



วารสาร ไทยเภสัชนิพนธ์

ปีที่ 2 ฉบับเดือนมิถุนายน 2548 (หน้า 117-130)

บทความพิเศษวิชาการ สำหรับการศึกษาต่อเนื่องทางเภสัชศาสตร์



การอธิบายโครงสร้างทางเคมีของเมแทบอไลต์

ในกระบวนการพัฒนาและค้นพบยา

(Structure elucidation of metabolites in development and drug discovery)

เภสัชกรหญิงผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ชุติมา ลิ้มมัทวาทิรัตน์
ภาควิชาเภสัชเคมี คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยศิลปากร
วิทยาเขตพระราชวังสนามจันทร์ อ.เมือง จ.นครปฐม 73000

รหัส 1-000-SPU-000-0506-01

จำนวน 2.5 หน่วยกิตการศึกษาต่อเนื่อง

วันที่รับรอง : 1 มิถุนายน พ.ศ. 2548

วันที่หมดอายุ : 1 มิถุนายน พ.ศ. 2550

วัตถุประสงค์เชิงพฤติกรรม

1. เพื่อให้ผู้อ่านได้ทราบถึงประโยชน์ของการอธิบายโครงสร้างทางเคมีของเมแทบอไลต์ในกระบวนการพัฒนาและค้นพบยา
2. เพื่อให้ผู้อ่านได้ทราบถึงข้อดีและข้อเสียของเทคนิคที่ใช้แยกและการอธิบายโครงสร้างทางเคมีของเมแทบอไลต์ รวมทั้งสามารถเลือกใช้เทคนิคต่าง ๆ ได้อย่างเหมาะสม
3. เน้นให้ผู้อ่านเล็งเห็นถึงความสำคัญของเทคนิคที่ใช้อธิบายโครงสร้างทางเคมีเพื่อประโยชน์ในการนำไปพัฒนายาต่อไป

บทคัดย่อ

การทำนายโครงสร้างทางเคมีของเมแทบอไลต์ (metabolite) ด้วยโปรแกรมคอมพิวเตอร์ (software) และการอธิบายโครงสร้าง (structure elucidation) ทางเคมีของเมแทบอไลต์ด้วยเทคนิคทางสเปกโตรสโกปี (spectroscopy) ที่ทันสมัยจะช่วยให้กระบวนการพัฒนาและค้นพบยา (drug discovery) เป็นไปอย่างรวดเร็ว เพราะสามารถทราบโครงสร้างทางเคมีของเมแทบอไลต์ที่มีพิษหรือมีฤทธิ์ทางชีวภาพได้อย่างถูกต้อง จึงทำให้สารพิษหรือสารที่ไม่มีฤทธิ์ทางชีวภาพถูกกำจัดออกไปก่อนที่จะก่อให้เกิดผลเสียในกระบวนการพัฒนาและค้นพบยา ในบทความนี้กล่าวถึงโปรแกรมคอมพิวเตอร์ที่ใช้ทำนายโครงสร้างทางเคมีของเมแทบอไลต์ รวมทั้งการแยกและการอธิบายโครงสร้างทางเคมีของเมแทบอไลต์ด้วยเทคนิคที่ทันสมัย เพื่อนำความรู้เกี่ยวกับโครงสร้างทางเคมีที่ได้ไปศึกษากลไกของกระบวนการเมแทบอลิซึม (metabolism) และความเป็นพิษของยา ซึ่งจะเป็นแนวทางในการค้นพบและพัฒนายาต่อไปการศึกษาโครงสร้างทางเคมีของ

เมแทบอลิท์ ประกอบด้วย การแยกเมแทบอลิท์โดยวิธีโครมาโทกราฟี (chromatography) และการอธิบายโครงสร้างทางเคมีโดยใช้เครื่องมือทางสเปกโตรสโกปี ซึ่งในปัจจุบันนิยมใช้การแยกสารและอธิบายโครงสร้างทางเคมีของสารด้วยเทคนิคลิควิดโครมาโทกราฟี-แมสสเปกโตรเมตรี (liquid chromatography-mass spectrometry, LC-MS) และลิควิดโครมาโทกราฟี-นิวเคลียร์แมกเนติกเรโซแนนซ์สเปกโตรสโกปี (liquid chromatography-nuclear magnetic resonance spectroscopy, LC-NMR) เนื่องจากมีความไว ความจำเพาะเจาะจง ความถูกต้อง และแม่นยำสูง

คำสำคัญ

เมแทบอลิท์ การค้นพบยา การอธิบายโครงสร้าง

บทนำ

การอธิบายโครงสร้าง (structure elucidation) ทางเคมีของเมแทบอลิท์ (metabolite) มีความสำคัญต่อกระบวนการพัฒนาและค้นพบยา (drug discovery) เพราะการทราบถึงโครงสร้างทางเคมีของเมแทบอลิท์ที่เกิดขึ้นจะทำให้ทราบถึงกระบวนการเมแทบอลิซึม (metabolism) ของยาในสิ่งมีชีวิต เมแทบอลิซึมมีความแตกต่างกันในสิ่งมีชีวิตแต่ละสายพันธุ์ โดยทั่วไปกระบวนการเมแทบอลิซึมแบ่งออกเป็น 2 ระยะ คือ Phase I และ Phase II ที่อาจทำให้เกิดเมแทบอลิท์ที่มีฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาหรือมีความเป็นพิษ ตัวอย่างการศึกษากระบวนการเมแทบอลิซึมของยา ได้แก่ BW1370U87 เป็นสารสังเคราะห์ที่มีฤทธิ์เป็น monoamine oxidase inhibitor¹ เมื่อถูกเมแทบอลิท์ด้วย microsome ของหนูจะเกิดเมแทบอลิท์หลายชนิด ซึ่งจากการศึกษาโครงสร้างทางเคมีของเมแทบอลิท์ที่เกิดขึ้นหลายชนิดนี้ทำให้ทราบว่า ในกระบวนการเมแทบอลิซึมนั้นสารมีการเปลี่ยนแปลงอย่างไร เมแทบอลิท์ที่เกิดขึ้นมีฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาเหมือนหรือต่างจากสารตั้งต้น และมีพิษหรือไม่ เป็นต้น จากความรู้เหล่านี้ทำให้สามารถออกแบบยา (drug design) ให้มีฤทธิ์ทางชีวภาพได้ตามต้องการ สามารถปรับปรุงโครงสร้างยา เช่น การเปลี่ยนหรือตัดหมู่ฟังก์ชันที่ทำให้เกิดพิษออกไป นอกจากนี้ยังสามารถกำจัดเมแทบอลิท์ที่เป็นพิษออกไปจากกระบวนการพัฒนาและค้นพบยาได้อีกด้วย จึงทำให้ยามีความปลอดภัยสูงขึ้น

ในปัจจุบันการออกแบบยามุ่งเน้นไปที่การปรับปรุงโครงสร้างทางเคมีของยาให้มีฤทธิ์ทางชีวภาพและเภสัชจลนศาสตร์ที่เหมาะสม รวมทั้งมีเมแทบอลิท์ที่มีพิษต่ำลง เพื่อลดโอกาสในการที่ยาจะถูกถอนออกจากตลาดยาเนื่องจากความเป็นพิษที่เกิดขึ้นกับผู้บริโภค การทดสอบความเป็นพิษหรือฤทธิ์ทางชีวภาพในหลอดทดลองอาจให้ผลที่แตกต่างไปจากการทดสอบในสัตว์ทดลอง เนื่องจากกลไกการออกฤทธิ์และการเกิดพิษของเมแทบอลิท์ในสัตว์ทดลองมีความซับซ้อนมากกว่ากลไกอย่างง่ายในหลอดทดลอง โดยทั่วไปการศึกษาเมแทบอลิท์ของยา มักทำโดยการบ่ม (incubation) ยากับเอ็นไซม์จากตับ เช่น cytochrome P450s, flavin monooxygenases และ glucuronosyltransferases ซึ่งเป็นเอ็นไซม์ที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการเมแทบอลิซึมของยา อย่างไรก็ตามผลการทดสอบก็ไม่ถูกต้องเหมือนกับการทดสอบในสัตว์ทดลองที่มีเมแทบอลิซึมคล้ายคลึงกับมนุษย์² สามารถนำเมแทบอลิท์ที่เกิดขึ้นมาทำการแยกให้บริสุทธิ์และอธิบายโครงสร้างทางเคมีของเมแทบอลิท์ด้วยเทคนิคทางโครมาโทกราฟี (chromatography) และสเปกโตรสโกปี (spectroscopy) ตามลำดับ ซึ่งเทคนิคที่นิยมใช้กันมากในปัจจุบัน ได้แก่ ลิควิดโครมาโทกราฟี-แมสสเปกโตรเมตรี (liquid chromatography-mass spectrometry, LC-MS) และลิควิดโครมาโทกราฟี-นิวเคลียร์แมกเนติกเรโซแนนซ์สเปกโตรสโกปี (liquid chromatography-nuclear magnetic resonance spectroscopy, LC-NMR) เพราะมีความไว (sensitivity) ความจำเพาะเจาะจง (selectivity) ความถูกต้อง (accuracy) และแม่นยำ (precision) สูง³ ซึ่งข้อมูลที่ได้จากเทคนิคทั้งสองนี้จะช่วยให้การพัฒนาและค้นพบยาเป็นไปได้อย่างขึ้น เพราะ (1) สามารถทำนายโครงสร้างทางเคมีของเมแทบอลิท์ที่เกิดขึ้นได้อย่างถูกต้อง (2) ทราบถึงความแตกต่างของโครงสร้างทางเคมีระหว่างเมแทบอลิท์แต่ละ

ชนิดที่เกิดขึ้นได้ใกล้เคียงกับความเป็นจริงมากที่สุด (3) ทราบถึงความแตกต่างของโครงสร้างทางเคมีระหว่างเมแทบอลิท์ที่เกิดขึ้นในสิ่งมีชีวิตต่างสายพันธุ์ได้ และ (4) ทราบปริมาณของเมแทบอลิท์ที่เกิดขึ้นในหลอดทดลองและสัตว์ทดลอง

อย่างไรก็ตามก่อนที่จะพิจารณาเลือกใช้ LC-MS หรือ LC-NMR ในการวิเคราะห์และทำนายโครงสร้างทางเคมีของเมแทบอลิท์ ควรทราบถึงข้อดีและข้อเสียของแมสสเปกโตรเมตรี (mass spectrometry, MS) และนิวเคลียร์แมกเนติกเรโซแนนซ์สเปกโตรสโกปี (nuclear magnetic resonance spectrometer, NMR) ดังนี้ MS มีความไวสูงกว่า (ใช้ปริมาณสารในการอธิบายโครงสร้างทางเคมีน้อยกว่า) NMR และสามารถวิเคราะห์สารที่มีความเป็นขั้วสูงได้ดีกว่า NMR⁴ อย่างไรก็ตามข้อมูลจากสเปกตรัม (spectrum) ของ MS ไม่สามารถบอกถึงเคมีที่เกี่ยวข้องกับระยะอะตอมในโมเลกุล (stereochemistry) ของสารได้ จึงจำเป็นต้องอาศัยข้อมูลเหล่านี้จาก NMR ทั้งนี้ต้องเตรียมสารให้เป็นอนุพันธ์และอธิบายโครงสร้างทางเคมีของอนุพันธ์เปรียบเทียบกับสารเดิมด้วยข้อมูลจากสเปกตรัมของ NMR ตามวิธีของ Mosher⁵ ตัวอย่างเช่น การศึกษาเคมีที่เกี่ยวข้องกับระยะอะตอมในโมเลกุลของสารสังเคราะห์ (+)-arisugacin A และ B ที่มีฤทธิ์ยับยั้งเอ็นไซม์ acetylcholinesterase อย่างจำเพาะเจาะจง เริ่มจากการเตรียมสารทั้งสองให้เป็นอนุพันธ์ตามวิธีของ Mosher จากนั้นจึงนำข้อมูลจากสเปกตรัมของ NMR มาเปรียบเทียบกับระหว่าง (+)-arisugacin A และ B กับอนุพันธ์ของสารทั้งสอง ซึ่งจะทำให้ทราบถึงเคมีที่เกี่ยวข้องกับระยะอะตอมในโมเลกุลของ (+)-arisugacin A และ B ดังนั้นด้วยความจำเป็นที่ต้องทราบข้อมูลเกี่ยวกับโครงสร้างทางเคมีอย่างครบถ้วน ในปัจจุบันจึงได้มีการพัฒนาเทคนิคการแยกสารและการอธิบายโครงสร้างทางเคมีมาเป็นลิกวิดโครมาโทกราฟี-นิวเคลียร์แมกเนติกเรโซแนนซ์สเปกโตรสโกปี-แมสสเปกโตรเมตรี (liquid chromatography-nuclear magnetic resonance spectroscopy-mass spectrometry, LC-NMR-MS) ที่ให้ข้อมูลของโครงสร้างทางเคมีได้อย่างถูกต้องและครบถ้วน

เพื่อให้การพัฒนาและค้นพบยาใหม่ประสบความสำเร็จเป็นอย่างดี ควรต้องมีการตั้งสมมติฐานโครงสร้างทางเคมีของเมแทบอลิท์ที่น่าจะเกิดขึ้น โดยการนำโปรแกรมคอมพิวเตอร์ (software) ที่เกี่ยวข้องมาช่วยในการทำนาย ทั้งนี้ยังคงต้องใช้ LC-MS และ LC-NMR ช่วยแยกเมแทบอลิท์ให้บริสุทธิ์และยืนยันความถูกต้องของโครงสร้างทางเคมีของเมแทบอลิท์ที่เกิดขึ้นจริง ดังนั้นจึงจำเป็นต้องใช้เทคนิค LC-MS และ LC-NMR ร่วมไปในแต่ละขั้นตอนของการพัฒนาและค้นพบยา⁶ ตามลำดับดังนี้ (1) การทดลองสังเคราะห์สารเพียงบางส่วนก่อนลงมือสังเคราะห์จริง จะใช้ LC-MS และ/หรือ LC-NMR ช่วยในการตัดสินใจกำจัดสารพิษหรือสารที่ไม่น่าสนใจออกไปก่อนที่จะลงมือสังเคราะห์จริง (2) การคัดเลือกสารที่น่าสนใจในระหว่างกระบวนการค้นพบยา จะใช้ LC-MS และ/หรือ LC-NMR อธิบายโครงสร้างทางเคมีของเมแทบอลิท์หลักซึ่งเป็นโครงสร้างทางเคมีอย่างง่ายและไม่ซับซ้อน ทำให้ทราบถึงกระบวนการเมแทบอลิซึมที่เกิดขึ้นได้อย่างถูกต้องและทราบถึงวิธีการขัดขวางหรือชักนำกระบวนการเมแทบอลิซึมที่จะเกิดขึ้นได้ และ (3) ในการพัฒนาทางคลินิก LC-MS และ/หรือ LC-NMR จะช่วยบอกถึงเมแทบอลิท์ที่เป็นพิษและปริมาณของเมแทบอลิท์แต่ละชนิดที่เกิดขึ้น ซึ่งในที่นี้ขอกล่าวถึงการแยกและการอธิบายโครงสร้างทางเคมีของเมแทบอลิท์ด้วยเทคนิคทางโครมาโทกราฟีและสเปกโตรสโกปี

โปรแกรมคอมพิวเตอร์ที่ใช้ทำนายโครงสร้างทางเคมี และการใช้โปรแกรมคอมพิวเตอร์ควบคู่กับเทคนิคอื่นที่ทันสมัยในกระบวนการพัฒนาและค้นพบยา

ในกระบวนการพัฒนายาต้องมีความสมดุลระหว่าง (1) การพัฒนาทางด้านการดูดซึม การกระจายตัว เมแทบอลิซึม และการขับออก (absorption, distribution, metabolism, excretion หรือ ADME) (2) การปรับปรุงโครงสร้างทางเคมีให้มีความจำเพาะเจาะจงต่อรีเซปเตอร์ และ (3) การพัฒนาทางด้านความปลอดภัยของยา ซึ่งในการปรับปรุงโครงสร้างทางเคมีของยาให้มีความจำเพาะเจาะจงกับเป้าหมายในการออกฤทธิ์จะต้องคำนึงถึงความเป็นพิษที่อาจจะเกิด

ขึ้นด้วย ทั้งนี้ความเป็นพิษที่เกิดขึ้นอาจพบในระหว่างที่ยานี้กำลังจัดจำหน่ายอยู่ในท้องตลาด ตัวอย่างเช่น Vioxx® (rofecoxib) ซึ่งเป็นยาของบริษัท Merck Sharp & Dohme ที่ได้พัฒนาให้มีฤทธิ์บรรเทาปวด โดยการยับยั้งเฉพาะที่เอ็นไซม์ cyclooxygenase-2 (COX-2) ได้ถูกถอนออกจากตลาดยา เนื่องจากทำให้เกิดหัวใจวายและหมดสติเนื่องจากหลอดเลือดในสมองอุดตัน ภายหลังจากการรับประทานยาติดต่อกันนานเกินกว่า 18 เดือน⁷ จึงเห็นได้ว่าในกระบวนการพัฒนายานี้จะต้องปรับปรุงโครงสร้างทางเคมีของยาเพื่อให้มีฤทธิ์ทางชีวภาพดีขึ้น (ในตัวอย่างนี้มีความจำเพาะเจาะจงกับ COX-2 มากขึ้น จึงมีอาการข้างเคียงลดลง) ควบคู่ไปกับการศึกษาความเป็นพิษของยาในระยะยาว ดังนั้นหากต้องการศึกษาความเป็นพิษและ ADME ของยา สามารถทำได้โดยอาศัยโปรแกรมคอมพิวเตอร์ที่พัฒนามาจากฐานข้อมูลของโครงสร้างทางเคมีของยาและเมแทบอลิท์หลายชนิด ซึ่งการทราบถึงข้อมูลเหล่านี้ก่อนล่วงหน้าจะมีผลดีต่อการออกแบบโครงสร้างทางเคมีของยา

ในปัจจุบันได้มีการนำโปรแกรมคอมพิวเตอร์ เช่น TOPKAT, CASE/MULTI-CASE, DEREK และ Hazard Expert มาใช้ทำนายสารที่ทำให้เกิดมะเร็งและเกิดการเปลี่ยนแปลงของยีน สำหรับโปรแกรมคอมพิวเตอร์ เช่น Pallas, MetaboLynx™ และ ACD/MS ใช้ทำนายความเป็นพิษของเมแทบอลิท์และ ADME ของยา³ ซึ่งความเป็นพิษและ ADME จะขึ้นอยู่กับโครงสร้างทางเคมีที่กำหนดความชอบไขมันและความสามารถในการละลายของยาแต่ละชนิด โปรแกรมคอมพิวเตอร์เหล่านี้เกิดขึ้นจากการเก็บรวบรวมข้อมูลเกี่ยวกับโครงสร้างทางเคมีของยาและสารต่าง ๆ รวมทั้งเมแทบอลิท์ของมัน ฤทธิ์ทางเภสัชวิทยา ความเป็นพิษ ความชอบไขมัน และความสามารถในการละลาย เป็นต้น เพื่อจัดทำเป็นฐานข้อมูล จากนั้นจึงประมวลผลหาความสัมพันธ์ระหว่างโครงสร้างทางเคมีของยากับเมแทบอลิท์ของมัน ความสัมพันธ์ระหว่างปฏิกิริยาที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการเมแทบอลิซึมของยาและโครงสร้างทางเคมีของเมแทบอลิท์ที่เกิดขึ้น เป็นต้น จากนั้นจึงเขียนเป็นโปรแกรมคอมพิวเตอร์ขึ้นมาใช้ทำนายสิ่งที่ต้องการ เช่น ทำนายโครงสร้างทางเคมีของเมแทบอลิท์ที่คาดว่าจะเกิดขึ้น แต่อย่างไรก็ตามการทำนายอาจไม่ถูกต้องเสมอไป จึงควรทำการทดลองในหลอดทดลองหรือในสิ่งมีชีวิตควบคู่ไปด้วย โดยมีการนำ LC-MS และ/หรือ LC-NMR เข้ามาทำการแยกเมแทบอลิท์ให้บริสุทธิ์และศึกษาโครงสร้างทางเคมีของเมแทบอลิท์ที่แยกได้ อย่างไรก็ตามโปรแกรมคอมพิวเตอร์ก็ยังคงมีประโยชน์สูงในเชิงการพัฒนาและค้นพบยา เพราะทำให้เกิดความสะดวกและรวดเร็วในการทำนายผลที่ใกล้เคียงกับความจริง ทั้งนี้ความคลาดเคลื่อนของการทำนายผลนั้นอาจเกิดจากฐานข้อมูลมีตัวอย่างของข้อมูลไม่เพียงพอ หรือกลไกในกระบวนการเมแทบอลิซึมมีความซับซ้อนมาก

ในปัจจุบันกระบวนการพัฒนาและค้นพบยาได้นำเทคนิค high-throughput screening (การทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพของสารจำนวนมากในเวลาที่รวดเร็ว และใช้ปริมาณสารตัวอย่างในการทดสอบน้อยมาก) และ combinatorial synthesis (การสังเคราะห์สารหลายชนิดจากการสลับตำแหน่งของหน่วยย่อยภายในโครงสร้างของโมเลกุล) มาใช้ร่วมกับโปรแกรมคอมพิวเตอร์ที่สามารถศึกษาความเป็นพิษ ฤทธิ์ทางชีวภาพ เภสัชจลนศาสตร์ และปฏิกิริยาระหว่างยาได้ จึงช่วยให้ค้นพบยาที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพที่น่าสนใจและปราศจากพิษหรือมีพิษต่ำได้อย่างรวดเร็ว⁸ อย่างไรก็ตามการทำนายฤทธิ์ทางชีวภาพด้วยโปรแกรมคอมพิวเตอร์อาจคลาดเคลื่อนไปจากความเป็นจริงได้ เช่น การควบคุมความดันโลหิตให้ลดต่ำลงสู่ระดับปกติ ประกอบด้วยกลไกที่ซับซ้อน มีเป้าหมายในการออกฤทธิ์หลายตำแหน่ง (multi-site action) ดังนั้นผลการทำนายฤทธิ์ทางชีวภาพหรือความเป็นพิษด้วยโปรแกรมคอมพิวเตอร์จึงอาจคลาดเคลื่อนไปจากความเป็นจริงที่เกิดขึ้นในสิ่งมีชีวิต

High-performance computing (HPC) เป็นเทคโนโลยีทันสมัยที่บริษัทผู้ผลิตยาได้นำมาใช้กับโปรแกรมคอมพิวเตอร์ในการรวบรวมข้อมูลเกี่ยวกับโครงสร้างทางเคมีและความเป็นพิษของยา เพื่อใช้วางแผนการสังเคราะห์ยาใหม่ให้มีฤทธิ์ทางชีวภาพตามต้องการและมีความเป็นพิษต่ำ⁹ คอมพิวเตอร์ที่ใช้สำหรับการรวบรวมและวิเคราะห์ข้อมูลเหล่านี้ เรียกว่า supercomputer มีหน่วยความจำมากกว่า 3 TB (terabyte) จึงทำให้คอมพิวเตอร์ทำงานได้อย่างมีประสิทธิภาพ รวดเร็ว และสามารถจำลองโครงสร้างทางเคมีของยาได้อย่างถูกต้อง

เทคนิคทางโครมาโทกราฟีและสเปกโตรสโกปีที่ใช้ทำนายโครงสร้างทางเคมีของเมแทบอลิท์ที่เกิดขึ้น

ก่อนที่จะอธิบายโครงสร้างทางเคมีของเมแทบอลิท์ที่เกิดขึ้นด้วยเทคนิคทางสเปกโตรสโกปีจะต้องมีการแยกเมแทบอลิท์ให้บริสุทธิ์ด้วยเทคนิคทางโครมาโทกราฟี ซึ่งในปัจจุบันลิควิดโครมาโทกราฟี (liquid chromatography, LC) ที่ใช้แยกเมแทบอลิท์ให้บริสุทธิ์มักเป็น high-performance liquid chromatography (HPLC) ที่มีคอลัมน์เป็น RP-C₈ เพราะสามารถแยกสารได้หลายชนิดทั้งที่มีขั้วและไม่มีขั้ว โดยมี retention time ไม่นานจนเกินไป ดังนั้น RP-C₈ จึงสามารถแยกสารที่มีขั้ว เช่น ยาและเมแทบอลิท์ของมันเป็นออกจากของเหลวทางชีวภาพได้ดี การแยกสารที่มีขั้วสูงมากด้วยคอลัมน์ที่เป็น RP-C₁₈ จะให้ผลการแยกที่ไม่ดีเพราะสารที่มีขั้วสูงจะถูกชะออกมาเร็วเกินไป ดังนั้นจึงต้องเลือกใช้คอลัมน์ที่เหมาะสมกับชนิดของสารที่จะแยก⁶ หากต้องการประหยัดเวลาในการแยกสารควรเลือกใช้คอลัมน์ที่มีขนาดเล็กและสั้น เลือกใช้วัฏภาคเคลื่อนที่ (mobile phase) ที่มีความหนืด (viscosity) ลดลง เพื่อให้ความแรงในการชะสารออกจากคอลัมน์สูงขึ้น หลังจากแยกสารให้บริสุทธิ์แล้วจึงศึกษาโครงสร้างทางเคมีด้วย MS หรือ NMR ต่อไป

ในปัจจุบันนิยมใช้ LC-MS ในกระบวนการพัฒนาและค้นพบยา เนื่องจากสามารถอธิบายโครงสร้างทางเคมีของเมแทบอลิท์ได้อย่างถูกต้อง และสามารถศึกษาองค์ประกอบทางเคมีในตัวอย่าง (sample) ที่ซับซ้อนได้ดี โดยเฉพาะยาและเมแทบอลิท์ที่อยู่ในของเหลวทางชีวภาพ เช่น พลาสมา ซีรัม และปัสสาวะ ดังนั้นเทคนิคนี้จึงช่วยให้ทราบถึงชีวประสิทธิผล (bioavailability) ความคงตัว (stability) และเภสัชจลนศาสตร์ของยาได้เป็นอย่างดี LC-MS ใช้ปริมาณตัวอย่างในการวิเคราะห์น้อยมาก คือ ใช้พลาสมาหรือซีรัมเพียง 40 ไมโครลิตร ที่ความเข้มข้นประมาณ 10-25 นาโนกรัม/มิลลิลิตร และใช้เวลาในการวิเคราะห์สั้นมากเพียง 1-2 วัน ซึ่งถ้าเปรียบเทียบกับลิควิดโครมาโทกราฟี-อัลตราไวโอเลตสเปกโตรโฟโตเมตรี (liquid chromatography-ultraviolet spectrophotometry, LC-UV) ซึ่งเป็นเทคนิคดั้งเดิมจะต้องใช้พลาสมาประมาณ 200-1,000 ไมโครลิตร และใช้เวลาในการวิเคราะห์นาน 1-3 สัปดาห์¹¹ ในปัจจุบันได้มีการพัฒนา MS ให้มีประสิทธิภาพสูงขึ้นเพื่อทำให้การอธิบายโครงสร้างทางเคมีเป็นไปอย่างถูกต้องและแม่นยำมากยิ่งขึ้น โดยพัฒนามาเป็น MS-MS¹⁰ ซึ่งในเครื่องตรวจวิเคราะห์มวล (mass analyzer) ของ MS-MS จะมีขั้วโลหะสี่ขั้วที่เรียกว่าควอดรูโพล (quadrupole mass analyzer) โดยควอดรูโพลแรกจะเป็นการเลือก protonated molecule (MH⁺) ของสารที่สนใจ ต่อมาเมื่อไอออนที่ได้เลือกไว้เคลื่อนที่เข้าสู่ควอดรูโพลที่สองจะเกิดการแตกตัวกลายเป็น fragment ion หรือ product ion ที่มีขนาดเล็กลง ซึ่ง fragment ion เหล่านี้จะถูกวิเคราะห์ต่อไปด้วยควอดรูโพลที่สาม และในที่สุดจะวัดค่ามวลต่อประจุ (m/z) ด้วยอุปกรณ์ตรวจวัด (detector) จากข้อดีดังกล่าวข้างต้นจึงสามารถนำ MS-MS มาใช้อธิบายโครงสร้างทางเคมีได้อย่างถูกต้องและแม่นยำมากกว่าเทคนิค MS ดั้งเดิม¹¹ สเปกตรัมของ MS-MS แสดงลักษณะพีคของ fragment ion ที่คล้ายคลึงกันระหว่างยาและเมแทบอลิท์ แต่จะมีบาง fragment ion ที่แตกต่างกันซึ่งจะช่วยบอกถึงโครงสร้างทางเคมีของเมแทบอลิท์ที่แตกต่างไปจากโครงสร้างทางเคมีของยา จากการตรวจวัดปริมาณของเมแทบอลิท์หลายชนิดที่เกิดจากเมแทบอลิซึมของยาจะสามารถบอกแนวทางการปรับปรุงโครงสร้างทางเคมีของยาค้นนั้น เพื่อเพิ่มความคงตัวต่อการถูกเมแทบอลิซึมได้^{10,11} MS-MS บางชนิดสามารถบอกค่ามวลโมเลกุลที่ละเอียดและมีความถูกต้องสูงมากจึงช่วยทำนายธาตุที่เป็นองค์ประกอบของโมเลกุลได้อย่างถูกต้องและแม่นยำ ซึ่งเป็นข้อมูลสำคัญในการอธิบายโครงสร้างทางเคมีของเมแทบอลิท์

LC-MS เป็นเทคนิคที่ใช้แยกและอธิบายโครงสร้างทางเคมีของเมแทบอลิท์ ซึ่งหลังจากที่เมแทบอลิท์ถูกแยกให้บริสุทธิ์ด้วยลิควิดโครมาโทกราฟีแล้ว เมแทบอลิท์จะถูกวิเคราะห์มวลต่อไปด้วยแมสสเปกโตรเมตรี ซึ่งพีคที่มีความเข้มสูงสุดบนสเปกตรัมจะเป็นพีคของไอออนที่มีประจุและมีความสำคัญต่อการอธิบายโครงสร้างทางเคมีของเมแทบอลิท์ จาก nitrogen rule พบว่ายาหรือสารประกอบที่ภายในโครงสร้างทางเคมีประกอบด้วยไนโตรเจนเป็นจำนวนคู่

หรือไม่มีไนโตรเจนอยู่ในโมเลกุลจะมีมวลโมเลกุลเป็นเลขคู่ ในขณะที่ยาหรือสารประกอบที่ภายในโครงสร้างประกอบด้วยไนโตรเจนเป็นจำนวนคี่จะมีมวลโมเลกุลเป็นเลขคี่ จึงสามารถนำกฎนี้ไปใช้ควบคู่กับค่ามวลโมเลกุลที่ได้จาก MS เพื่อทำนายโครงสร้างทางเคมีของเมแทบอลิท์ที่มีไนโตรเจนเป็นองค์ประกอบได้ นอกจากนี้ยังสามารถนำ double-bond-equivalent (DBE) rule¹² มายืนยันโครงสร้างในส่วนที่เป็นวงแหวน (ring) หรือพันธะคู่ (double bond) ที่ปรากฏอยู่ในโครงสร้างทางเคมีของสารที่ประกอบด้วยคาร์บอน (C) ไฮโดรเจน (H) ไนโตรเจน (N) ออกซิเจน (O) และธาตุชนิดอื่นที่มีวาเลนซ์ (valence) เหมือนกัน การคำนวณค่า DBE เป็นดังนี้

$$DBE = \text{จำนวนคาร์บอน} - \frac{\text{จำนวนไฮโดรเจน}}{2} - \frac{\text{จำนวนฮาโลเจน}}{2} + \frac{\text{จำนวนไนโตรเจน}}{2} + 1$$

ตัวอย่างการคำนวณ DBE ของ C_7H_7NO เป็นดังนี้

$$DBE = 7 - 3.5 + 0.5 + 1 = 5$$

โปรดสังเกตว่าจำนวน divalent atom เช่น ออกซิเจน และซัลเฟอร์ จะไม่ถูกนำมาใช้ในการคำนวณ DBE

จากที่กล่าวมาสรุปได้ว่า ค่ามวลโมเลกุลจาก MS จะมีความสัมพันธ์กับ nitrogen rule และ DBE rule ซึ่งจะช่วยยืนยันความถูกต้องของโครงสร้างทางเคมีของเมแทบอลิท์ที่เกิดขึ้น นอกจากการใช้ MS แล้วยังนิยมใช้ NMR ในการอธิบายโครงสร้างทางเคมีของ เมแทบอลิท์ NMR เป็นการศึกษาโมเลกุลที่อยู่ในสนามแม่เหล็กและได้รับคลื่นความถี่วิทยุ นิวเคลียสที่สามารถตรวจพบได้ด้วย NMR คือ 1H , ^{19}F , ^{13}C , ^{31}P และ ^{15}N สำหรับเครื่องมือนิวเคลียร์แมกเนติกเรโซแนนซ์ สเปกโตรมิเตอร์ (NMR spectrometer) ที่มีความแรงของสนามแม่เหล็กสูง (500, 600, 800 และ 900 MHz) จะมีความไวในการวิเคราะห์สูงขึ้นตามไปด้วย³ NMR ที่ใช้อยู่ในปัจจุบันมี 3 ชนิด¹³ คือ (1) solid-state NMR (2) NMR imaging (MRI) และ (3) solution-state NMR ซึ่งชนิดหลังสุดนี้นิยมใช้ในการอธิบายโครงสร้างทางเคมีของสาร เทคนิคการศึกษาด้วย 2D NMR ที่นำไปใช้ประโยชน์ในการอธิบายโครงสร้างทางเคมีได้ดี คือ COSY (H-H correlation spectroscopy) ซึ่งให้ข้อมูลความสัมพันธ์ระหว่างโปรตอนที่อยู่ใกล้เคียงกัน TOCSY (H-H total correlation spectroscopy) ให้ข้อมูลความสัมพันธ์ระหว่างโปรตอนที่อยู่ไกลออกไป และ HSQC (heteronuclear single quantum coherence spectroscopy) ให้ข้อมูลความสัมพันธ์ระหว่างโปรตอนและคาร์บอนที่อยู่ใกล้กัน เป็นต้น ข้อดีของการวิเคราะห์ด้วย NMR คือ ไม่ทำลายโครงสร้าง ทางเคมีของสารที่ถูกวิเคราะห์โดยเฉพาะสารที่มีขนาดโมเลกุลเล็ก ไวต่อการเกิดปฏิกิริยาและระเหยง่าย สามารถใช้ NMR ศึกษาโครงสร้างทางเคมีของเมแทบอลิท์ที่ปะปนอยู่ในของเหลวทางชีวภาพได้โดยไม่จำเป็นต้องแยกสกัดเมแทบอลิท์ให้บริสุทธิ์ก่อนการวิเคราะห์ด้วย NMR สามารถใช้ NMR วิเคราะห์ได้ทั้งในเชิงปริมาณและคุณภาพ นอกจากนี้ NMR ยังใช้ปริมาณสารในการวิเคราะห์น้อย ตั้งแต่ 1 ไมโครกรัม ซึ่งจะใช้เวลาในการวิเคราะห์ 1 ชั่วโมง ถึง 10 มิลลิกรัม ซึ่งจะใช้เวลาในการวิเคราะห์ลดลงเหลือประมาณ 5 นาที ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับประสิทธิภาพของเครื่องมือ ตัวอย่างเช่น การศึกษาโปรตอนของสารที่มีมวลโมเลกุล 500 ดาลตัน ด้วยเครื่องมือที่มีความเข้มของสนามแม่เหล็ก 600 MHz จะใช้สารในการวิเคราะห์เพียง 10 นาโนกรัม แสดงว่า NMR มีความไวในการวิเคราะห์สูงมาก ในปัจจุบันได้มีการพัฒนาความเข้มของสนามแม่เหล็กให้สูงขึ้นเป็น 800 หรือ 900 MHz เพื่อเพิ่มความไวของการวิเคราะห์ให้สูงขึ้น อย่างไรก็ตามในบางครั้ง NMR ไม่สามารถให้ข้อมูลบางอย่างได้ เช่น สารจำพวกกรดคาร์บอกซิลิก ฟีนอล และสารที่มีหมู่อะมิโน อาจไม่สามารถใช้ 1H NMR อธิบายโครงสร้างทางเคมีได้อย่างถูกต้องและแม่นยำ¹⁴ เนื่องจากเกิดปรากฏการณ์การแลกเปลี่ยนโปรตอนและดิวทีเรียม (proton-deuterium exchange) ในโมเลกุลของสารทำให้ไม่พบพีคของโปรตอนที่อยู่ในหมู่ฟังก์ชันดังกล่าว นอกจากนี้สารที่มีหมู่ไนโตรและสารที่คอนจูเกตอยู่กับหมู่ซัลเฟตซึ่งไม่มีโปรตอนจะไม่สามารถใช้ 1H NMR อธิบายโครงสร้างทางเคมีได้ แต่สามารถใช้ข้อมูลจาก MS อธิบายแทนได้ ดังนั้นในปัจจุบันจึงพบว่ามี

การนำ MS มาใช้ร่วมกับ NMR กลายเป็นเทคนิคใหม่ที่เรียกว่า LC-NMR-MS โดยที่สารจำนวนน้อยมากจะถูกส่งไปวิเคราะห์สเปกตรัมที่ NMR แต่สารส่วนมากจะถูกเก็บไว้ใน loop storage เพื่อป้องกันไม่ให้เกิด peak diffusion บนคอลัมน์ ต่อมาได้มีการพัฒนาโดยการนำ solid-phase extraction (SPE) มาใช้ร่วมกับเทคนิคนี้กลายเป็น SPE-LC-NMR-MS ซึ่ง SPE จะช่วยกำจัดสารรบกวนออกไปจากตัวอย่างที่ต้องการวิเคราะห์โดยเฉพาะการวิเคราะห์เมแทบอลิไทน์ในพลาสมา ซึ่งมีสารอื่นเจือปนอยู่มาก¹⁵

การแลกเปลี่ยนโปรตอนและดิวทีเรียม หรือเรียกว่า H-D exchange เป็นปรากฏการณ์ที่ช่วยแก้ปัญหาการอธิบายโครงสร้างทางเคมีของเมแทบอลิไทน์ที่ประกอบด้วย exchangeable (labile) hydrogen atom¹⁶ การแลกเปลี่ยนโปรตอนและดิวทีเรียมมีข้อดีต่อเทคนิค LC-MS คือ สามารถตรวจสอบค่ามวลของ labile hydrogen ที่อยู่ในหมู่ฟังก์ชัน -OH, -SH, -NH, -NH₂ และ -COOH ได้อย่างถูกต้อง การทราบจำนวน labile hydrogen ที่อยู่ในโมเลกุลจะมีประโยชน์มากในการเปรียบเทียบโครงสร้างทางเคมีของเมแทบอลิไทน์กับสารตั้งต้นที่เป็น parent molecule เพราะทำให้ทราบว่าหมู่ฟังก์ชันที่ประกอบด้วย labile hydrogen นั้นยังคงอยู่หรือหายไปจากโมเลกุลหลังจากเกิดกระบวนการเมแทบอลิซึม³ ดังนั้นการนำปรากฏการณ์การแลกเปลี่ยนโปรตอน และดิวทีเรียมมาใช้ร่วมกับเทคนิค MS-MS จึงช่วยให้การอธิบายโครงสร้างทางเคมี ถูกต้องมากยิ่งขึ้น ในปัจจุบันนิยมนำการแลกเปลี่ยนโปรตอนและดิวทีเรียมมาใช้ร่วมกับ LC-MS เพื่ออธิบายโครงสร้างทางเคมีของเมแทบอลิไทน์ที่เกิดจากปฏิกิริยา dehydrogenation, oxidation, glucuronidation และ dealkylation นอกจากนี้ยังช่วยแยกความแตกต่างระหว่าง N-oxide หรือ S-oxide กับสารที่เกิดจากปฏิกิริยา monohydroxylation และแยกความแตกต่างระหว่าง primary กับ secondary glucuronide ที่เกิดจากปฏิกิริยา conjugation เป็นต้น

ในที่นี้ขอยกตัวอย่างการศึกษากระบวนการเมแทบอลิซึมของยาด้วยเทคนิคทางโครมาโทกราฟีและสเปกโตรสโกปี Tamoxifen เป็นยาต้านมะเร็ง^{16,17} ที่ถูกเมแทบอลิซึมด้วยการเติมหมู่ไฮดรอกซิลลงบนวงแหวนอะโรมาติก (aromatic ring) กลายเป็น hydroxytamoxifen สามารถศึกษากระบวนการเมแทบอลิซึมที่เกิดขึ้นนี้ด้วย LC-MS โดยพบว่าพีคของเมแทบอลิไทน์มีค่า m/z สูงกว่า m/z ของตัวยา ซึ่งค่าที่เพิ่มขึ้นนี้เป็นมวลของหมู่ไฮดรอกซิลที่เพิ่มเข้ามาในโครงสร้างทางเคมีของเมแทบอลิไทน์ อีกตัวอย่างหนึ่งคือยาในกลุ่มของ classical dopamine D₂ antagonist ซึ่งเป็นยารักษาโรคจิตเภท (schizophrenia) แต่ยาในกลุ่มนี้มักก่อให้เกิดอาการข้างเคียงทางสมอง ต่อมาได้มีการพัฒนามาเป็น dopamine D₃/D₄ receptor antagonist ที่มีความจำเพาะเจาะจงและมีความคงตัวต่อการถูกเมแทบอลิไทน์ได้ดีขึ้น¹⁸ จากการศึกษาด้วย LC-MS/MS พบว่า piperazinylalkylisoxazole ที่มีฤทธิ์เป็น dopamine D₃/D₄ receptor antagonist จะถูกเมแทบอลิซึมด้วยปฏิกิริยาที่สำคัญ คือ N,O-dealkylation และ ring hydroxylation เกิดเป็นเมแทบอลิไทน์ 17 ชนิด ที่มีโครงสร้างทางเคมีที่แตกต่างกัน ทราบได้จากพีคของเมแทบอลิไทน์แต่ละชนิดมีค่า m/z ของ molecular ion แตกต่างกันไป ซึ่งเมแทบอลิไทน์ทุกชนิดมีโครงสร้างทางเคมีคล้ายคลึงกันมากแตกต่างกันเฉพาะที่หมู่ฟังก์ชันเท่านั้น Indinavir เป็นยารักษาโรคเอดส์⁶ ที่ออกฤทธิ์เป็น HIV protease inhibitor เมื่อวิเคราะห์เมแทบอลิไทน์ทั้ง 7 ชนิด ด้วย LC-MS/MS พบว่าเมแทบอลิไทน์เหล่านี้เกิดจากปฏิกิริยา monohydroxylation และ N-dealkylation ทราบได้จาก m/z ของเมแทบอลิไทน์ที่เพิ่มขึ้นจากปฏิกิริยา hydroxylation เพราะมีการเติมหมู่ไฮดรอกซิล หรือมี m/z ลดลงจากปฏิกิริยา dealkylation เพราะมีการตัดหมู่แอลคิลออกไป การอธิบายโครงสร้างทางเคมีของเมแทบอลิไทน์และการศึกษากระบวนการเมแทบอลิซึมมักทำได้ยากเพราะต้องเลือกใช้เทคนิคและเครื่องมือที่เหมาะสม นอกจากนี้ยังต้องอาศัยประสบการณ์ในการแยกสารและการแปลผลข้อมูลจากสเปกตรัมที่ซับซ้อน ดังนั้นขั้นตอนนี้จึงเปรียบเสมือนคอขวดของกระบวนการพัฒนาและค้นพบยาเพราะต้องอาศัยประสบการณ์และความชำนาญของนักวิจัย นอกจากนี้ยังต้องใช้เวลาในการวิเคราะห์ข้อมูลบนสเปกตรัมค่อนข้างนาน แต่ในปัจจุบันการนำ LC-MS และ LC-NMR เข้ามาช่วยแยกและอธิบายโครงสร้างทางเคมีของเมแทบอลิไทน์ได้ทำให้กระบวนการพัฒนาและการค้นพบยามีความก้าวหน้าอย่างรวดเร็ว

การศึกษากระบวนการเมแทบอลิซึมด้วยเทคนิคทางโครมาโทกราฟีและสเปกโตรสโกปีพอสรุปได้ว่า เมแทบอลิท์เกิดจากการนำยามาบ่มกับ liver microsome¹⁹ แล้วจึงสกัดเมแทบอลิท์ออกมาด้วยสารทำละลายที่เหมาะสม เช่น ethyl acetate และนำสารสกัดหยาบที่ได้มาทำให้บริสุทธิ์ต่อไปด้วย HPLC จากนั้นจึงศึกษาโครงสร้างทางเคมีของเมแทบอลิท์ด้วย MS หรือ NMR ในกรณีที่ใช้ LC-MS หรือ LC-NMR ที่มีประสิทธิภาพสูงไม่จำเป็นต้องสกัดแยกเมแทบอลิท์ด้วยสารทำละลายการอธิบายโครงสร้างทางเคมีของเมแทบอลิท์ที่ประกอบด้วยวงแหวนอะโรมาติกโดยใช้ NMR พบว่าบนสเปกตรัมของ ¹H NMR ที่ค่า chemical shift ค่อนไปทาง downfield คือมีค่ามากกว่า 5.5 ppm เป็นบริเวณที่ปรากฏพีคของโปรตอนบนวงแหวนอะโรมาติกของเมแทบอลิท์ แต่โปรตอนของ aliphatic endogenous substance ที่ปะปนอยู่กับเมแทบอลิท์จะปรากฏพีคที่ upfield คือมีค่า chemical shift ประมาณ 0.7-5.5 ppm ดังนั้นจึงไม่พบพีคที่ซ้อนทับกันระหว่างโปรตอนของเมแทบอลิท์ที่ต้องการศึกษากับโปรตอนของสารอื่นที่เข้ามาบ่ม สารจำพวก phenyl analogue เมื่อถูกเมแทบอลิท์ด้วยปฏิกิริยา aromatic hydroxylation วงแหวนอะโรมาติกจะถูกแทนที่ด้วยหมู่ไฮดรอกซิลในตำแหน่งที่ 4 (หรือตำแหน่ง para) ดังนั้นจึงพบพีคคู่ (doublet) ของโปรตอนที่มีความเข้ม (intensity) เท่ากันบนสเปกตรัมของ ¹H NMR สรุปได้ว่าเมแทบอลิท์ที่เกิดขึ้น คือ 4-hydroxyphenyl analogue นอกจากนี้ยังสามารถยืนยันโครงสร้างทางเคมีของเมแทบอลิท์ที่เกิดขึ้นนี้ด้วย MS โดยพบว่ามวลของเมแทบอลิท์จะเพิ่มขึ้นเป็น M+16¹³ จากที่กล่าวมาข้างต้นจะเห็นได้ว่า LC-MS สามารถวิเคราะห์และทำนายโครงสร้างทางเคมีของยาและเมแทบอลิท์ของมันที่มีโครงสร้างทางเคมีคล้ายคลึงกับยาได้ อย่างไรก็ตามหากพบว่าบาง fragment ion มีค่า m/z เท่ากัน ก็ควรยืนยันโครงสร้างทางเคมีอีกครั้งด้วย NMR เพื่อเพิ่มความถูกต้องมากขึ้น

ยาหรือสารที่มีโครงสร้างทางเคมีเป็น arylacetic acids, arylpropionic acids, aryl hydroxamic acids, oximes, anilines, anilides, hydrazines, hydrazides, hydantoin, quinones, quinone methides, nitroaromatics, heteroaromatics, halogenated hydrocarbons และ halogenated aromatics (บางชนิด) จะถูกออกซิไดส์ไปเป็น acroleins และ medium-chain fatty acids ซึ่งเมแทบอลิท์เหล่านี้จะไม่คงตัวจึงถูกเปลี่ยนไปเป็นสารที่มีความคงตัวสูงขึ้นแต่สามารถก่อให้เกิดอาการข้างเคียงแก่มนุษย์ที่ได้รับยาหรือสารดังกล่าวเข้าสู่ร่างกาย²⁰ ดังตัวอย่างของยาที่มีโครงสร้างทางเคมีเป็น quinone เช่น minocycline (ยาปฏิชีวนะ) acetaminophen (ยาบรรเทาปวด) และ aminodiaquine (ยาด้านมาเลเรีย) จะถูกเมแทบอลิท์ในร่างกายกลายเป็นเมแทบอลิท์ที่มีพิษต่อดังนั้นในการปรับปรุงโครงสร้างทางเคมีของยาจึงมักหลีกเลี่ยงการเติมหมู่ฟังก์ชัน (functional group) ดังต่อไปนี้เข้าไปในโมเลกุลยา เช่น aromatic amines, hydroxy amines, phenols, epoxides, acyl halides, acyl glucuronides, thiopenes, furans และ quinone เป็นต้น เพราะทำให้เกิดเมแทบอลิท์ที่มีพิษขึ้นได้

การป้องกันไม่ให้อาถูกเมแทบอลิท์กลายเป็นสารพิษได้นั้นสามารถทำได้โดยการเติม blocking group หรือลดความชอบไขมันของโมเลกุลยา² ตัวอย่างเช่น ยาที่มีโครงสร้างทางเคมีเป็น aromatic ring เมื่อถูกแทนที่ด้วยหมู่ฟังก์ชันที่ขอยิเล็คตรอน (electron-withdrawing-groups) เช่น CF₃, SO₂ NH₂ และ SO₃- จะถูกเมแทบอลิท์ด้วยปฏิกิริยาออกซิเดชันได้น้อยลง หรือการเติม N-t-butyl group เข้าไปในโมเลกุลยาจะป้องกันการเกิด N-dealkylation การทำให้โมเลกุลมี conformation ที่จำกัดมากขึ้น หรือการเติม steric group เข้าไปในโครงสร้างจะช่วยให้ยาถูกเมแทบอลิท์ได้น้อยลง โมเลกุลที่มี phenolic group มักถูกเมแทบอลิท์ด้วยปฏิกิริยา glucuronidation ดังนั้นจึงควรหลีกเลี่ยงการนำโมเลกุลในลักษณะเช่นนี้มาพัฒนาเป็นยา สรุปได้ว่ายาควรมีโครงสร้างทางเคมีที่มีความชอบไขมันไม่สูงจนเกินไปและมีหมู่ฟังก์ชันที่ช่วยป้องกันการถูกเมแทบอลิท์ให้กลายเป็นสารพิษในที่นี้ขอยกตัวอย่างปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นในกระบวนการเมแทบอลิซึมของยาบางกลุ่ม เช่น ยาที่มีโครงสร้างทางเคมีเป็น oxazole หรือ oxadiazole ring system เมื่อถูกเมแทบอลิท์จะทำให้วงแหวนของโครงสร้างแตกออก และต่อมาจะถูกไฮโดรไลซิสให้กลายเป็น ketone ซึ่งเป็นเมแทบอลิท์หลัก¹⁶ สำหรับเมแทบอลิซึมของ indole ring มักมีการเติมหมู่ไฮดรอกซิลบนวงแหวน อย่างไรก็ตามหากบนวงแหวนมี

หมู่ฟังก์ชันอื่นที่รบกวนการเกิดปฏิกิริยา hydroxylation ก็จะไม่สามารถเติมหมู่ไฮดรอกซิลบนวงแหวนได้ การเติมหมู่ไฮดรอกซิลบนวงแหวนในตำแหน่งที่ meta กับไนโตรเจนของ indole ring จะมีโอกาสเกิดขึ้นได้มากที่สุด ความรู้เกี่ยวกับปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นดังกล่าวได้มาจากการศึกษารวบรวมข้อมูลเกี่ยวกับโครงสร้างทางเคมีของยาชนิดต่าง ๆ และเมแทบอลิซึม ซึ่งโครงสร้างทางเคมีจะมีความสัมพันธ์กับความชอบไขมันและคุณสมบัติทางไฟฟ้าของสารที่จะมีผลต่อการจับกันระหว่างสารกับรีเซปเตอร์ จึงสามารถนำความรู้เหล่านี้มาประยุกต์ใช้ในการทำนายโครงสร้างทางเคมีของเมแทบอลิท์ และสามารถปรับปรุงโครงสร้างทางเคมีของสารให้ดีขึ้น การทราบถึงโครงสร้างทางเคมีของเมแทบอลิท์ที่เกิดขึ้นสามารถช่วยให้การออกแบบหรือการปรับปรุงโครงสร้างยาประสบความสำเร็จ ในการปรับปรุงโครงสร้างทางเคมีอาจเพิ่มความคงตัวของโมเลกุลไม่ให้ถูกเมแทบอลิท์ได้ง่าย รวมถึงการเติมธาตุฮาโลเจน (ฟลูออรีน คลอรีน หรือโบรมีน) เข้าไปในโมเลกุลจะช่วยเพิ่มสภาพไฟฟ้าลบ (electronegativity) และความชอบไขมันให้แก่โมเลกุล สำหรับการเติมหมู่แทนที่ขนาดใหญ่ (bulky group) จะช่วยยับยั้งกระบวนการเมแทบอลิซึมและการเกิด cyclization ของยาบางชนิด

ในกระบวนการพัฒนายาจะต้องมีการติดตามความเป็นพิษของยาในท้องตลาดอยู่เสมอ เพราะในอดีตมียาหลายชนิดในท้องตลาดที่ทำให้เกิดพิษต่อผู้ใช้ยา เช่น troglitazone ชักนำให้เกิดตับอักเสบ felbamate ชักนำให้เกิดภาวะโลหิตจาง และ lamotrigine ทำให้เกิดผื่นแพ้ เป็นต้น หากทราบถึงกลไกในการเกิดพิษของยาก็น่าจะช่วยลดอันตรายที่จะเกิดขึ้นกับผู้ใช้ยาได้ เช่น การนำ LC-MS/MS มาศึกษาเมแทบอลิท์ที่เป็นพิษของ naproxen (Nap) ซึ่งเป็นยาต้านอักเสบที่ไม่ใช่สเตียรอยด์ (nonsteroidal anti-inflammatory drugs) ยาชนิดนี้มีหมู่คาร์บอกซิลอยู่ในโมเลกุล จึงเกิดปฏิกิริยา glucuronidation ได้ดีกลายเป็น acyl glucuronides ที่สามารถจับกับโปรตีนในร่างกาย ทำให้เกิด drug-protein adducts ที่เป็นต้นเหตุของการแพ้และเป็นพิษต่อดัง²¹ เมแทบอลิท์หลักของ naproxen คือ naproxen-1- β -O-glucuronide (Nap-GlcU) และ naproxen coenzyme A (Nap-CoA) thioester ซึ่งเมแทบอลิท์ทั้งสองชนิดนี้จัดเป็นสปีชีส์ที่ชอบอิเล็กตรอน (electrophilic species) โดยจะจับกับ glutathione ในร่างกายแล้วกลายเป็น Nap-glutathione conjugate ที่มีพิษ ดังนั้น LC-MS/MS ที่ทำการแยกและวิเคราะห์โครงสร้างทางเคมีของเมแทบอลิท์ที่เป็นพิษจึงช่วยให้ทราบถึงอันตรายของยาที่เกิดขึ้นจากเมแทบอลิท์ส่งผลให้มีการเฝ้าระวังอันตรายที่จะเกิดขึ้นจากการใช้ยา รวมทั้งนำความรู้ที่ได้มาปรับปรุงโครงสร้างทางเคมีของยาให้มีความเป็นพิษต่ำลง ด้วยการตัดหมู่ฟังก์ชันที่เป็นพิษออกไป หรือปรับเปลี่ยนหมู่ฟังก์ชันให้มีพิษลดลง

จากที่กล่าวมาข้างต้นจึงควรทราบข้อมูลความเป็นพิษของสารตั้งแต่ตอนต้นของกระบวนการพัฒนาและค้นพบยาเพื่อจะได้กำจัดสารที่มีพิษออกไปก่อนที่จะพัฒนาสารในกลุ่มโครงสร้างนั้นเพื่อเป็นยาต่อไป หรือเพื่อกำจัดยาที่เป็นพิษออกจากท้องตลาดได้อย่างรวดเร็ว²² การให้ได้ข้อมูลของความเป็นพิษที่จะเกิดขึ้นจำเป็นต้องอาศัยข้อมูลจากโปรแกรมคอมพิวเตอร์หรือการใช้เทคนิคทางโครมาโทกราฟีร่วมกับสเปกโตรสโกปีดังกล่าวข้างต้น ดังนั้นจึงเห็นได้ว่านอกจาก LC-MS, LC-NMR และ LC-NMR-MS จะเป็นเทคนิคที่ใช้ในขั้นตอนแรกของกระบวนการพัฒนาและค้นพบยาแล้ว ยังสามารถนำมาใช้ได้ในทุกขั้นตอนของกระบวนการพัฒนาและค้นพบยาอีกด้วย สำหรับการพัฒนาในขั้นตอนสุดท้ายจะเป็นการพัฒนาทางคลินิก (preclinical และ clinical development) เพื่อศึกษา ADME ชีวประสิทธิผล และเภสัชจลนศาสตร์ เป็นต้น สารที่ได้รับการคัดเลือกมาจนถึงขั้นตอนนี้จะถูกวิเคราะห์ด้วย LC-MS หรือ LC-NMR หรือถูกวิเคราะห์ด้วยการเตรียมสารให้อยู่ในรูปที่ติดฉลากด้วยสารกัมมันตรังสี เช่น ^{14}C และ ^3H จากนั้นจึงนำเมแทบอลิท์ของสารที่ถูกติดฉลากด้วยกัมมันตรังสีมาวิเคราะห์ด้วย LC-ARC (liquid chromatography-accurate radioisotope counting) ที่เชื่อมต่อกับเครื่องตรวจวัดกัมมันตรังสี (radioactivity detector) และ MS²³ เพื่ออธิบายโครงสร้างทางเคมีของเมแทบอลิท์ที่แตกต่างไปจากสารตั้งต้น ซึ่งการทราบถึงโครงสร้างทางเคมีที่เปลี่ยนแปลงไปนี้จะเป็แนวทางในการปรับปรุงโครงสร้างทางเคมีให้สารมี ADME ชีวประสิทธิผล และเภสัชจลนศาสตร์ดีขึ้น รวมทั้งสามารถบอกความเป็นพิษของสารได้จากโครงสร้างทางเคมีที่เปลี่ยนแปลงไป

บทสรุป

กระบวนการพัฒนาและค้นพบยาประกอบด้วยหลายขั้นตอน ตั้งแต่การทดลองสังเคราะห์สารในขั้นต้น การคัดเลือกสารที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพและไม่เป็นพิษ การปรับปรุงโครงสร้างทางเคมีเพื่อเพิ่มฤทธิ์ทางชีวภาพและลดความเป็นพิษ รวมทั้งมีการดัดแปลง การกระจายตัว เมแทบอลิซึม และการขับออกที่ดี การออกแบบโครงสร้างทางเคมีของยานั้นจำเป็นต้องอาศัยความรู้เกี่ยวกับกระบวนการเมแทบอลิซึมที่เกิดขึ้นกับยาเหล่านั้น ซึ่งข้อมูลเกี่ยวกับกระบวนการเมแทบอลิซึมสามารถทำนายได้จากโปรแกรมคอมพิวเตอร์หรือจากการอธิบายโครงสร้างทางเคมีของเมแทบอลิท์ที่เกิดขึ้น ดังนั้นเพื่อให้การอธิบายโครงสร้างทางเคมีของเมแทบอลิท์เป็นไปอย่างถูกต้องและรวดเร็วจึงได้มีการนำเทคนิคที่ทันสมัย เช่น LC-MS, LC-NMR และ LC-NMR-MS มาใช้ในการศึกษาโครงสร้างของเมแทบอลิท์ ทำให้สามารถทำนายกระบวนการเมแทบอลิซึมที่น่าจะเป็นไปได้ จากที่กล่าวมาจะเห็นว่าปัจจัยสำคัญอย่างหนึ่งที่ทำให้การพัฒนาและค้นพบยาประสบความสำเร็จ คือ เทคนิคและเครื่องมือที่ทันสมัยโดยเฉพาะ MS และ NMR ซึ่ง MS ให้ข้อมูลมวลโมเลกุลของสารและแนวทางการแตกตัวของสาร สำหรับ NMR ให้ข้อมูลเพิ่มเติมเกี่ยวกับตำแหน่งของหมู่ฟังก์ชัน เช่น -OH, -OMe และ -COOH เป็นต้น รวมทั้งส่วนประกอบอื่นบนโครงสร้างของสาร และในบางกรณีสามารถบอกถึงเคมีที่เกี่ยวข้องกับระยะอะตอมในโมเลกุลของสารได้อีกด้วย ต่อมาได้มีการพัฒนาเทคนิคการแยกและการอธิบายโครงสร้างทางเคมีของสารมาเป็น LC-NMR-MS ที่ให้ข้อมูลเกี่ยวกับโครงสร้างทางเคมีของสารได้อย่างถูกต้องและครบถ้วน จึงเห็นได้ว่าการพัฒนาและค้นพบยาจะมีความก้าวหน้าไปมากน้อยเพียงใดนั้น ส่วนหนึ่งจะขึ้นอยู่กับเทคนิคทางโครมาโทกราฟีและสเปกโตรสโกปี ที่ทันสมัยซึ่งยังคงต้องมีการพัฒนาเทคนิคเหล่านี้ต่อไป

เอกสารอ้างอิง

1. Corcoran O, Spraul M, Hofmann M, et al. 750 MHz HPLC-NMR spectroscopic identification of rat microsomal metabolites of phenoxypyridines. *J Pharmaceut Biomed Anal* 1997 ; 16 : 481-9.
2. Nassar A, Kamel A, and Clarimont C. Improving the decision-making process in the structural modification of drug candidates: enhancing metabolic stability. *Drug Discov Today* 2004; 9(23) : 1020-8.
3. Nassar AF, and Talaat RE. Strategies for dealing with metabolite elucidation in drug discovery and development. *Drug Discov Today* 2004; 9(7) : 317-27.
4. Berna M, Ackerman B, and Murphy A. High-throughput chromatographic approaches to liquid chromatographic/tandem mass spectrometric bioanalysis to support drug discovery and development. *Analytica Chimica Acta* 2004; 509(1) : 1-9.
5. Sunazuka T, Handa M, Nagai K, et al. Absolute stereochemistries and total synthesis of (+)-arisugacins A and B, potent, orally bioactive and selective inhibitors of acetylcholinesterase. *Tetrahedron* 2004; 60(36) : 7845-59.
6. Yu X, Cui D, and Davis MR. Identification of in vitro metabolites of indinavir by "intelligent automated LC-MS/MS" (INTAMS) utilizing triple quadrupole tandem mass spectrometry. *J Am Soc Mass Spectrom* 1999; 10 : 175-83.
7. Nassar A, Kamel A, and Clarimont C. Improving the decision-making process in structural modification of drug candidates : reducing toxicity. *Drug Discov Today* 2004; 9(24) : 1055-64.
8. Kassel D. Applications of high-throughput ADME in drug discovery. *Curr Opin in Chem Bio* 2004 ; 8(3) : 339-45.

9. Scott KR. Assessing the impact of high-performance computing on the discovery and development process. *Drug Discov Today* 2004 ; 2(5) : 175-9.
10. Korfmacher WA, Cox KA, Bryant MS, et al. HPLC-API/MS/MS: a powerful tool for integrating drug metabolism into the drug discovery process. *Drug Discov Today* 1997; 2(12) : 532-7.
11. Zubritsky E. MALDI-TOF MS: Biomolecules and beyond. *Anal Chem* 1998 ; 69 : 733A-7A.
12. Silverstein RM, Bassler GC and Morrill TC. *Spectrometric identification of organic compound*, 5th ed. Singapore : John Wiley & Sons, Inc., 1991 : 289-316.
13. Corcoran O, and Spraul M. LC-NMR-MS in drug discovery. *Drug Discov Today* 2003; 8: 624-31.
14. Hsieh Y, Brisson J, Wang G, et al. Simultaneous fast HPLC-MS/MS analysis of drug candidates and hydroxyl metabolites in plasma. *J Pharmaceut Biomed Anal* 2003; 33(2): 251-61.
15. Schellem A, Ooms B, Lagemaat D, et al. Generic solid phase extraction-liquid chromatography-tandem mass spectrometry method for fast determination of drugs in biological fluids. *J Chromatogr. B* 2003 ; 788 : 251-3.
16. Hawkins DR. Use and value of metabolism databases. *Drug Discov Today* 1999 ; 4(10) : 466-71.
17. Lim HK, Stellingweif S, Sisenwine S, et al. Rapid drug metabolite profiling using fast liquid chromatography, automated multiple-stage mass spectrometry and receptor-binding. *J Chromatogr A* 1999 ; 831(2) : 227-41.
18. Lee J, Son J, Koh HY, et al. Rapid analysis of metabolic stability of dopamine receptor antagonist and detection of their metabolites by liquid chromatography/tandem mass spectrometry. *Anal Biochem* 2003 ; 313(2) : 292-300.
19. Gerhard U, and Thomas S. Accelerated metabolite identification by "Extraction-NMR". *J Pharmaceut Biomed Anal* 2003 ; 32 : 531-8.
20. Walker M, Barrett T, and Guppy L. Functional pharmacology: the drug discovery bottleneck?. *Drug Discov Today* 2004 ; 3(5) : 208-15.
21. Olsen J, Bjornsdottir I, Tjornelund J, and Hansen S. Chemical reactivity of the naproxen acyl glucuronide and the naproxen coenzyme A thioester towards bionucleophiles. *J Pharm Biomed Anal* 2002 ; 29: 7-15.
22. Uetrecht J. Screening for the potential of a drug candidate to cause idiosyncratic drug reactions. *Drug Discov Today* 2003 ; 8(18) : 832-7.
23. Boersen KO. Use of a microplate scintillation counter as a radioactivity detector for miniaturized separation techniques in drug metabolism. *Anal Chem* 2000 ; 72 : 3956-9.

คำถาม

1. เทคนิคใดที่ใช้แยกและอธิบายโครงสร้างทางเคมีของเมแทบอลิท์
 1. LC-MS
 2. LC-NMR
 3. LC-SPE-MS
 4. LC-NMR-MS
 5. ถูกทุกข้อ
2. ข้อใดคือประโยชน์ของการอธิบายโครงสร้างทางเคมีของเมแทบอลิท์
 1. ทำนายเมแทบอลิซึมของยาได้
 2. ทำนายความเป็นพิษที่จะเกิดขึ้นได้
 3. ปรับปรุงโครงสร้างของยาให้ออกฤทธิ์ได้ดีขึ้น
 4. ปรับปรุงโครงสร้างของยาให้มีความคงตัวสูงขึ้น
 5. ถูกทุกข้อ
3. โปรแกรมคอมพิวเตอร์ชนิดใดที่สามารถทำนายโครงสร้างของเมแทบอลิท์ได้
 1. Pallas software
 2. MetaboLynxTM software
 3. ACD/MS software
 4. DEREK software
 5. ข้อ 1, 2 และ 3
4. MS สามารถบอกข้อมูลใดของเมแทบอลิท์
 1. มวลโมเลกุล
 2. การแตกตัวของโมเลกุล
 3. เคมีที่เกี่ยวข้องกับระยะอะตอมในโมเลกุล
 4. ข้อ 1 และ 2
 5. ข้อ 1-3
5. ในกระบวนการพัฒนายาจะเกี่ยวข้องกับสิ่งใดบ้าง
 1. ชีวประสิทธิผล
 2. เภสัชจลนศาสตร์
 3. การดูดซึม
 4. การขับออก
 5. ถูกทุกข้อ

6. โปรแกรมคอมพิวเตอร์ที่รวบรวมข้อมูลพื้นฐานเกี่ยวกับการแตกตัวของสาร เป็นการรวบรวมข้อมูลที่ได้จากเทคนิคทางสเปกโตรสโกปีชนิดใด
 1. MS
 2. NMR
 3. UV
 4. HPLC
 5. SPE
7. กฎใดที่ใช้ในการอธิบายโครงสร้างทางเคมีร่วมกับ MS และ NMR
 1. nitrogen rule
 2. double-bond-equivalent rule
 3. hydrogen rule
 4. ข้อ 1 และ 2
 5. ข้อ 1-3
8. การพบพีคคู่ที่มีความเข้มเท่ากันบนสเปกตรัมของ ^1H NMR แสดงว่ามีการแทนที่ด้วยหมู่ไฮดรอกซิลบนตำแหน่งใดของวงแหวนอะโรมาติก
 1. *ortho*
 2. *meta*
 3. *para*
 4. *ortho* หรือ *meta*
 5. ไม่มีข้อใดถูก
9. ข้อใดเป็นข้อดีของการแลกเปลี่ยนไฮโดรเจนและดิวทีเรียม
 1. ตรวจสอบค่ามวลของ labile hydrogen
 2. บอกจำนวน labile hydrogen
 3. บอกความแตกต่างระหว่าง N-oxide กับ S-oxide
 4. บอกความแตกต่างระหว่าง primary และ secondary glucuronide
 5. ถูกทุกข้อ
10. NMR ชนิดใดที่สามารถนำมาใช้อธิบายโครงสร้างทางเคมีของเมแทบอไลต์ได้
 1. solid-state NMR
 2. solution-state NMR
 3. NMR imaging
 4. ข้อ 1 และ 2
 5. ไม่มีข้อใดถูก

