที่เป็นสายไฮโดรคาร์บอนซึ่งไม่ชอบน้ำ (hydrophobic tail) ดังรูปที่ 1



รูปที่ 1. การเปรียบเทียบโครงสร้างของฟอสโฟลิปิดเลเยอร์ในเยื่อหุ้มเซลล์กับ 1-ออกทานอล

ถ้าเรามีค่า  $P_{OW}$  สูง แสดงว่า ยาน้ำสามารถกระจายตัวได้ดีในชั้นของออกทานอล ซึ่งหมายความว่า ยาน้ำนั้นน่าจะสามารถในการซึมผ่านเยื่อหุ้มเซลล์ได้ดีด้วย โดยทั่วไปนิยมนำค่า  $P_{OW}$  ให้อยู่ในรูปของเลขลอการิทึม ( $\log P_{OW}$ ) เพื่อจะได้ตัวเลขที่มีค่าน้อย นอกจากการใช้ค่าออกทานอลเป็นแบบจำลองแทนเยื่อหุ้มเซลล์แล้ว บางงานวิจัยได้มีการนำเสนอการใช้สารอินทรีย์ตัวอื่นๆ เช่น ไซโคลเฮกเซน [1], พอลิ(ไวนิลคลอไรด์) [2] และลิโปโซม [3] มาแทนการใช้ค่าออกทานอล อย่างไรก็ตามวิธีเหล่านี้ได้รับความนิยมน้อยเมื่อเทียบกับการใช้ออกทานอล เนื่องจากออกทานอลเป็นสารที่กำหนดใช้ในวิธีมาตรฐาน จึงเป็นสารที่นิยมใช้และให้ผลที่น่าเชื่อถือมากกว่าการใช้สารเคมีอื่นๆ

ค่า  $P_{OW}$  จะใช้อธิบายการกระจายตัวของสารที่ไม่มีประจุ (uncharged specie) อย่างไรก็ดี ยาน้ำชนิดนี้มีสมบัติเป็นกรดอ่อนหรือเบสอ่อน ซึ่งสามารถแตกตัวได้ในน้ำ ณ พีเอชที่ทำการทดลอง ดังนั้นการหาค่าสัมประสิทธิ์การกระจายตัวของสารที่มีประจุ (charged specie) จึงเป็นการหาอัตราส่วนของความเข้มข้นสารที่ไม่แตกตัวในชั้นออกทานอลต่อความเข้มข้นรวมของสารทั้งที่แตกตัวและไม่แตกตัวในชั้นน้ำ และใช้ตัวแปร  $D$  ซึ่งย่อมาจาก distribution coefficient แทน โดยค่า  $D$  สามารถคำนวณได้จากค่า  $P$  ดังสมการที่ (2) และ (3) [4]

$$\log D_{\text{กรดอ่อน}} = \log P_{OW} + \log \left[ \frac{1}{1 + 10^{\text{pH} - \text{pK}_a}} \right] \dots(2)$$

$$\log D_{\text{เบสอ่อน}} = \log P_{OW} + \log \left[ \frac{1}{1 + 10^{\text{pK}_a - \text{pH}}} \right] \dots(3)$$

ถ้าสารนั้นแตกตัวได้ดี นั่นคือ  $\text{pH} - \text{pK}_a$  (กรณีกรดอ่อน) หรือ  $\text{pK}_a - \text{pH}$  (กรณีเบสอ่อน) มีค่ามากกว่า 1 จะสามารถประมาณค่า  $D$  ได้จากสมการที่ (4) และ (5) [4]

$$\log D_{\text{กรดอ่อน}} \approx \log P_{OW} + \text{pK}_a - \text{pH} \dots(4)$$

$$\log D_{\text{เบสอ่อน}} \approx \log P_{OW} - \text{pK}_a + \text{pH} \dots(5)$$

และจะได้ว่า  $\log D \approx \log P$  เมื่อสารนั้นแตกตัวได้น้อยมากนั่นเอง

ซึ่งในขั้นตอนของการค้นหาและพัฒนาาใหม่ (drug discovery) สารที่จะมีคุณสมบัติเป็นยาที่ดีได้ ควรจะมีค่า  $\log P_{ow}$  อยู่ในช่วง 1-3 [5] ซึ่งเป็นช่วงที่เหมาะสมสำหรับการดูดซึมโดยระบบต่างๆ ในร่างกาย ตารางที่ 1 แสดงค่าสัมประสิทธิ์การกระจายตัวของยาที่มีผลต่อประสิทธิภาพการแพร่ผ่านเยื่อหุ้มเซลล์โดยระบบต่างๆ ในร่างกาย

ตารางที่ 1. ค่าสัมประสิทธิ์การกระจายตัวของยาต่อความสามารถในการแพร่ผ่านเยื่อหุ้มเซลล์ในระบบต่างๆ ของร่างกาย [5]

ค่าสัมประสิทธิ์การกระจายตัว (ที่เอช 7.4)	ผลของยาต่อระบบในร่างกาย
ต่ำกว่า 0	<ul style="list-style-type: none"> <li>- มีปัญหาในการแพร่ผ่านเซลล์ในระบบทางเดินอาหาร (intestinal system) และระบบประสาทส่วนกลาง (central nervous system; CNS)</li> <li>- กำจัดออกทางระบบปัสสาวะได้ง่าย</li> </ul>
0-1	<ul style="list-style-type: none"> <li>- มีความสามารถในการละลายและแพร่ผ่านเซลล์ได้ดี แต่ยังมีปัญหาในการแพร่ผ่านในระบบประสาทส่วนกลาง</li> </ul>
1-3	<ul style="list-style-type: none"> <li>- แพร่ผ่านเซลล์ในระบบประสาทส่วนกลางได้ดี</li> <li>- เป็นช่วงที่เหมาะสมที่สุดสำหรับการแพร่ผ่านเซลล์ในระบบประสาทส่วนกลางและระบบอื่นๆ (non-nervous system; non-CNS)</li> <li>- เหมาะสำหรับเป็นยารับประทาน</li> <li>- ถูกเมตาบอลิซึมหรือแปรสภาพไปเป็นรูปอื่นได้น้อย</li> </ul>
3-5	<ul style="list-style-type: none"> <li>- ค่าการละลายมีแนวโน้มลดลง</li> <li>- มีแนวโน้มในการเกิดเมตาบอลิซึมเพิ่มขึ้น</li> </ul>
มากกว่า 5	<ul style="list-style-type: none"> <li>- ถึงแม้ว่าประสิทธิภาพการแพร่ผ่านเซลล์จะสูง แต่ค่าการละลายต่ำมาก ไม่เหมาะสมเป็นยารับประทาน และถูกเมตาบอลิซึมได้สูง</li> </ul>

ในบทความนี้จะกล่าวถึงวิธีการหาค่าสัมประสิทธิ์การกระจายด้วยเทคนิคต่างๆ ทั้งที่เป็นการวิเคราะห์โดยตรง (direct measurement) และการวิเคราะห์โดยอ้อม (indirect measurement) รวมทั้งเปรียบเทียบจุดเด่นจุดด้อยของแต่ละวิธี

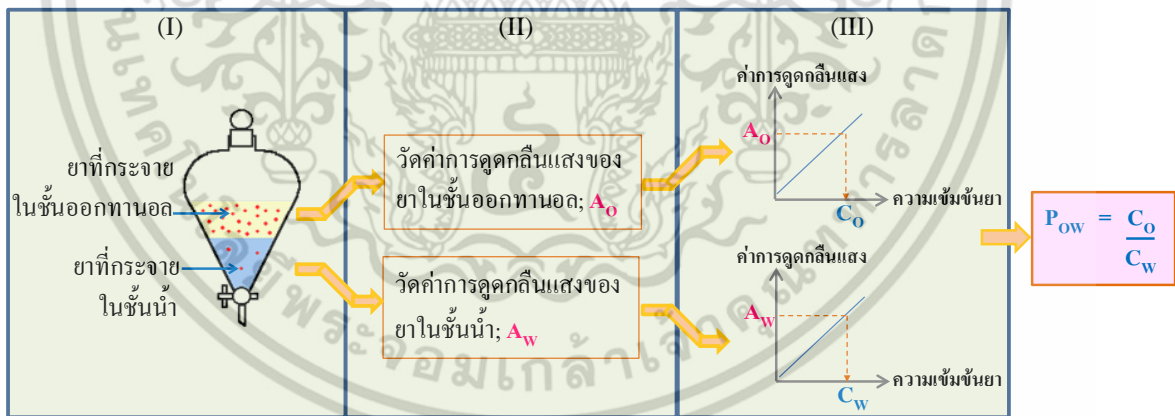
## 2. วิธีวิเคราะห์หาค่าสัมประสิทธิ์การกระจายตัว

### 2.1. วิธีการเขย่า (shake-flask method) [6-7]

การหาค่า  $P_{ow}$  โดยวิธีการเขย่าถือเป็นวิธีวิเคราะห์โดยตรง และเป็นวิธีมาตรฐานที่กำหนดโดย Organization for Economic Cooperation and Development (OECD) [8] วิธีนี้ทำได้โดยการเติมสาร

ตัวอย่างขาลงในกรวยแยก (separatory funnel) ที่บรรจุตัวทำละลายได้แก่ ออกทานอลและน้ำไว้ จากนั้นทำการเขย่ากรวยแยก จนกระทั่งการสกัดเข้าสู่สมดุล ตั้งทิ้งไว้เพื่อให้เฟสทั้งสองเกิดการแยกชั้น จากนั้นหาความเข้มข้นของตัวอย่างยาในเฟสทั้งสอง โดยอาศัยเทคนิคยูวี-วิสิเบิล สเปกโตรโฟโตเมทรี (UV-vis spectrophotometry) การหาความเข้มข้นของสารนี้ จำเป็นต้องสร้างกราฟมาตรฐาน ซึ่งเป็นการพล็อตระหว่างความเข้มข้นและค่าการดูดกลืนแสงของสารมาตรฐานฯ ทั้งในชั้นของออกทานอลและชั้นน้ำ เพื่อนำมาใช้เทียบหาความเข้มข้นของตัวอย่างยาในทั้งสองเฟส ขั้นตอนการวิเคราะห์ด้วยวิธีการเขย่าแสดงดังรูปที่ 2

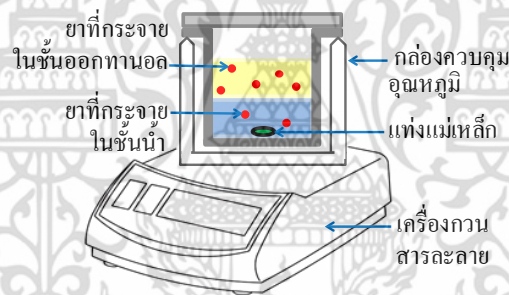
การหาค่า  $P_{ow}$  โดยอาศัยวิธีการเขย่ามีข้อดีคือ มีความน่าเชื่อถือ (reliability) และใช้อุปกรณ์ที่หาได้ง่าย มีใช้ในห้องปฏิบัติการทั่วไป แต่ข้อเสียของวิธีนี้คือ การเขย่าอาจก่อให้เกิดอิมัลชันในชั้นน้ำ (การเกิดหยดเล็กๆ ของออกทานอลกระจายอยู่ในชั้นน้ำ) ทำให้ชั้นน้ำเกิดความขุ่น ส่งผลให้การวิเคราะห์มีความคลาดเคลื่อน โดยเฉพาะอย่างยิ่ง เมื่อสารนั้นละลายในชั้นน้ำได้น้อย หรือมีค่า  $\log P_{ow}$  สูงกว่า 6 [7] นอกจากนี้ วิธีการเขี่ยังใช้เวลาในการวิเคราะห์ค่อนข้างนาน และใช้สารละลายปริมาณมาก ดังนั้นวิธีนี้จึงไม่เหมาะสำหรับขั้นตอนการคัดกรอง (screening) เพื่อค้นหายาใหม่ ซึ่งมักมีตัวอย่างยาที่รอการวิเคราะห์เป็นจำนวนมาก



รูปที่ 2. ขั้นตอนการหาค่า  $P_{ow}$  โดยวิธีการเขย่า; (I) หลังการเขย่าเมื่อระบบการสกัดเข้าสู่สมดุล (II) นำตัวอย่างยาที่กระจายอยู่ในชั้นออกทานอลและน้ำไปวัดค่าการดูดกลืนแสง และ (III) สร้างกราฟมาตรฐานสำหรับนำมาใช้ในการเทียบหาความเข้มข้นของยาในชั้นออกทานอล ( $C_o$ ) และชั้นน้ำ ( $C_w$ ) เพื่อนำไปใช้คำนวณหาค่า  $P_{ow}$  ต่อไป

## 2.2 วิธีการปั่นกววน (stir-flask method หรือ slow stirring method) [6-7]

วิธีการปั่นกววนเป็นวิธีที่พัฒนามาจากวิธีการเขย่า เพื่อกำจัดปัญหาการเกิดอิมัลชันอันเนื่องจากการเขย่า วิธีนี้เป็นการวิเคราะห์โดยตรง ทำได้โดยการเตรียมตัวอย่างด้วยการละลายในชั้นออกทานอล จากนั้นเติมสารละลายตัวอย่างที่เตรียมได้ลงในภาชนะที่บรรจุชั้นน้ำไว้อย่างช้าๆ เพื่อลดโอกาสการเกิดอิมัลชันให้น้อยที่สุด ทำการกววนสารละลายด้วยเครื่องปั่นกววน (magnetic stirrer) อย่างช้าๆ จนกระทั่งระบบการสกัดเข้าสู่สมดุล จากผลการทดลองพบว่า การวิเคราะห์ตัวอย่างที่มีค่า  $P_{OW}$  สูงๆ จะมีความแม่นยำ (accuracy) และความเที่ยง (precision) ที่ดีขึ้น อย่างไรก็ตาม การกววนสารละลายอย่างช้าๆ ทำให้การเข้าสู่สมดุลของระบบการสกัดใช้เวลานาน โดยมีประมาณว่า ถ้าต้องการวิเคราะห์ที่มีค่า  $\log P_{OW}$  ต่ำกว่า 5 อาจจะต้องใช้เวลาในการกววนสารละลายอย่างน้อย 2-3 วัน ระบบจึงเข้าสู่สมดุล นอกจากนี้ก็ต้องมีการควบคุมอุณหภูมิของระบบให้คงที่ เพื่อลดการเกิดอิมัลชันอันเนื่องมาจากการเปลี่ยนแปลงของอุณหภูมิ ระบบวิเคราะห์หาค่า  $P_{OW}$  ด้วยวิธีการปั่นกววนแสดงดังในรูปที่ 3



รูปที่ 3. ระบบการปั่นกววนสำหรับวิเคราะห์หาค่า  $P_{OW}$

## 2.3 เทคนิคโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง (high performance liquid chromatography; HPLC) [7, 9-10]

เทคนิค HPLC สามารถนำมาประยุกต์หาค่า  $\log P$  ได้ โดยการนำเวลาที่สารคงอยู่ในคอลัมน์ (retention time;  $t_R$ ) มาคำนวณค่าความจุที่แฟกเตอร์ (capacity factor;  $k'$ ) ตามสมการดังนี้

$$k' = \frac{t_R - t_0}{t_0} \quad \dots(6)$$

เมื่อ  $t_0$  คือเวลาของสารที่ไม่เกิดอันตรกิริยากับเฟสอยู่นิ่งใช้ในการเคลื่อนที่ผ่านคอลัมน์ ซึ่งค่า  $k'$  เป็นค่าที่บ่งบอกสัดส่วนการกระจายตัวของสารในเฟสอยู่นิ่ง (stationary phase) ต่อเฟสเคลื่อนที่ (mobile phase)

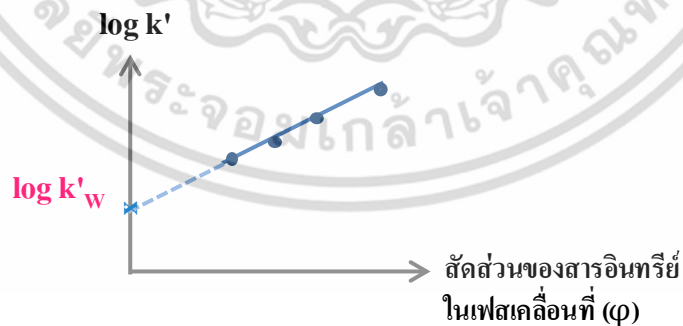
โดยทั่วไป การวิเคราะห์จะทำได้ภายใต้การแยกแบบรีเวอร์สเฟส (reversed-phase HPLC) คือใช้เฟสอยู่นิ่งซึ่งบรรจุอยู่ในคอลัมน์เป็นเฟสที่ไม่มีขั้ว เช่น C18 ส่วนเฟสเคลื่อนที่เป็นเฟสที่มีขั้ว เช่น สารละลายผสมระหว่างน้ำกับตัวทำละลายอินทรีย์ เช่น เมทานอล หรืออะซิโตนไตรีล

ในการหาค่าสัมประสิทธิ์การกระจายตัวของยาด้วยเทคนิคนี้ ทำได้โดยการศึกษาผลของปริมาณสารอินทรีย์ (organic modifier) ที่เป็นองค์ประกอบในเฟสเคลื่อนที่ ต่อค่า  $k'$  ของยาที่ต้องการวิเคราะห์ ดังนั้นในการทดลอง จะทำได้โดยการปรับเปลี่ยนความเข้มข้นของสารอินทรีย์ในเฟสเคลื่อนที่ และบันทึกผลค่า  $t_R$  ที่ได้จากการทดลอง จากนั้นนำค่า  $t_R$  มาคำนวณเป็นค่า  $k'$  ของสาร เมื่อทำการพล็อตความสัมพันธ์ระหว่าง  $\log k'$  กับความเข้มข้นของสารอินทรีย์ จะได้กราฟเส้นตรงตามสมการที่ (7) [10]

$$\log k' = S\varphi + \log k'_w \quad \dots(7)$$

โดยที่  $\varphi$  คือ สัดส่วนของสารอินทรีย์ที่เป็นองค์ประกอบในเฟสเคลื่อนที่  
 $S$  คือ ความชันของกราฟ ซึ่งเป็นค่าคงที่ของระบบวิเคราะห์  
 $k'_w$  คือ ค่าพหุคูณดีแฟกเตอร์ ในสถานะที่มีน้ำเป็นเฟสเคลื่อนที่เท่านั้น (ไม่มีสารอินทรีย์ เป็น องค์ประกอบร่วม)

จากสมการที่ (7) จะได้กราฟเส้นตรงที่มีจุดตัดแกน  $y$  เป็น  $\log k'_w$  (รูปที่ 4) ซึ่งเรียกว่า ค่าดัชนีไลโปฟิลิซิตี (lipophilicity index) โดยค่า  $\log k'_w$  นี้สามารถนำมาเทียบเป็นค่า  $\log P_{ow}$  ได้ โดยการเทียบกับกราฟมาตรฐานของสารอ้างอิง (reference standard) ซึ่งเป็นสารที่ทราบค่า  $\log P_{ow}$  แน่นนอน



รูปที่ 4. ความสัมพันธ์เชิงเส้นระหว่างสัดส่วนของสารอินทรีย์ในเฟสเคลื่อนที่ กับ  $\log k'$  เพื่อใช้ในการประมาณหาค่า  $\log k'_w$

การสร้างกราฟมาตรฐานทำได้โดยนำสารมาตรฐานยาที่ทราบค่า  $\log P_{ow}$  และมีโครงสร้างโมเลกุล (molecular structure) คล้ายคลึงกับตัวอย่างยาที่ต้องการวิเคราะห์ มาทำการทดลองเพื่อหาค่า  $\log k'_w$  จากนั้นทำการพล็อตกราฟความสัมพันธ์ระหว่างค่า  $\log k'_w$  และ  $\log P_{ow}$  เพื่อสร้างกราฟมาตรฐานเมื่อนำตัวอย่างยาที่ทราบค่า  $\log k'_w$  มาเทียบกับกราฟนี้ จะได้ค่า  $\log P_{ow}$  ของตัวอย่างยา

อย่างไรก็ตาม การหาค่า  $P_{ow}$  ด้วยเทคนิค HPLC เป็นการวิเคราะห์โดยอ้อม ค่า  $\log k'_w$  ของยาขึ้นอยู่กับปัจจัยหลายอย่าง เช่น สารอ้างอิงที่ใช้ในการสร้างกราฟมาตรฐาน และสภาวะที่ใช้ในการทดลอง เป็นต้น ดังนั้น Finizio และคณะ [7] ได้เสนอแนะเพื่อให้การวิเคราะห์ด้วยเทคนิค HPLC มีความถูกต้องและน่าเชื่อถือ ดังนี้

- (1) สารมาตรฐานที่นำมาใช้เป็นสารอ้างอิงควรมีสสูตร โครงสร้างใกล้เคียง หรืออยู่ในกลุ่มอนุพันธ์เดียวกันกับสารตัวอย่าง
- (2) กราฟมาตรฐานควรสร้างจากสารอ้างอิงอย่างน้อย 6 ตัว
- (3) เฟสเคลื่อนที่ที่ใช้ในการทดลองควรมีน้ำเป็นองค์ประกอบอยู่ไม่น้อยกว่าร้อยละ 25
- (4) เทคนิค HPLC จะมีความน่าเชื่อถือสำหรับการวิเคราะห์ตัวอย่างยามีค่า  $\log P_{ow}$  อยู่ในช่วง 0 ถึง 6
- (5) ค่า  $\log P_{ow}$  ที่ได้จากเทคนิค HPLC ควรมีความแตกต่างจากเทคนิคการเขย่าไม่เกิน  $\pm \log 0.5$  จึงจะถือว่ามีความน่าเชื่อถือ

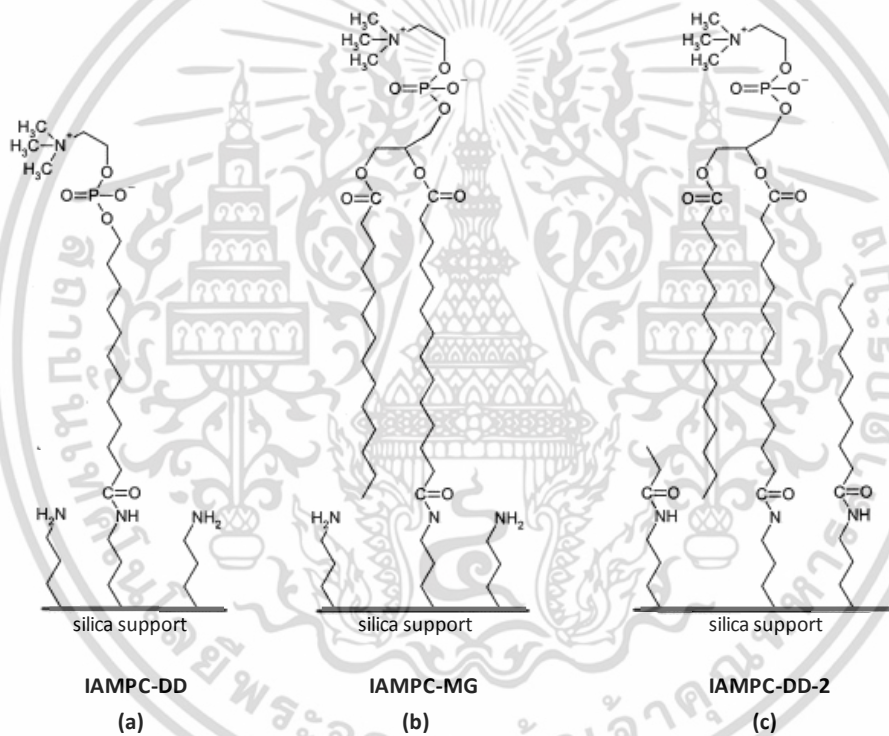
สิ่งเจือปน (impurity) ในสารตัวอย่างมีผลต่อการวิเคราะห์น้อย เนื่องจากเกิดการแยกในระหว่างที่สารตัวอย่างเคลื่อนที่ผ่านคอลัมน์ จึงถือว่าเป็นข้อดีหนึ่งสำหรับการวิเคราะห์ด้วยเทคนิค HPLC เพราะในขั้นตอนของการค้นหาหาใหม่ ยาที่ค้นพบหรือที่สังเคราะห์ได้ มักจะยังเป็นสารที่ไม่บริสุทธิ์

#### 2.4 เทคนิคโครมาโทกราฟีร่วมกับเยื่อหุ้มเซลล์จำลอง (immobilized artificial membrane (IAM) chromatography) [9,11]

เป้าหมายหลักของการศึกษาค่า  $P_{ow}$  ในยา คือ เพื่อนำไปใช้ในการทำนายสมบัติการแพร่ของยาผ่านเยื่อหุ้มเซลล์ ด้วยเหตุนี้เทคนิครีเวอร์สเฟส HPLC จึงมีข้อด้อยที่ว่า คอลัมน์ C18 ยังไม่ใช่แบบจำลองที่ดีของเยื่อหุ้มเซลล์ ดังนั้นจึงได้มีการนำเสนอการใช้ฟอสโฟลิปิดมายึดติดบนผิวอนุภาคของแข็งซิลิกา (silica solid support) เพื่อใช้เป็นเฟสอยู่นิ่งแทน C18 การยึดฟอสโฟลิปิดบนผิวของซิลิกา ทำได้โดยการเชื่อมพันธะโควาเลนต์ระหว่างฟอสโฟลิปิดกับหมู่ไฮดรอกซิลของซิลิกา (รูปที่ 5) และเรียกคอลัมน์นี้ว่า คอลัมน์ IAM

ในปัจจุบัน บริษัท Regis Technologies [11] ได้มีการผลิตและพัฒนาคอลัมน์ IAM ออกมาหลากหลายชนิด ที่นิยมมากที่สุดได้แก่ คอลัมน์ IAMPC (immobilized artificial membrane

phosphatidylcholine) ซึ่งใช้ฟอสฟาติลโคลีนเป็นเฟสอยู่นิ่ง เนื่องจากฟอสฟาติลโคลีนเป็นฟอสโฟลิปิดชนิดหนึ่งที่พบเป็นองค์ประกอบหลักในเยื่อหุ้มเซลล์ คอลัมน์ IAMPC สามารถจำแนกเป็น 3 ชนิดหลักๆ ได้แก่ แบบฟอสฟาติลโคลีนสายเดี่ยว (IAMPC-DD), แบบฟอสฟาติลโคลีนสายคู่ (IAMPC-MG) และแบบฟอสฟาติลโคลีนสายคู่ที่มีการปิด (end-capped) หมู่โพรพิลอะมิโนบนผิวซิลิกา (IAMPC-DD-2) (รูปที่ 5) จากรายงานผลการวิจัย [9] พบว่า คอลัมน์ที่มีฟอสฟาติลโคลีนแบบสายคู่เป็นเฟสอยู่นิ่งเป็นแบบจำลองที่ใกล้เคียงกับเยื่อหุ้มเซลล์ในธรรมชาติมากที่สุด และให้ผลการวิเคราะห์ค่า log P ที่ดีออกมาใกล้เคียงกับพฤติกรรมของยาในการแพร่ผ่านเซลล์ดีกว่าคอลัมน์แบบอื่นๆ



รูปที่ 5. โครงสร้างของฟอสฟาติลโคลีนที่เป็นเฟสอยู่นิ่งในคอลัมน์ IAM ชนิดต่างๆ  
(a) ฟอสฟาติลโคลีนสายเดี่ยว (b) ฟอสฟาติลโคลีนสายคู่ และ (c) ฟอสฟาติลโคลีนสายคู่ที่มีการปิดหมู่โพรพิลอะมิโนบนผิวซิลิกา [12]

นอกจากนี้คอลัมน์ IAM ยังมีข้อดีที่ว่า สามารถใช้น้ำเป็นเฟสเคลื่อนที่ได้ โดยไม่ต้องมีการเติมสารอินทรีย์ ทำให้สามารถวิเคราะห์ค่า  $\log k_w$  ได้โดยตรง และลดขั้นตอนของการทดลองให้น้อยลง

ด้วย อย่างไรก็ตาม ในกรณีที่ตัวอย่างสามารถกระจายตัวได้ดีในเฟสอยู่นิ่ง การใช้น้ำเป็นเฟสเคลื่อนที่เพียงอย่างเดียว อาจใช้เวลาในการชะสารออกมาจากคอลัมน์นาน ดังนั้นจึงจำเป็นต้องมีการเติมสารอินทรีย์ลงในเฟสเคลื่อนที่ เพื่อให้ได้ค่าพาคิติกแฟกเตอร์ที่เหมาะสมและไม่ใช้เวลานานในการวิเคราะห์นานเกินไป ซึ่งในกรณีนี้จำเป็นต้องอาศัยสมการที่ (7) และทำการทดลองดังที่ได้อธิบายในหัวข้อ 2.3 เพื่อพล็อตกราฟหาค่า  $\log k_w$

ข้อจำกัดหนึ่งของคอลัมน์ IAM คือ ทนพีเอชได้ในช่วง 2.5 ถึง 7.4 ดังนั้นในหลายๆ งานวิจัย ได้มีการเลือกพีเอชของเฟสเคลื่อนที่เท่ากับ 7.0 เพื่อยืดอายุการใช้งานของคอลัมน์ และในกรณีที่ต้องใช้สารอินทรีย์ในเฟสเคลื่อนที่ ควรจะเลือกใช้อะซิโตน ไตรคลอโรเอเทน เนื่องจากเมทานอลสามารถทำให้ฟอสโฟลิปิดเกิดการสลายตัวได้ (methanolysis) [9]

## 2.5 เทคนิคไมเซลล์อิเล็กโตรโครมาโตกราฟี (micellar electrokinetic chromatography; MEKC) [5, 13-14]

MEKC เป็นหนึ่งในเทคนิคในกลุ่มของแคพิลลารีอิเล็กโตรโฟเรซิส (capillary electrophoresis) ซึ่งสามารถแยกสารที่ไม่มีประจุภายใต้สนามไฟฟ้าได้ ในเทคนิค MEKC ไมเซลล์จะทำหน้าที่เสมือนเป็นเฟสอยู่นิ่ง (pseudo-stationary phase) ซึ่งโดยทั่วไปแล้วนิยมใช้โซเดียมโดเดซิลซัลเฟต (sodium dodecyl sulfate; SDS) ในการสร้างเป็นไมเซลล์ และใช้สารละลายบัฟเฟอร์เป็นเฟสเคลื่อนที่

โครงสร้างและลักษณะการเกิดไมเซลล์ของ SDS แสดงดังรูปที่ 6 จากรูป ภายในไมเซลล์เป็นส่วนที่ไม่ชอบน้ำ ในขณะที่ผิวรอบนอกของไมเซลล์มีสภาพประจุเป็นลบอันเนื่องมาจากหมู่ซัลเฟต ดังนั้นโครงสร้างของไมเซลล์จึงเทียบเคียงได้กับฟอสโฟลิปิดเลเยอร์ของเยื่อหุ้มเซลล์ ด้วยเหตุนี้พฤติกรรมการกระจายตัวของยาระหว่างภายในไมเซลล์กับสารละลายบัฟเฟอร์ จึงสามารถนำมาประเมินค่า  $P_{ow}$  ได้เป็นอย่างดี



รูปที่ 6. โครงสร้างของโซเดียมโดเดซิลซัลเฟต และลักษณะของไมเซลล์

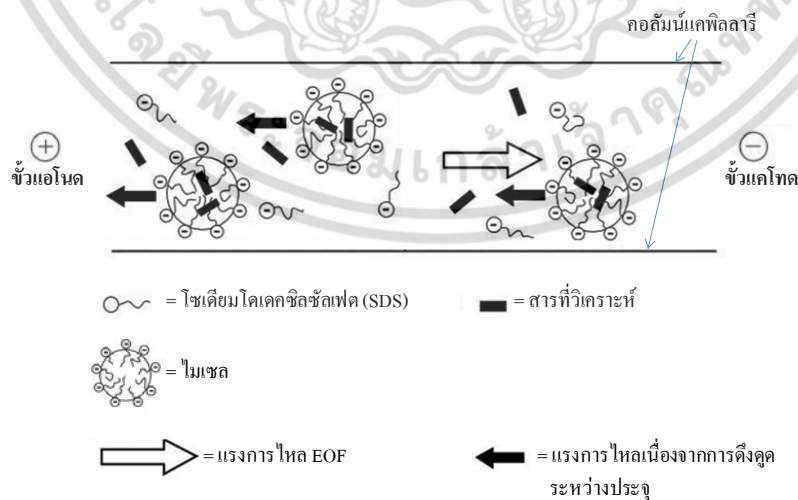
เมื่อทำการให้ศักย์ไฟฟ้าคร่อมปลายทั้งสองของแคปิลลารีคอลัมน์ จะเกิดแรงเคลื่อนที่เรียกว่าอิเล็กโตรออสโมติก (electroosmotic flow; EOF) ทำให้สารละลายภายในท่อแคปิลลารีเคลื่อนที่ไปทางขั้วแคโทดซึ่งเป็นขั้วลบ อย่างไรก็ตามจะไม่เคลื่อนที่ไปได้ช้ากว่าแรง EOF เนื่องจากมีแรงต้านการไหลที่เกิดจากแรงดึงดูดระหว่างประจุลบบนผิวของไมเซลกับขั้วแอโนดซึ่งเป็นขั้วบวก แผนภาพแสดงหลักการแยกด้วยเทคนิค MEKC แสดงดังรูปที่ 7 ดังนั้นค่าพหุคูณที่แฟกเตอร์ของสารตัวอย่าง สามารถคำนวณได้โดยอาศัยสมการที่ (8) [5]

$$k'_{MEKC} = \frac{t_R - t_{EOF}}{\left(1 - \frac{t_R}{t_M}\right) t_{EOF}} \quad \dots(8)$$

เมื่อ  $t_R$  คือ เวลาที่สารที่ต้องการวิเคราะห์ค้างอยู่ในคอลัมน์  
 $t_{EOF}$  คือ เวลาของสารที่มีสภาพเป็นกลาง และไม่มีกระจายตัวในไมเซลคงอยู่ในคอลัมน์ โดยทั่วไปนิยมใช้เมทานอลในการระบุค่า  $t_{EOF}$   
 $t_M$  คือ เวลาคงอยู่ในคอลัมน์ของไมเซล โดยทั่วไปนิยมใช้สารที่กระจายตัวได้ดีในไมเซล เช่น โดเดคาโนฟีโนน (n-dodecanophenone) ในการระบุค่า  $t_M$

ค่า  $\log k'_{MEKC}$  หรือเรียกว่า ค่าดัชนีไมเกรชัน (migration index) สามารถนำมาหาค่า  $\log P_{OW}$  ได้ โดยการเทียบกับกราฟมาตรฐานซึ่งเป็นกราฟความสัมพันธ์ระหว่าง ค่า  $\log k'_{MEKC}$  ที่ได้จากการทดลองของสารมาตรฐานที่ทราบ  $\log P_{OW}$  เช่นเดียวกับวิธีในเทคนิค HPLC

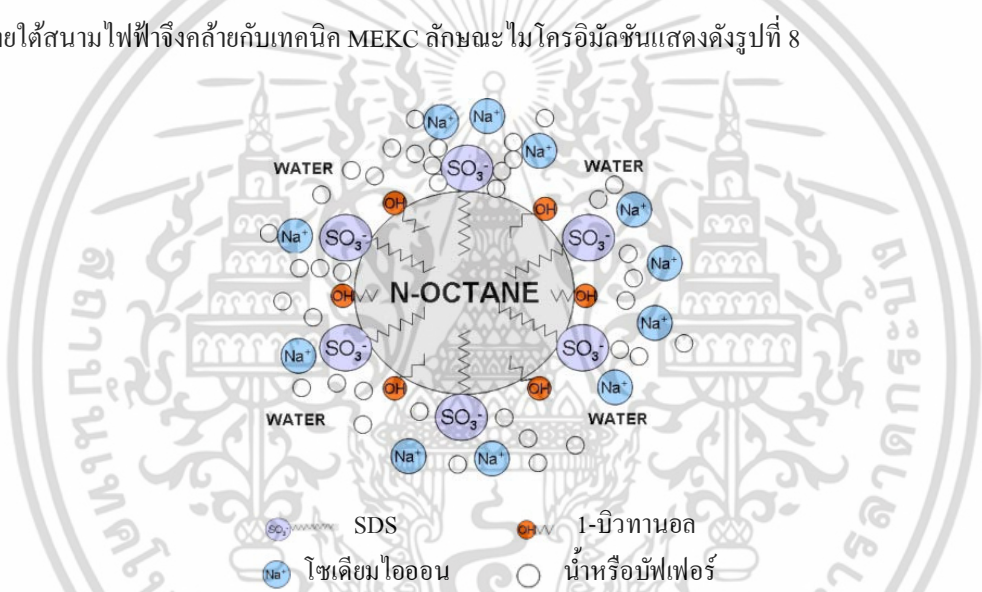
เทคนิค MEKC สามารถใช้วิเคราะห์หาค่า  $\log P_{OW}$  ได้ดีในช่วง  $-2.3 < \log P_{OW} < 6.2$  และมีค่าความคลาดเคลื่อนของการวิเคราะห์อยู่ในช่วง  $\pm \log 0.5$  [15]



รูปที่ 7. แผนภาพแสดงการแยกสารด้วยเทคนิค MEKC [16]

**2.6 เทคนิคไมโครอิมัลชัน อิเล็กโตรไคเนติกโครมาโทกราฟี (microemulsion electrokinetic chromatography; MEEKC) [5, 13-14, 16]**

หลักการของ MEEKC ในการหาค่า  $P_{ow}$  จะคล้ายกับเทคนิค MEKC แต่ในเทคนิค MEEKC จะเปลี่ยนจากการใช้ไมเซลเป็นการใช้หยดน้ำมันขนาดเล็กในระดับนาโนเมตรแทน ที่นิยมใช้ได้แก่ เฮกเซน เฮปเทน และออกเทน เป็นต้น โดยมีการเติมสารลดแรงตึงผิว (surfactant) เช่น SDS และสารร่วมลดแรงตึงผิว (co-surfactant) เช่น บิวทานอล ลงไปเพื่อช่วยลดแรงตึงผิวระหว่างหยดน้ำมันซึ่งทำหน้าที่เสมือนเฟสอยู่นิ่ง กับเฟสเคลื่อนที่ซึ่งเป็นสารละลายบัฟเฟอร์ ทำให้หยดน้ำมันมีความเสถียรเพิ่มขึ้นด้วย นอกจากนี้สารลดแรงตึงผิวยังทำให้สภาพผิวของหยดน้ำมันเป็นลบ ดังนั้นกลไกการแยกและการเคลื่อนที่ภายใต้สนามไฟฟ้าจึงคล้ายกับเทคนิค MEKC ลักษณะไมโครอิมัลชันแสดงดังรูปที่ 8



รูปที่ 8. ลักษณะไมโครอิมัลชัน โดยมีออกเทนเป็นหยดน้ำมัน และใช้โซเดียมโดเดซิลซัลเฟต (SDS) และบิวทานอลเป็นสารลดแรงตึงผิวและสารร่วมลดแรงตึงผิวตามลำดับ [16]

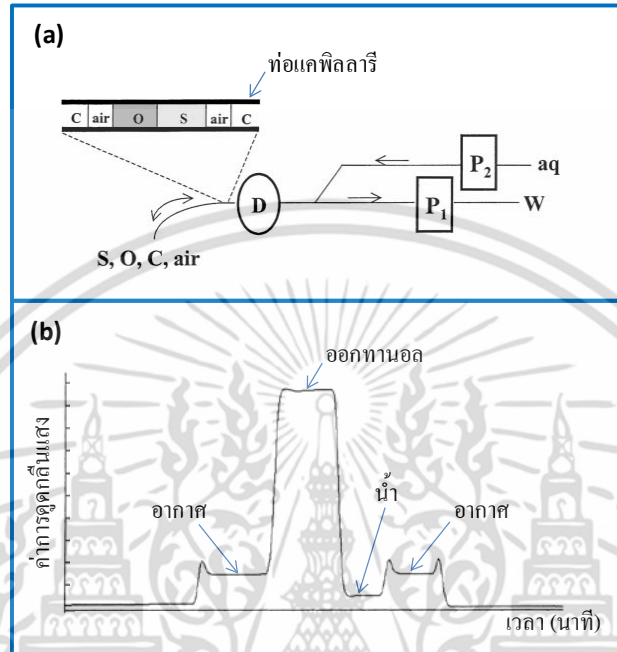
เทคนิค MEEKC สามารถใช้วิเคราะห์ค่า  $\log P_{ow}$  ได้ดีในช่วง  $-0.5 < \log P_{ow} < 4.5$  และมีค่าความคลาดเคลื่อนของการวิเคราะห์ที่อยู่ในช่วง  $\pm \log 0.2$  [15] เมื่อเปรียบเทียบการหาค่า  $P_{ow}$  ด้วยเทคนิค MEKC และ MEEKC พบว่า เทคนิค MEEKC จะให้ผลการวิเคราะห์ที่ใกล้เคียงกับผลที่ได้จากวิธีการเขย่ามากกว่า [13] นอกจากนี้ยังได้มีการพัฒนาเทคนิค MEEKC โดยการใส่ลิโปโซมแทนหยดน้ำมัน และเรียกเทคนิคนี้ว่า ลิโปโซมอิเล็กโตรไคเนติกโครมาโทกราฟี (liposome electrokinetic chromatography; LEKC) ซึ่งลิโปโซมมีคุณสมบัติใกล้เคียงกับเยื่อหุ้มเซลล์ ดังนั้นจึงให้ผลการวิเคราะห์ที่ดีขึ้นด้วย อย่างไรก็ตาม

ตามเทคนิค LEKC ยังไม่ได้รับความนิยมเท่าไรนัก เนื่องจากการเตรียมหยดลิโปโซมให้มีความเสถียรทำได้ยาก ส่งผลให้การวิเคราะห์ซ้ำได้ผลไม่ใกล้เคียงกัน

## 2.7 เทคนิคการไหล (flow-based techniques) [17-18]

เทคนิคการไหลได้ถูกนำมาประยุกต์ใช้ในการหาค่า  $P_{ow}$  โดยอาศัยหลักการสกัดภายในท่อขนาดเล็กที่มีการไหลอย่างต่อเนื่อง ซึ่งข้อดีของการนำระบบการไหลมาช่วยในการสกัดคือ ใช้สารตัวอย่างและตัวทำละลายน้อย ทำให้ระบบเข้าสู่สมดุลได้เร็วขึ้น การทำซ้ำให้ผลการวิเคราะห์ที่ใกล้เคียงกัน เนื่องจากระบบการไหลมักจะกำหนดให้อัตราการไหลของสารละลายคงที่ ดังนั้นการสกัดจึงเกิดภายใต้สภาวะที่คงที่ และใช้เวลาในการสกัดเท่ากันทุกครั้งก่อนจะทำการตรวจวัด งานวิจัยที่ใช้ระบบการไหลในการหาค่า  $P_{ow}$  ได้ถูกนำเสนอและพัฒนาอย่างต่อเนื่อง ดังตัวอย่างต่อไปนี้

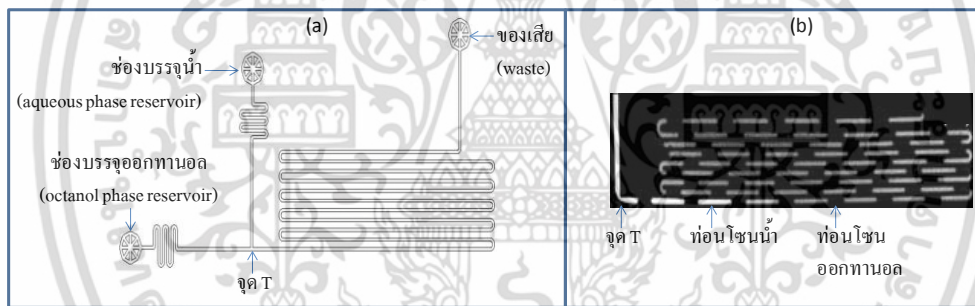
Carlsson และ Karlberg [17] ได้พัฒนาระบบการสกัดภายในท่อแก้วแคพิลลารีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 250 ไมโครเมตร ควบคู่กับการตรวจวัดบนคอลัมน์ด้วยยูวีสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ (on-column UV spectrophotometer) ทำให้สามารถวัดค่าการดูดกลืนแสงของยาที่กระจายอยู่ในชั้นออกทานอลและน้ำได้ในคราวเดียวกัน รูปที่ 9(a) แสดงระบบการสกัดซึ่งประกอบด้วยมีม 2 ตัว ทำหน้าที่ควบคุมทิศทางและอัตราการไหลของสารละลาย การทำงานของระบบเริ่มจาก มีมตัวที่ 1 ทำหน้าที่ดูดท่อนอากาศ, สารตัวอย่างที่ละลายในน้ำ, ออกทานอล ตามด้วยท่อนอากาศอีกครั้ง ผ่านปลายเปิดของท่อแคพิลลารีเข้ามาภายในระบบโดยมีน้ำเป็นสารละลายตัวพา (carrier) ท่อนอากาศจะทำหน้าที่ป้องกันไม่ให้ตัวทำละลายทั้งสองเฟสสัมผัสกับสารละลายตัวพา ดังนั้นการสกัดจะเกิดระหว่างท่อน โซนสารตัวอย่างในชั้นน้ำกับท่อน โซนออกทานอลเท่านั้น มีมตัวที่ 1 จะดูดท่อน โซนทั้งหมดให้เคลื่อนที่ผ่านเครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ (จากรูป 9(a) ทิศทางการไหลจากซ้ายไปขวา) หลังจากนั้น มีมตัวที่ 1 จะหยุดทำงาน ขณะเดียวกัน มีมตัวที่ 2 จะทำหน้าที่ผลักท่อน โซนทั้งหมดในทิศตรงข้าม เพื่อให้ท่อน โซนเคลื่อนที่ผ่านเครื่องตรวจวัดอีกครั้ง (จากรูป 9(a) ทิศทางการไหลจากขวาไปซ้าย) การบันทึกสัญญาณจะเกิดขึ้นในขณะที่ มีมตัวที่ 2 ทำงาน มีมทั้งสองจะทำงานสลับกันไปเรื่อยๆ เปรียบได้กับการเขย่าสารละลาย จนกระทั่งค่าการดูดกลืนแสงของทั้งสองเฟสคงที่ ซึ่งหมายถึงระบบการสกัดเข้าสู่สมดุลแล้ว ตัวอย่างรูปร่างสัญญาณที่บันทึกได้แสดงดังรูปที่ 9(b) สำหรับการวิเคราะห์ตัวอย่างซ้ำครั้งต่อไป ทำได้โดยการดูดน้ำผ่านมีมตัวที่ 2 ย้อนกลับไปยังปลายเปิดของท่อแคพิลลารีเพื่อทำการล้างระบบก่อนทุกครั้ง



รูปที่ 9. (a) ระบบการไหลที่ใช้ในการวิเคราะห์หาค่า  $P_{ow}$  เมื่อ  $P_1$  และ  $P_2$  = ปั๊มตัวที่ 1 และ 2, D = สเปคโตรโฟโตมิเตอร์, S = สารตัวอย่างในชั้นน้ำ, O = ออกทานอล, C = สารละลายตัวพา, W = ภาชนะบรรจุของเสีย และ aq = น้ำสำหรับล้างระบบ และ (b) แสดงตัวอย่างรูปร่างสัญญาณที่บันทึกได้จากเครื่องตรวจวัด [17]

การหาค่า  $P_{ow}$  ทำได้โดย นำค่าการดูดกลืนแสงของยาในทั้งสองเฟสไปเทียบกับกราฟมาตรฐาน เพื่อคำนวณเป็นความเข้มข้นของยาในทั้งสองเฟสต่อไป จากผลการวิจัย เมื่อนำระบบในรูป 9(a) ไปวิเคราะห์ยาจำนวน 5 ตัวอย่าง พบว่า ค่า  $\log P_{ow}$  ที่ได้ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเปรียบเทียบกับผลที่ได้จากวิธีการเขย่าและค่าอ้างอิงจากงานวิจัยอื่นๆ โดยมีค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานของการวิเคราะห์ในแต่ละตัวอย่างต่ำกว่า  $\pm \log 0.2$  ซึ่ง OECD ได้กำหนดไว้ว่าความเที่ยงของการวิเคราะห์ (precision) ควรมีค่า  $\log P_{ow}$  ไม่เกิน  $\pm \log 0.3$  ดังนั้นจึงถือได้ว่าระบบวิเคราะห์นี้มีความน่าเชื่อถือ นอกจากนี้ งานวิจัยนี้ยังมีข้อดีคือ มีความเป็นอัตโนมัติ ใช้สารตัวอย่างน้อย (ประมาณ 250 ไมโครลิตร) ทำให้ระบบเข้าสู่สมดุลได้เร็ว ส่งผลให้ใช้เวลาในการวิเคราะห์น้อย (ประมาณ 4 นาทีต่อการหนึ่งการวิเคราะห์) ดังนั้นระบบนี้จึงมีความเป็นไปได้ในการนำไปประยุกต์ใช้เพื่อคัดกรอง หาค่า  $P_{ow}$  ของยาในขั้นตอนของการค้นหาใหม่

Marine และคณะ [18] ได้เสนอระบบปฏิบัติการบนชิ้นงานขนาดเล็ก ที่เรียกว่า ไมโครชิป (microchip) เพื่อหาค่า  $P_{ow}$  โดยในระบบนี้จะใช้สารในระดับพิโคลิตร ทำให้ระบบเข้าสู่สมดุลได้รวดเร็วภายใน 2 วินาที โดยชิ้นงานไมโครชิปนี้ทำจากพอลิเมอร์ที่มีชื่อว่า โพลีไดเมทิลไซลอกเซน (Polydimethylsiloxane; PDMS) ประกอบบนแผ่นแก้ว และออกแบบช่อง (channel) การไหลของสารละลายดังแสดงในรูป 10(a) ซึ่งขนาดความกว้างและความสูงของช่องเท่ากับ 100 และ 30 ไมโครเมตรตามลำดับ การทำงานของระบบเริ่มจากการบีบออกทานอลและน้ำเข้ามาผสมกันที่จุด T (รูป 10(a)) เกิดเป็นท่อนโซนสองเฟสสลับกันไป ในงานวิจัยนี้ได้ใช้สารฟลูออเรสเซิน (fluorescien) ที่ละลายในน้ำเป็นแบบจำลองแทนตัวอย่างยา และตรวจวัดแสงฟลูออเรสเซนต์โดยการถ่ายภาพด้วยกล้องซีซีดี (CCD camera) จากรูป 10(b) ท่อนโซนสว่างคือชั้นน้ำที่มีฟลูออเรสเซินละลายอยู่ ส่วนท่อนโซนมืดคือชั้นออกทานอล การสกัดจะเริ่มเกิดขึ้นที่จุด T ดังนั้นจะเห็นว่าท่อนโซนนี้นี้มีความสว่างลดลงเนื่องจากฟลูออเรสเซินเริ่มกระจายตัวเข้าไปในชั้นของออกทานอล เมื่อถึงสมดุลของการสกัด แถบสว่างของชั้นน้ำก็จะมีค่าคงที่



รูปที่ 10. (a) ระบบปฏิบัติการบนไมโครชิป และ (b) แสดงภาพถ่ายบันทึกแสงฟลูออเรสเซนต์ของสารฟลูออเรสเซินในขณะไหลอยู่ในไมโครชิป [18]

ถ้าสำหรับงานวิจัยนี้อันุมาณว่า ค่าความเข้มแสงฟลูออเรสเซนต์ (fluorescent intensity) แปรตามความเข้มข้น ดังนั้นการหาค่า  $P_{ow}$  ทำได้โดยการหาอัตราส่วนความเข้มแสงฟลูออเรสเซนต์ในชั้นออกทานอลต่อชั้นน้ำ แม้ว่าระบบปฏิบัติการบนไมโครชิปจะให้ผลการวิเคราะห์ที่รวดเร็ว แต่ระบบนี้ยังมีข้อจำกัดอยู่หลายอย่างเช่น การวิเคราะห์และการเก็บรักษาไมโครชิปควรทำในห้องที่ปราศจากฝุ่นละออง (clean room) เนื่องจากช่องการไหลมีขนาดเล็กจึงอาจเกิดการอุดตันได้ง่าย และเมื่อใช้การตรวจวัดโดยเทคนิคยูวี-วิสิเบิล สเปคโตรโฟโตเมทรี อาจมีข้อจำกัดในแง่ของความไวในการตรวจวัด (sensitivity) ต่ำ เนื่องจากระยะทางที่แสงผ่านสารละลายมีค่าน้อย

### 3. เปรียบเทียบจุดเด่นและจุดด้อยของแต่ละวิธี

โดยทั่วไปแล้ว ค่าสัมประสิทธิ์การกระจายตัวที่ได้จากวิธีการเขย่าและการปั่นกวนสารละลาย ยังถือเป็นค่าที่ดีและน่าเชื่อถือในการอธิบายสมบัติการแพร่ผ่านเยื่อหุ้มเซลล์ของยา แต่วิธีการเหล่านี้ใช้เวลาในการวิเคราะห์นาน และไม่มีความเป็นอัตโนมัติ ต้องอาศัยแรงงานในการทำทดลอง และใช้ตัวทำละลายในปริมาณมาก อย่างไรก็ตาม ปัญหานี้สามารถแก้ไขได้โดยการอาศัยระบบการไหลมาช่วยในการวิเคราะห์ ทำให้ระบบมีความเป็นอัตโนมัติและการวิเคราะห์ซ้ำให้ผลใกล้เคียงกันมากขึ้น ในขณะที่เทคนิคโครมาโทกราฟีและอิเล็กโตรโฟรีซิส ถือเป็นทางเลือกที่น่าสนใจ โดยมีจุดเด่นที่ว่า สิ่งปนเปื้อนในยาไม่มีผลต่อการวิเคราะห์ เนื่องจากถูกกำจัดหรือแยกออกในกระบวนการแยกที่เกิดภายในคอลัมน์ แต่ทั้งสองเทคนิคนี้ต้องอาศัยเครื่องมือที่มีราคาแพงและผู้ชำนาญในการใช้เครื่องมือ จุดเด่นและจุดด้อยของแต่ละวิธีสรุปได้ดังตารางที่ 2

ตารางที่ 2. เปรียบเทียบจุดเด่นและจุดด้อยของแต่ละวิธีที่ใช้ในการหาค่า  $P_{ow}$

วิธี/เทคนิค	จุดเด่น	จุดด้อย
1. การเขย่า และการกวนสารละลาย	- ค่า $\log P_{ow}$ ที่ได้ ใช้อธิบายการดูดซึมยาในลำไส้ และหลอดเลือดฝอยในสมอง (blood brain barrier; BBB) ได้เป็นอย่างดี	- ใช้เวลาในการวิเคราะห์นาน - ไม่มีความเป็นอัตโนมัติ - สิ่งปนเปื้อนอาจส่งผลกระทบต่อวิเคราะห์ - ใช้สารตัวอย่างค่อนข้างมาก
2. โครมาโทกราฟี และอิเล็กโตรโฟรีซิส	- สิ่งปนเปื้อนไม่รบกวนต่อการวิเคราะห์ - อาศัยเครื่องมือในการวิเคราะห์ จึงมีความเป็นอัตโนมัติมากขึ้น และใช้แรงงานน้อยลง - ใช้เวลาในการวิเคราะห์ปานกลาง	- จำเป็นต้องเทียบมาตรฐาน (calibration) โดยอาศัยกลุ่มยาที่มีโครงสร้างทางเคมีคล้ายคลึงกับสารตัวอย่าง - การเปลี่ยนคอลัมน์และสภาวะการทดลองอาจส่งผลกระทบต่อผลการวิเคราะห์
3. ระบบการไหล	- ใช้เวลาในการวิเคราะห์น้อย - สามารถทำให้ระบบมีความเป็นอัตโนมัติได้ - ใช้สารตัวอย่างปริมาณน้อย	- สิ่งปนเปื้อนอาจส่งผลกระทบต่อวิเคราะห์

#### 4. สรุปผลการวิจัย

การหาค่า  $P_{OW}$  เพื่อใช้อธิบายสมบัติไลโปฟิลิซิตีของยาสามารถทำได้หลายวิธี เช่น วิธีการเขย่า วิธีการกวนสารละลาย เทคนิคโครมาโทกราฟี เทคนิคอิเล็กโทรโฟรีซิส และเทคนิคการไหล เป็นต้น ซึ่งค่า  $P_{OW}$  นี้เป็นเพียงตัวเลขแสดงแนวโน้มสมบัติไลโปฟิลิซิตีเท่านั้น การดูซึมยาในร่างกายอาจเหมือนหรือแตกต่างอย่างสิ้นเชิงจากค่า  $P_{OW}$  ที่ได้จากการทดลอง ดังนั้นจึงมีหลายงานวิจัยที่ได้พยายามปรับปรุงให้ค่าที่ได้จากการทดลองใกล้เคียงกับสมบัติจริงๆ ของยา โดยการจำลองสภาวะการทดลองให้ใกล้เคียงกับเยื่อหุ้มเซลล์มากที่สุด เช่น การใช้ลิโปโซมเป็นแบบจำลองแทนเยื่อหุ้มเซลล์ เป็นต้น การจะระบุว่าวิธีการใดเป็นวิธีการที่ดีที่สุดในการหาค่า  $P_{OW}$  คงทำได้ยาก เนื่องจากแต่ละวิธีอาจเหมาะสมต่อการวิเคราะห์กลุ่มยาที่แตกต่างกันไป และหลายงานวิจัยมักจะเสนอเฉพาะผลการทดลองที่ดีเท่านั้น ดังนั้นหน่วยงานหรือองค์กรที่ศึกษาวิจัยเกี่ยวกับการค้นหายาใหม่ อาจจำเป็นต้องพิจารณาต้นทุน ความสะดวก และเครื่องมือที่มีอยู่เป็นเกณฑ์หลักในการเลือกวิธีวิเคราะห์

#### เอกสารอ้างอิง (References)

- [1] Johns, J., 2011. Estimation of melatonin blood brain barrier permeability. *J. Bioanal. Biomed.*, 3(3), 64-69.
- [2] Chen, Z. and Weber, S. G., 2007. High-throughput method for lipophilicity measurement. *Anal. Chem.*, 79(3), 1043-1049.
- [3] Barzanti, C., Evans, R., Fouquet, J., Gouzin, L., Howarth, N. M., Kean, G., Levet, E., Wang, D., Wayemberg, E., Yeboah, A. A. and Kraft, A., 2007. Potentiometric determination of octanol-water and liposome-water partition coefficients (log P) of ionizable organic compounds. *Tetrahedron Lett.*, 48(19), 3337-3341.
- [4] Dabrowska, M., Starek, M. and Skuciński, J., 2011. Lipophilicity study of some non-steroidal anti-inflammatory agents and cephalosporin antibiotics: a review. *Talanta*, 86, 35-51.
- [5] Hartmann, T. and Schmitt, J., 2004. Lipophilicity – beyond octanol/water: a short comparison of modern technologies. *Drug Discov. Today: Technologies*, 4, 431-439.
- [6] Danielsson, L-G. and Zhang, Y-H., 1996. Methods for determining n-octanol-water partition constants. *Trends Anal. Chem.*, 15(4), 188-195.

- [7] Finizio, A., Vighi, M. and Sandroni, D., 1997. Determination of n-octanol/water partition coefficient (Kow) of pesticide critical review and comparison of methods. *Chemosphere*, 34(1), 131-161.
- [8] Organization for Economic Cooperation and Development (OECD), 1995. OECD guideline for the testing of chemicals No. 107, partition coefficient (n-octanol/water): shake flask method. [online] available at: <http://www.oecd-ilibrary.org>
- [9] Giaginis, C. and Tsantili-Kakoulidou, A., 2008. Current state of the art in HPLC methodology for lipophilicity assessment of basic drugs. A review. *J. Liq. Chromatogr. Relat. Technol.*, 31, 79-96.
- [10] Valkó, K., 2004. Application of high-performance liquid chromatography based measurements of lipophilicity to model biological distribution. *J. Chromatogr. A*, 1037, 299-310.
- [11] IAM Chromatography, HPLC Tools for Drug Membrane Permeability Prediction. [online] available at: <http://www.registech.com>
- [12] Markuszewski, M. and Kaliszan, R., 2002. Quantitative structure-retention relationships in affinity high-performance liquid chromatography. *J. Chromatogr. B*, 768(1), 55-66.
- [13] Huie, C.W., 2006. Recent applications of microemulsion electrokinetic chromatography. *Electrophoresis*, 27, 60-75.
- [14] Poole, S.K. and Poole, C.F., 2003. Separation methods for estimating octanol-water partition coefficients. *J. Chromatogr. B*, 797, 3-19.
- [15] Hancu, G., Rusu, A., Simon, B., Boia, G. and Gyéresi, Á., 2012. Simultaneous separation of ciprofloxacin, norfloxacin and ofloxacin by micellar electrokinetic chromatography. *J. Braz. Chem. Soc.*, 23(10), 1889-1894.
- [16] Yu, L., Chu, K., Ye, H., Liu, X., Yu, L., Xu, X. and Chen, G., 2012. Recent advances in microemulsion electrokinetic chromatography. *Trends Anal. Chem.*, 34, 140-151.
- [17] Carlsson, K. and Karlberg, B., 2000. Determination of octanol-water partition coefficients using a micro-volume liquid-liquid flow extraction system. *Anal. Chim. Acta*, 423, 137-144.
- [18] Marine, N.A., Klein, S.A. and Posner, J.D., 2009. Partition coefficient measurements in picoliter drops using a segmented flow microfluidic device. *Anal. Chem.*, 81, 1471-1476.