

วิธีวิเคราะห์ค่าสัมประสิทธิ์การกระจายตัวของยา

Determination of the Partition Coefficient of Drugs

เสาวภาคย์ ชีราทรง

Saowapak Teerasong

สาขาวิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง กรุงเทพมหานคร

บทคัดย่อ

ไลโปฟิลิซิตีเป็นสมบัติที่เกี่ยวกับกายภาพและเคมีอย่างหนึ่งของสาร ที่นิยมนศึกษาในกระบวนการพัฒนาและค้นหายาใหม่ สมบัตินี้ใช้ในการอธิบายถึงความสามารถของสารในการซึมผ่านเยื่อหุ้มเซลล์ ถ้าสารมีสมบัติไลโปฟิลิซิตีอยู่ในช่วงที่เหมาะสม สารนั้นจะถูกพิจารณานำมาพัฒนาเป็นยาต่อไป 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.

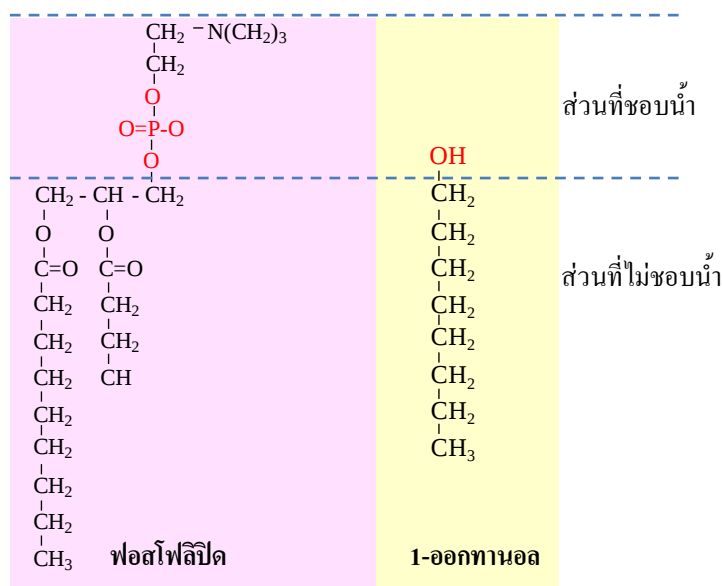
Keywords: Partition coefficient, Lipophilicity

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} (บางครั้งใช้ K_{OW}) โดยที่ชั้นน้ำ จะนิยมใช้เป็นสารละลายบัฟเฟอร์พีเอช 7.4 ซึ่งเป็นค่าพีเอชของของเหลวในร่างกาย ในขณะเดียวกันชั้นออกทานอลจะเทียบเคียงได้กับฟอสโฟลิปิดเลเยอร์ (phospholipid layer) ของเยื่อหุ้มเซลล์ นั่นคือประกอบไปด้วยส่วนหัวที่มีขั้ว (hydrophilic head) และส่วนหางที่เป็นสายไฮโดรคาร์บอนซึ่งไม่ชอบน้ำ (hydrophobic tail) ดังรูปที่ 1



รูปที่ 1. การเปรียบเทียบโครงสร้างของฟอสโฟลิปิดเลเยอร์ในเยื่อหุ้มเซลล์กับ 1-ออกทานอล

ถ้าเรามีค่า P_{OW} สูง แสดงว่า ยานั้นสามารถกระจายตัวได้ดีในชั้นของออกทานอล ซึ่งหมายความว่า ยานั้นน่าจะมีความสามารถในการซึมผ่านเยื่อหุ้มเซลล์ได้ดีด้วย โดยทั่วไปนิยมรายงานค่า P_{OW} ให้อยู่ในรูปของเลขลอการิทึม ($\log P_{OW}$) เพื่อจะได้ตัวเลขที่มีค่าน้อย นอกจากการใช้ออกทานอลเป็นแบบจำลองแทนเยื่อหุ้มเซลล์แล้ว บางงานวิจัยได้มีการนำเสนอการใช้สารอินทรีย์ตัวอื่นๆ เช่น ไซโคลเฮกเซน [1], พอลิ(ไวนิลคลอไรด์) [2] และลิโปโซม [3] มาแทนการใช้ออกทานอล อย่างไรก็ตามวิธีเหล่านี้ได้รับความนิยมน้อยเมื่อเทียบกับการใช้ออกทานอล เนื่องจากออกทานอลเป็นสารที่กำหนดใช้ในวิธีมาตรฐาน จึงเป็นสารที่นิยมใช้และให้ผลที่น่ายอมรับมากที่สุดจากการใช้สารเคมีอื่นๆ

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

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

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

ถ้าสารนั้นแตกตัวได้ดี นั่นคือ $pH - pK_a$ (กรณีกรดอ่อน) หรือ $pK_a - pH$ (กรณีเบสอ่อน) มีค่ามากกว่า 1 จะสามารถประมาณค่า D ได้จากสมการที่ (4) และ (5) [4]

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

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

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 (พีเอช 7.4)	ผลของยาต่อระบบในร่างกาย
ต่ำกว่า 0	- มีปัญหาในการแพร่ผ่านเซลล์ในระบบทางเดินอาหาร (intestinal system) และระบบประสาทส่วนกลาง (central nervous system; CNS) - กำจัดออกทางระบบปัสสาวะได้ง่าย
0-1	- มีความสามารถในการละลายและแพร่ผ่านเซลล์ได้ดี แต่ยังมีปัญหาในการแพร่ผ่านในระบบประสาทส่วนกลาง
1-3	- แพร่ผ่านเซลล์ในระบบประสาทส่วนกลางได้ดี - เป็นช่วงที่เหมาะสมที่สุดสำหรับการแพร่ผ่านเซลล์ในระบบประสาทส่วนกลางและระบบอื่นๆ (non-nervous system; non-CNS) - เหมาะสำหรับเป็นยารับประทาน - ถูกเมตาบอไลต์หรือแปรสภาพไปเป็นรูปอื่นได้น้อย
3-5	- ค่าการละลายมีแนวโน้มลดลง - มีแนวโน้มในการเกิดเมตาบอไลต์เพิ่มขึ้น
มากกว่า 5	- ถึงแม้ว่าประสิทธิภาพการแพร่ผ่านเซลล์จะสูง แต่ค่าการละลายต่ำมาก ไม่เหมาะสมเป็นยารับประทาน และถูกเมตาบอไลต์ได้สูง

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

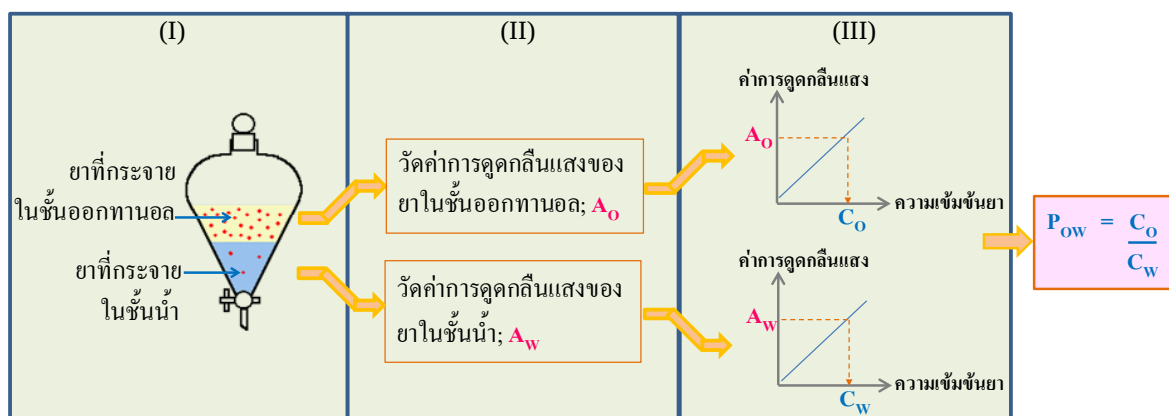
2. วิธีวิเคราะห์หาค่าสัมประสิทธิ์การกระจายตัว

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

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

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

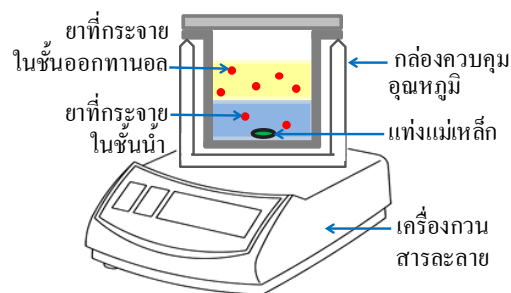
การหาค่า P_{ow} โดยอาศัยวิธีการเขย่ามีข้อดีคือ มีความน่าเชื่อถือ (reliability) และใช้อุปกรณ์ที่หาได้ง่าย มีใช้ในห้องปฏิบัติการทั่วไป แต่ข้อเสียของวิธีนี้คือ การเขย่าอาจก่อให้เกิดอิมัลชันในชั้นน้ำ (การเกิดหยดเล็กๆ ของออกทานอลกระจายอยู่ในชั้นน้ำ) ทำให้ชั้นน้ำเกิดความขุ่น ส่งผลให้การวิเคราะห์มีความคลาดเคลื่อน โดยเฉพาะอย่างยิ่ง เมื่อสารนั้นละลายในชั้นน้ำได้น้อย หรือมีค่า $\log P_{ow}$ สูงกว่า 6 [7] นอกจากนี้ วิธีการเข่ายังใช้เวลาในการวิเคราะห์ค่อนข้างนาน และใช้สารละลายปริมาณมาก ดังนั้นวิธีนี้จึงไม่เหมาะสมสำหรับขั้นตอนการคัดกรอง (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 เพื่อแก้ปัญหาค่าการเกิดอิมัลชันอันเนื่องจากการเขย่า วิธีนี้เป็นการวิเคราะห์โดยตรง ทำได้โดยการเตรียมตัวอย่างด้วยการละลายในชั้นออกทานอล จากนั้นเติมสารละลายตัวอย่างที่เตรียมได้ลงในภาชนะที่บรรจุชั้นน้ำไว้อย่างช้าๆ เพื่อลดโอกาสการเกิดอิมัลชันให้น้อยที่สุด ทำการกวนสารละลายด้วยเครื่องปั่นกววน (magnetic stirrer) อย่างช้าๆ จนกระทั่งระบบการสกัดเข้าสู่สมดุล จากผลการทดลองพบว่า การวิเคราะห์ตัวอย่างที่มีค่า P_{OW} สูงๆ จะมีความแม่นยำ (accuracy) และความเที่ยง (precision) ที่ดีขึ้น อย่างไรก็ตาม การกวนสารละลายอย่างช้าๆ ทำให้การเข้าสู่สมดุลของระบบการสกัดใช้เวลานาน โดยมีประมาณว่า ถ้าต้องการวิเคราะห์ที่มีค่า $\log P_{OW}$ ต่ำกว่า 5 อาจจะต้องใช้เวลาในการกวนสารละลายอย่างน้อย 2-3 วัน ระบบจึงเข้าสู่สมดุล นอกจากนี้ต้องมีการควบคุมอุณหภูมิของระบบให้คงที่ เพื่อลดการเกิดอิมัลชันอันเนื่องมาจากการเปลี่ยนแปลงของอุณหภูมิ ระบบวิเคราะห์หาค่า P_{OW} ด้วยวิธีการปั่นกววนแสดงดังในรูปที่ 3



รูปที่ 3. ระบบการปั่นกววนสำหรับวิเคราะห์หาค่า P_{OW}

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

เทคนิค HPLC สามารถนำมาประยุกต์หาค่าโพลีฟิสิกส์ของยาได้ โดยการนำเวลาที่สารคงอยู่ในคอลัมน์ (retention time; t_R) มาคำนวณค่าคาพาซิตีแฟกเตอร์ (capacity factor; k') ตามสมการดังนี้

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

เมื่อ t_0 คือเวลาของสารที่ไม่เกิดอันตรกิริยากับเฟสอยู่หนึ่งใช้ในการเคลื่อนที่ผ่านคอลัมน์ ซึ่งค่า k' เป็นค่าที่บ่งบอกสัดส่วนการกระจายตัวของสารในเฟสอยู่หนึ่ง (stationary phase) ต่อเฟสเคลื่อนที่ (mobile phase)

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

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]

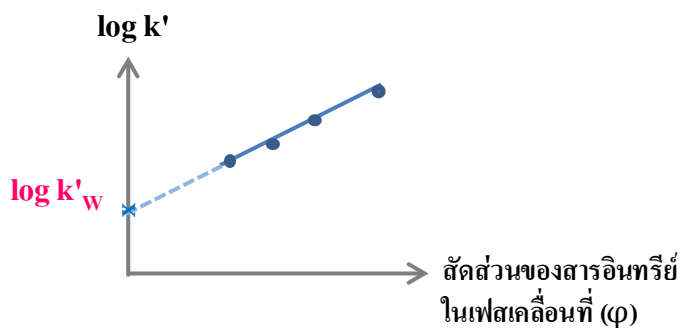
$$\log k' = S\phi + \log k'_w \quad \dots(7)$$

โดยที่ ϕ คือ สัดส่วนของสารอินทรีย์ที่เป็นองค์ประกอบในเฟสเคลื่อนที่

S คือ ความชันของกราฟ ซึ่งเป็นค่าคงที่ของระบบวิเคราะห์

k'_w คือ ค่าพารามิเตอร์ ในสถานะที่มีน้ำเป็นเฟสเคลื่อนที่เท่านั้น (ไม่มีสารอินทรีย์เป็น องค์ประกอบรวม)

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. ความสัมพันธ์เชิงเส้นระหว่างสัดส่วนของสารอินทรีย์ในเฟสเคลื่อนที่กับ $\log k'$ 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 และสถานะที่ใช้ในการทดลอง 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

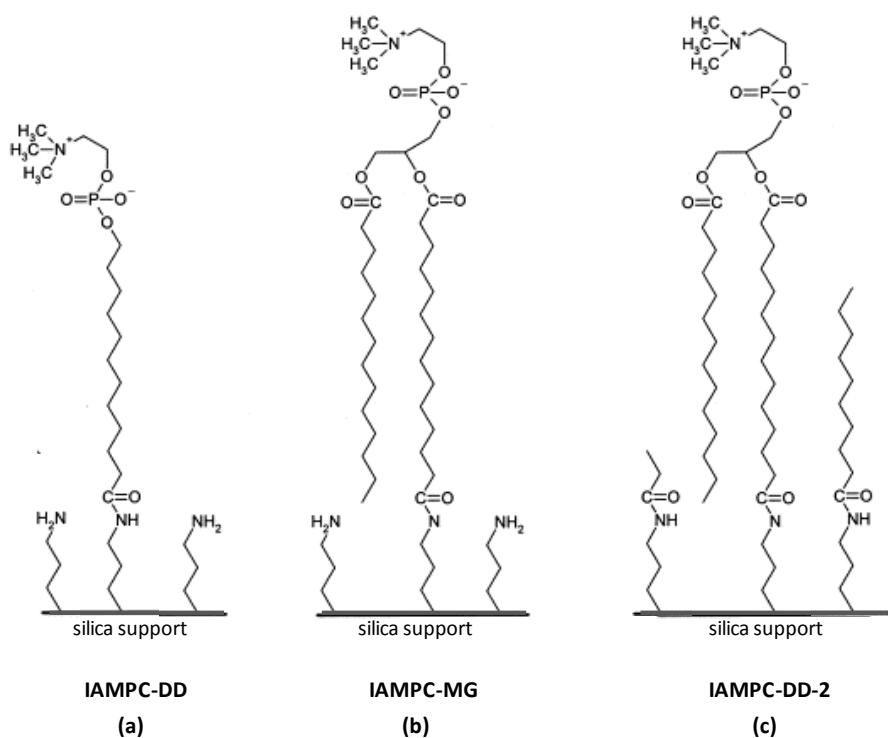
สิ่งเจือปน (impurity) ในสารตัวอย่างมีผลต่อการวิเคราะห์น้อย เนื่องจากเกิดการแยกในระหว่างที่สารตัวอย่างเคลื่อนที่ผ่านคอลัมน์ จึงถือว่าเป็นข้อดีหนึ่งสำหรับการวิเคราะห์ด้วยเทคนิค HPLC เพราะในขั้นตอนของการค้นหาหาใหม่ ยาที่ค้นพบหรือที่สังเคราะห์ได้ มักจะยังเป็นสารที่ไม่บริสุทธิ์

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

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

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

phosphatidylcholine) ซึ่งใช้ฟอสฟาติลโคลีนเป็นเฟสอยู่หนึ่ง 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 คอลัมน์ที่มีฟอสฟาติลโคลีนแบบสายคู่เป็นเฟสอยู่หนึ่งเป็นแบบจำลองที่ใกล้เคียงกับเยื่อหุ้มเซลล์ในธรรมชาติมากที่สุด และให้ผลการวิเคราะห์ค่า log k_w ได้ดีกว่าออกมาใกล้เคียงกับพฤติกรรมของยาในการแพร่ผ่านเซลล์ดีกว่าคอลัมน์แบบอื่นๆ



รูปที่ 5. โครงสร้างของฟอสฟาติลโคลีนที่เป็นเฟสอยู่หนึ่งในคอลัมน์ IAM ชนิดต่างๆ

(a) ฟอสฟาติลโคลีนสายเดี่ยว (b) ฟอสฟาติลโคลีนสายคู่ และ (c) ฟอสฟาติลโคลีนสายคู่ที่มีการปิดหมู่โพรพิลอะมิโนบนผิวซิลิกา [12]

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

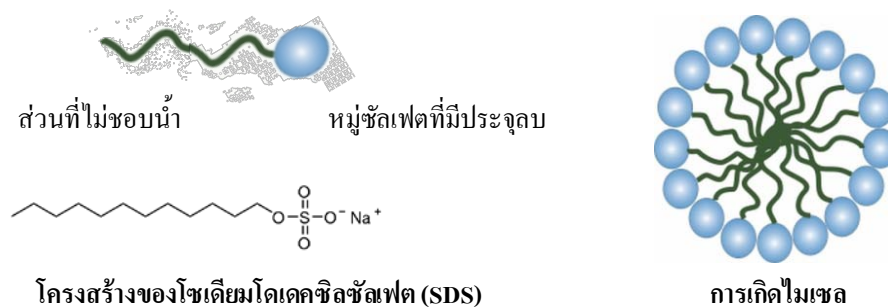
ด้วย อย่างไรก็ตาม ในกรณีที่ตัวอย่างสามารถกระจายตัวได้ดีในเฟสอยู่นิ่ง การใช้น้ำเป็นเฟสเคลื่อนที่เพียงอย่างเดียว อาจใช้เวลาในการชะสารออกมาจากคอลัมน์นาน ดังนั้นจึงจำเป็นต้องมีการเติมสารอินทรีย์ลงในเฟสเคลื่อนที่ เพื่อให้ได้ค่าพารามิเตอร์ที่เหมาะสมและไม่ใช้เวลาในการวิเคราะห์นานเกินไป ซึ่งในกรณีนี้จำเป็นต้องอาศัยสมการที่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

ข้อจำกัดหนึ่งของคอลัมน์ IAM คือ ทนพีเอชได้ในช่วง 2.5 ถึง 7.4 ดังนั้นในหลายๆ งานวิจัย ได้มีการเลือกใช้พีเอชของเฟสเคลื่อนที่เท่ากับ 7.0 เพื่อยืดอายุการใช้งานของคอลัมน์ และในกรณีที่ต้องใช้สารอินทรีย์ในเฟสเคลื่อนที่ ควรจะเลือกใช้โซเดียมไดโนไตรลแทนนั้น เนื่องจากเมทานอลสามารถทำให้ฟอสโฟลิปิดเกิดการสลายตัวได้ (methanolysis) [9]

2.5 เทคนิคไมเซลล์อิเล็กโตรโครมาโทกราฟี (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 ในขณะที่ผิวรอบนอกของไมเซลล์มีสภาพประจุเป็นลบอันเนื่องจากหมู่ซัลเฟต ดังนั้นโครงสร้างของไมเซลล์จึงเทียบเคียงได้กับฟอสโฟลิปิดเลเยอร์ของเยื่อหุ้มเซลล์ ด้วยเหตุนี้พฤติกรรมการกระจายตัวของยาระหว่างภายในไมเซลล์กับสารละลายบัฟเฟอร์ จึงสามารถนำมาประเมินค่า P_{ow} ได้เป็นอย่างดี



รูปที่ 6. โครงสร้างของโซเดียมโดเดซิลซัลเฟต และลักษณะของไมเซลล์

เมื่อทำการให้ศักย์ไฟฟ้าคร่อมปลายทั้งสองของแคปิลลารีคอลัมน์ จะเกิดแรงเคลื่อนที่เรียกว่าอิเล็กโตรออสโมติก (electroosmotic flow; EOF) ทำให้สารละลายภายในท่อแคปิลลารีเคลื่อนที่ไปทางขั้วแคโทดซึ่งเป็นขั้วลบ อย่างไรก็ตามไมเซลจะเคลื่อนที่ไปได้ช้ากว่าแรง EOF เนื่องจากมีแรงต้านการไหลที่เกิดจากแรงดึงดูดระหว่างประจุบนผิวของไมเซลกับขั้วแอโนดซึ่งเป็นขั้วบวก แผนภาพแสดงหลักการแยกด้วยเทคนิค MEKC แสดงดังรูปที่ 7 ดังนั้นค่าพารามิเตอร์ของสารตัวอย่าง สามารถคำนวณได้โดยอาศัยสมการที่ (8) [5]

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

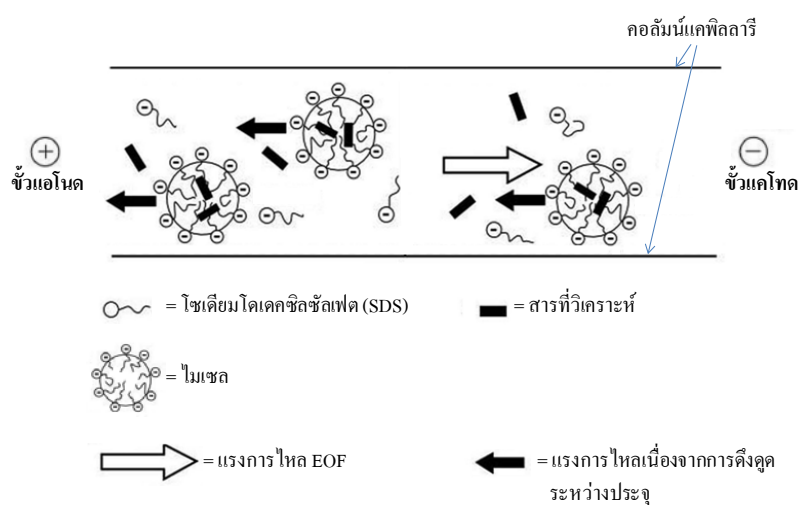
เมื่อ t_R คือ เวลาที่สารที่ต้องการวิเคราะห์คงอยู่ในคอลัมน์

t_{EOF} คือ เวลาของสารที่มีสภาพเป็นกลาง และไม่มีการกระจายตัวในไมเซลคงอยู่ในคอลัมน์ โดยทั่วไปนิยมใช้เมทานอลในการระบุค่า t_{EOF}

t_M คือ เวลาคงอยู่ในคอลัมน์ของไมเซล โดยทั่วไปนิยมใช้สารที่กระจายตัวได้ดีในไมเซล เช่น ไดเดคานาโนฟีนอน (n-dodecanophenone) ในการระบุค่า t_M

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

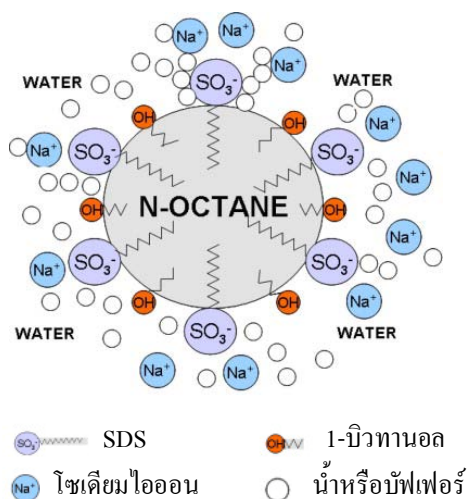
เทคนิค MEKC สามารถใช้วิเคราะห์ค่า $\log P_{OW}$ ได้ดีในช่วง $-2.3 < \log P_{OW} < 6.2$ และมีค่าความคลาดเคลื่อนของการวิเคราะห์อยู่ในช่วง $\pm \log 0.5$ [15]



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 ลงไปเพื่อช่วยลดแรงตึงผิวระหว่างหยดน้ำมันซึ่งทำหน้าที่เหมือนเฟสอยู่นิ่ง กับเฟสเคลื่อนที่ซึ่งเป็นสารละลายบัฟเฟอร์ ทำให้หยดน้ำมันมีความเสถียรเพิ่มขึ้นด้วย นอกจากนี้สารลดแรงตึงผิวยังทำให้สภาพผิวของหยดน้ำมันเป็นลบ ดังนั้นกลไกการแยกและการเคลื่อนที่ภายใต้สนามไฟฟ้าจึงคล้ายกับเทคนิค MEKC ลักษณะไมโครอิมัลชันแสดงดังรูปที่ 8



รูปที่ 8. ลักษณะไมโครอิมัลชัน โดยมีออกเทนเป็นหยดน้ำมัน และใช้โซเดียมโดเดคซิลซัลเฟต (SDS) และบิวทานอล เป็นสารลดแรงตึงผิวและสารร่วมลดแรงตึงผิวตามลำดับ [16]

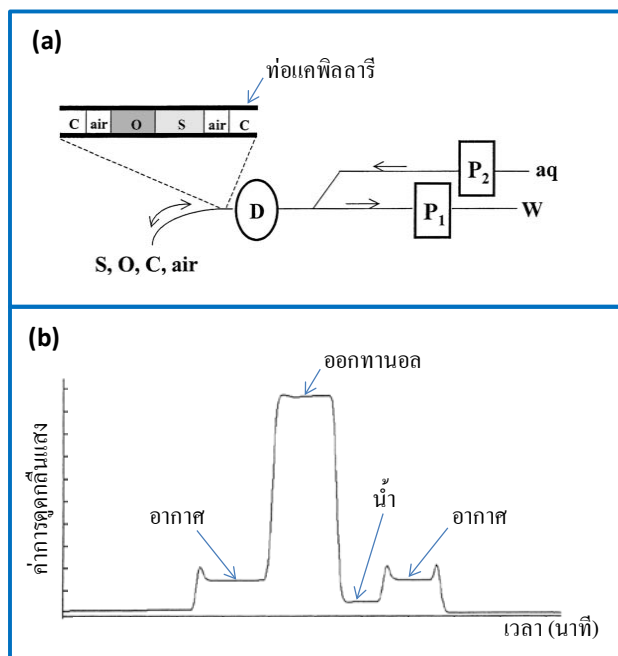
เทคนิค MEEKC สามารถใช้วิเคราะห์ค่า $\log P_{ow}$ ได้ดีในช่วง $-0.5 < \log P_{ow} < 4.5$ และมีค่าความคลาดเคลื่อนของการวิเคราะห์อยู่ในช่วง $\pm \log 0.2$ [15] เมื่อเปรียบเทียบการหาค่า P_{ow} ด้วยเทคนิค MEKC และ MEEKC พบว่า เทคนิค MEEKC จะให้ผลการวิเคราะห์ที่ใกล้เคียงกับผลที่ได้จากวิธีการเขย่ามากกว่า [13] 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

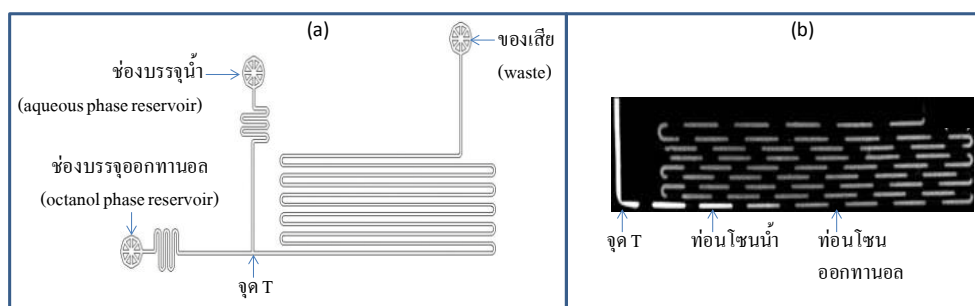
Carlsson และ Karlberg [17] ได้พัฒนาระบบการสกัดภายในท่อแก้วแคปิลลารีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 250 ไมโครเมตร ควบคู่กับการตรวจวัดบนคอลัมน์ด้วยยูวีสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ (on-column UV spectrophotometer) ทำให้สามารถวัดค่าการดูดกลืนแสงของยาที่กระจายอยู่ในชั้นออกทานอลและน้ำได้ในคราวเดียวกัน รูปที่ 9(a) แสดงระบบการสกัดซึ่งประกอบด้วยปั๊ม 2 ตัว ทำหน้าที่ควบคุมทิศทางและอัตราการไหลของสารละลาย การทำงานของระบบเริ่มจาก ปั๊มตัวที่ 1 ทำหน้าที่ดูดท่อนอากาศ, สารตัวอย่างยาที่ละลายในน้ำ, ออกทานอล ตามด้วยท่อนอากาศอีกครั้ง ผ่านปลายเปิดของท่อแคปิลลารีเข้ามาภายในระบบโดยมีน้ำเป็นสารละลายตัวพา (carrier) ท่อนอากาศจะทำหน้าที่ป้องกันไม่ให้ตัวทำละลายทั้งสองเฟสสัมผัสกับสารละลายตัวพา ดังนั้นการสกัดจะเกิดระหว่างท่อนโซนสารตัวอย่างในชั้นน้ำกับท่อนโซนออกทานอลเท่านั้น ปั๊มตัวที่ 1 จะดูดท่อนโซนทั้งหมดให้เคลื่อนที่ผ่านเครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ (จากรูป 9(a) ทิศทางการไหลจากซ้ายไปขวา) หลังจากนั้นปั๊มตัวที่ 1 จะหยุดทำงาน ขณะเดียวกันปั๊มตัวที่ 2 จะทำหน้าที่ผลักท่อนโซนทั้งหมดในทิศตรงข้าม เพื่อให้ท่อนโซนเคลื่อนที่ผ่านเครื่องตรวจวัดอีกครั้ง (จากรูป 9(a) ทิศทางการไหลจากขวาไปซ้าย) การบันทึกสัญญาณจะเกิดขึ้นในขณะที่ปั๊มตัวที่ 2 ทำงาน ปั๊มทั้งสองจะทำงานสลับกันไปเรื่อยๆ เปรียบได้กับการเขย่าสารละลาย จนกระทั่งค่าการดูดกลืนแสงของทั้งสองเฟสคงที่ ซึ่งหมายถึงระบบการสกัดเข้าสู่สมดุลแล้ว ตัวอย่างรูปร่างสัญญาณที่บันทึกได้แสดงดังรูปที่ 9(b) สำหรับการวิเคราะห์ตัวอย่างยาครั้งต่อไป ทำได้โดยการดูดน้ำผ่านปั๊มตัวที่ 2 ย้อนกลับไปยังปลายเปิดของท่อแคปิลลารีเพื่อทำการล้างระบบก่อนทุกครั้ง



รูปที่ 9. (a) ระบบการไหลที่ใช้ในการวิเคราะห์หาค่า P_{OW} เมื่อ P_1 และ P_2 = บั๊มตัวที่ 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} ของยาในขั้นตอนของการค้นหายาใหม่

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 การทำงานของระบบเริ่มจากการปั๊มออกทานอลและน้ำเข้ามาผสมกันที่จุด T (รูป 10(a)) เกิดเป็นท่อนโซนสองเฟสสลับกันไป ในงานวิจัยนี้ได้ใช้สารฟลูออเรสซิน (fluorescein) ที่ละลายในน้ำเป็นแบบจำลองแทนตัวอย่างยา และตรวจวัดแสงฟลูออเรสเซนซ์โดยการถ่ายภาพด้วยกล้องซีซีดี (CCD camera) จากรูป 10(b) ท่อนโซนสว่างคือชั้นน้ำที่มีฟลูออเรสซินละลายอยู่ ส่วนท่อนโซนมืดคือชั้นออกทานอล การสกัดจะเริ่มเกิดขึ้นที่จุด T ดังนั้นจะเห็นว่าท่อนโซนนํ้ามีความสว่างลดลงเนื่องจากฟลูออเรสซินเริ่มกระจายตัวเข้าไปในชั้นของออกทานอล เมื่อถึงสมดุลของการสกัด แถบสว่างของชั้นน้ำก็จะมีค่าคงที่



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

สำหรับงานวิจัยนี้อนุมานว่า ค่าความเข้มแสงฟลูออเรสเซนซ์ (fluorescent intensity) แปรตามความเข้มข้น ดังนั้นการหาค่า P_{OW} ทำได้โดยการหาอัตราส่วนความเข้มแสงฟลูออเรสเซนซ์ในชั้นออกทานอลต่อชั้นน้ำ แม้ว่าระบบปฏิบัติการบนไมโครชิปจะให้ผลการวิเคราะห์ที่รวดเร็ว แต่ระบบนี้ยังมีข้อจำกัดอยู่หลายอย่างเช่น การวิเคราะห์และการเก็บรักษาไมโครชิปควรทำในห้องที่ปราศจากฝุ่นละออง (clean room) เนื่องจากช่องการไหลมีขนาดเล็กจึงอาจเกิดการอุดตันได้ง่าย และเมื่อใช้การตรวจวัดโดยเทคนิคยูวี-วิสิเบิล สเปกโตรโฟโตเมทรี อาจมีข้อจำกัดในแง่ของความไวในการตรวจวัด (sensitivity) ต่ำเนื่องจากระยะทางที่แสงผ่านสารละลายมีค่าน้อย

3. เปรียบเทียบจุดเด่นและจุดด้อยของแต่ละวิธี

โดยทั่วไปแล้ว ค่าสัมประสิทธิ์การกระจายตัวที่ได้จากวิธีการเขย่าและการปั่นกวนสารละลาย ยังถือเป็นค่าที่ดีและน่าเชื่อถือในการอธิบายสมบัติการแพร่ผ่านเยื่อหุ้มเซลล์ของยา แต่วิธีการเหล่านี้ใช้เวลาในการวิเคราะห์นาน และไม่มีความเป็นอัตโนมัติ ต้องอาศัยแรงงานในการทำทดลอง และใช้ตัวทำละลายในปริมาณมาก อย่างไรก็ตาม ปัญหานี้สามารถแก้ไขได้โดยการอาศัยระบบการไหลมาช่วยในการวิเคราะห์ ทำให้ระบบมีความเป็นอัตโนมัติและการวิเคราะห์ทำให้ผลใกล้เคียงกันมากขึ้น ในขณะที่เทคนิคโครมาโทกราฟีและอิเล็กโตรโฟเรซิส ถือเป็นทางเลือกที่น่าสนใจ โดยมีจุดเด่นที่ว่า สิ่งปนเปื้อนในยาไม่มีผลต่อการวิเคราะห์ เนื่องจากถูกกำจัดหรือแยกออกในกระบวนการแยกที่เกิดขึ้นในคอลัมน์ 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 - สิ่งปนเปื้อนอาจส่งผลกระทบต่อผลการวิเคราะห์ - ใช้สารตัวอย่างค่อนข้างมาก
2. โครมาโทกราฟี และอิเล็กโตรโฟเรซิส	- สิ่งปนเปื้อนไม่รบกวนต่อการวิเคราะห์ - อาศัยเครื่องมือในการวิเคราะห์ จึงมีความเป็นอัตโนมัติมากขึ้น และใช้แรงงานน้อยลง - ใช้เวลาในการวิเคราะห์ปานกลาง	- จำเป็นต้องเทียบมาตรฐาน (calibration) โดยอาศัยกลุ่มยาที่มีโครงสร้างทางเคมีคล้ายคลึงกับสารตัวอย่าง - การเปลี่ยนคอลัมน์และสภาวะการทดลองอาจส่งผลกระทบต่อผลการวิเคราะห์
3. ระบบการไหล	- ใช้เวลาในการวิเคราะห์น้อย - สามารถทำให้ระบบมีความเป็นอัตโนมัติได้ - ใช้สารตัวอย่างปริมาณน้อย	- สิ่งปนเปื้อนอาจส่งผลกระทบต่อผลการวิเคราะห์

4. สรุปผลการวิจัย

การหาค่า P_{OW} เพื่อใช้อธิบายสมบัติไลโปฟิลิซิตีของยาสามารถทำได้หลายวิธี เช่น วิธีการเขย่า วิธีการกวนสารละลาย เทคนิคโครมาโทกราฟี เทคนิคอิเล็กโทรโฟเรซิส และเทคนิคการไหล เป็นต้น ซึ่งค่า P_{OW} นี้เป็นเพียงตัวเลขแสดงแนวโน้มสมบัติไลโปฟิลิซิตีเท่านั้น การดูดซึมยาในร่างกายอาจเหมือนหรือแตกต่างอย่างสิ้นเชิงจากค่า 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.