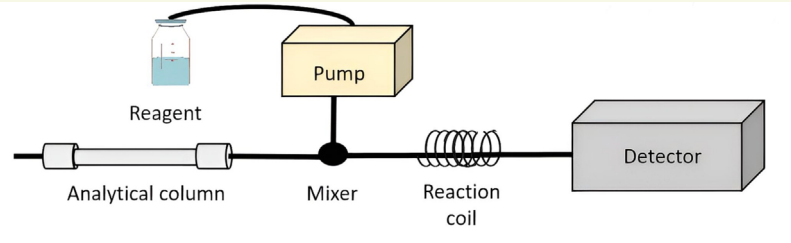
HPLC
ที่เป็นได้มากกว่าโครมาโทกราฟี

ธิรดา สุขธรรม *นักวิทยาศาสตร์ปฏิบัติการ*
กองเทคโนโลยีชุมชน

สารพฤกษเคมี (phytochemicals) เป็นสารเคมีที่สามารถออกฤทธิ์ทางชีวภาพหรือออกฤทธิ์ต่อสิ่งมีชีวิต พบเฉพาะในพืช สารกลุ่มนี้อาจเป็นสารที่ทำให้พืชผักชนิดนั้น ๆ มีสี กลิ่นหรือรสชาติที่เป็นลักษณะเฉพาะตัว บอกถึงความจำเพาะของสมุนไพร สารพฤกษเคมีสามารถแบ่งออกเป็นประเภทใหญ่ ๆ เช่น ฟลาโวนอยด์ อัลคาลอยด์ กรดฟีนอลิก แคโรทีนอยด์ และแทนนิน เป็นต้น การวิเคราะห์สารพฤกษเคมีเหล่านี้สามารถทำได้ด้วยวิธีทางโครมาโทกราฟี เช่น thin-layer chromatography (TLC) gas chromatography (GC) และ high performance liquid chromatography (HPLC) เป็นต้น ซึ่งวิธีที่ได้รับความนิยมมากคือ HPLC เนื่องจากสารพฤกษเคมีส่วนใหญ่เป็นสารที่มีโมเลกุลขนาดใหญ่ มีจุดเดือดสูง และสามารถละลายในตัวทำละลายต่าง ๆ ได้ดี ซึ่งนอกจากการวิเคราะห์ทางเคมีแล้วการวิเคราะห์สารเหล่านี้โดยอาศัยกระบวนการทางชีวภาพก็มีความสำคัญไม่น้อยเพราะฤทธิ์ทางชีวภาพจะสามารถช่วยจำแนกความสามารถของสารสกัดสมุนไพรในด้านต่าง ๆ เช่น การทดสอบ**ฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระ** (antioxidant activities) สามารถทำได้หลายวิธีด้วยการใช้รีเอเจนท์ต่างกัน ได้แก่ 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) radical scavenging assay, 2,2′-azino-bis(3-ethylbenzo thiazoline-6-sulfonic acid) (ABTS•+) radical cation - based assay, ferric reducing antioxidant power (FRAP) assay และ cupric reducing antioxidant capacity (CUPRAC) ส่วน**ปริมาณฟีนอลิกทั้งหมด** (total phenolic content, TPC) สามารถทำได้ด้วยวิธี Folin-Ciocalteu reagent ซึ่งอาศัยหลักการให้สารสำคัญเกิดปฏิกิริยากับรีเอเจนท์กลายเป็นสารอนุพันธ์ (derivatized compounds) ซึ่งส่วนใหญ่เป็นสารที่มีสี ที่สามารถตรวจวัดด้วยเครื่องมือ UV-Vis spectrophotometer หรือ 96-well plate reader [1] แล้วจึงนำมาคำนวณเป็นความเข้มข้นของสารที่สามารถยับยั้งอนุมูลอิสระได้ร้อยละ 50 (inhibitory concentration, IC50) เพื่อเปรียบเทียบประสิทธิภาพของสมุนไพร

การวิจัยด้านสมุนไพรนั้นต้องอาศัยข้อมูลทางเคมีและทางชีวภาพ เพื่อให้ทราบถึงปริมาณสารสำคัญของสมุนไพรที่สามารถออกฤทธิ์ได้ดี ต้องสูญเสียเวลาอย่างมาก ไม่ว่าจะเป็นกระบวนการเตรียมตัวอย่าง ขั้นตอนที่ยุ่งยากซับซ้อน และอาจเกิดความคลาดเคลื่อนเนื่องจากผู้วิเคราะห์ (human error) อีกด้วย จะดีกว่าไหม? หากเราสามารถวิเคราะห์ข้อมูลสำคัญทั้งสองด้านภายในขั้นตอนเดียว ทำให้ประหยัดเวลา ลดการใช้สารรีเอเจนท์ที่มีราคาสูง ลดการเกิดของเสียจากห้องปฏิบัติการ แต่สามารถได้ข้อมูลดังกล่าวครบถ้วน อีกทั้งยังเพิ่มความสามารถของการวิเคราะห์ฤทธิ์ทางชีวภาพเป็นเชิงปริมาณแบบเฉพาะเจาะจง (individual analysis) ของสารสำคัญแต่ละชนิดอีกด้วย

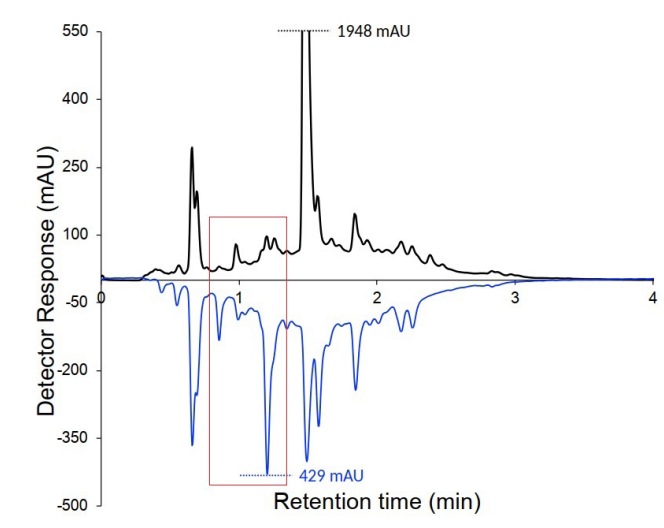
ปัจจุบันมีการใช้เทคนิค HPLC คู่ควบกับเทคนิค 'POST–COLUMN DERIVATIZATION' หรือ PCD เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพของการวิเคราะห์ฤทธิ์ทางชีวภาพในงานวิจัยด้านสมุนไพร เทคนิค post - column derivatization เป็นส่วนที่เกิดขึ้นภายหลังจากการแยกสารสำคัญด้วยคอลัมน์ โดยเมื่อคอลัมน์แยกสารสำคัญออกมาแล้ว สารดังกล่าวจะเข้าไปทำปฏิกิริยากับรีเอเจนท์ที่กำหนดไว้ เกิดเป็นอนุพันธ์ของสารสำคัญ แล้วจึงผ่านเข้าเครื่องตรวจวัด (detector) ส่วนใหญ่มักใช้ diode array detector (DAD) ผลที่ได้จากการวิเคราะห์คือความสามารถของฤทธิ์ทางชีวภาพของสารสำคัญนั้น ๆ ที่แยกได้ด้วยคอลัมน์ หากสารสกัดสมุนไพรมีสารสำคัญหลายชนิดก็สามารถทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพของสารแต่ละตัวได้ภายในการวิเคราะห์เพียงครั้งเดียว นอกจากนี้ PCD ยังสามารถนำมาประยุกต์ใช้กับการวิเคราะห์สารบางชนิดที่ไม่สามารถวิเคราะห์โดยตรงด้วย HPLC ได้ เช่น การวิเคราะห์ปริมาณเอมีน (amimes) ที่ไม่สามารถตรวจวัดโดยตรงได้ด้วย HPLC แต่เมื่อนำเทคนิค PCD มาใช้โดยให้เกิดปฏิกิริยากับ o-phthalaldehyde (OPA) หรือ fluorescamine reagents ก็สามารถตรวจวัดได้ด้วยเครื่องตรวจวัดชนิด fluorescence detector เป็นต้น PCD จึงเป็นทางออกที่ดีเยี่ยมต่อการเพิ่มประสิทธิภาพงานวิจัยด้านสมุนไพร ส่วนสำคัญของเทคนิค PCD นี้ประกอบด้วย ก) กระบวนการที่ทำให้เกิดสารอนุพันธ์ โดยทั่วไปจะเป็นการใช้รีเอเจนท์ทำปฏิกิริยาทางเคมีกับสารสำคัญ เกิดเป็นสารอนุพันธ์ที่สามารถตรวจวัดได้ด้วยเครื่องตรวจวัดชนิดต่าง ๆ ปฏิกิริยาที่ใช้ในเทคนิค PCD นี้เปรียบเสมือนหัวใจของ PCD เพราะเป็นการเพิ่มศักยภาพในการใช้ HPLC และยังเป็นการเพิ่ม sensitivity และ selectivity ของเทคนิคอีกทางหนึ่งด้วย ข) อุปกรณ์/เครื่องมือที่ใช้เพิ่มเติมจากระบบ HPLC ประกอบด้วย (1) ปั๊มแรงดันสูงเพื่อฉีดรีเอเจนท์เข้าไปในระบบ HPLC (2) mixer ทั่วไปจะใช้ Tee - หรือ X - pieces เพื่อเชื่อมต่อกับปั๊ม (1) เข้าสู่ระบบ และ (3) reaction coil เป็นส่วนที่รีเอเจนท์เกิดปฏิกิริยากับสารสำคัญที่ผ่านคอลัมน์ออกมาแล้ว เกิดเป็นสารอนุพันธ์แล้วเชื่อมต่อกับเครื่องตรวจวัด [2] รายละเอียดดังรูปที่ 1



ภาพที่ 1 *อุปกรณ์ของเทคนิค Post - column derivatisation [3]*

อย่างไรก็ตาม เทคนิค PCD ยังมีข้อจำกัดเช่นกัน ได้แก่ การเกิดปฏิกิริยาเพื่อให้ได้สารอนุพันธ์ ต้องมีอัตราการเกิดปฏิกิริยาที่รวดเร็ว ต้องไม่มีตะกอนจากการเกิดปฏิกิริยาที่จะส่งผลต่อระบบ HPLC ซึ่งหากเกิดตะกอนขึ้นในปฏิกิริยาอาจทำให้เครื่องตรวจวัดอุดตันได้ นอกจากนี้การต่ออุปกรณ์ PCD จะเป็นการเพิ่ม dead - volume ในระบบ HPLC ส่งผลให้พีกที่ได้มีความกว้างมากขึ้น (broadening peak) และสารผ่านคอลัมน์ออกมาล่าช้ากว่าการแยกด้วยเทคนิค HPLC (retention time มากขึ้น) เนื่องด้วยข้อจำกัดเหล่านี้ จึงมีการวิจัยและพัฒนาในส่วนของอุปกรณ์ดังกล่าวอย่างต่อเนื่อง ได้แก่ การใช้ reaction coil ที่มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางเล็กกว่า 5 มิลลิเมตร รวมไปถึงการพัฒนา mixer ให้มีขนาดเล็กลงปริมาตรภายในถึงระดับนาโนลิตร เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพของ sensitivity ในการเกิดปฏิกิริยา ทำให้ลด baseline noise และเพิ่ม signal-to-noise ratio อีกด้วย [4]

ตัวอย่างการใช้เทคนิค HPLC เทียบกับ HPLC–PCD โดยมีวัตถุประสงค์สำหรับการทดสอบแบบคัดกรอง (screening test) เพื่อหาสมุนไพรที่มีศักยภาพชนิดใหม่ ในการวิเคราะห์นี้ใช้ CUPRAC reagent เป็นรีเอเจนท์ในการทำให้เกิดสารอนุพันธ์ในการทดสอบสารต้านอนุมูลอิสระในตัวอย่างชาเขียว โดยใช้อัตราการไหล 4 มิลลิลิตร/นาที ผลการวิเคราะห์แสดงดังรูปที่ 2 โครมาโตแกรมด้านบนเป็นการใช้ HPLC-DAD ตรวจวัดที่ความยาวคลื่น 280 นาโนเมตร ในขณะที่โครมาโตแกรมด้านล่างเป็นการแสดงถึงฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสำคัญในตัวอย่างชาเขียว (การกลับภาพเพื่อเปรียบเทียบโครมาโตแกรมที่ได้จาก HPLC-PCD เท่านั้น) ด้วยการใช้ CUPRAC reagent แล้วตรวจวัดที่ความยาวคลื่น 450 นาโนเมตร เพื่อตรวจวัดชนิดและปริมาณสารต้านอนุมูลอิสระในตัวอย่างเดียวกัน จะเห็นได้อย่างชัดเจนว่าในช่วงนาทีที่ 1 มีหลายพีกที่แสดงปริมาณสารสำคัญเพียงเล็กน้อย แต่ในทางกลับกัน มีพีกที่แสดงฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระที่มีความสามารถอย่างโดดเด่นในบริเวณดังกล่าว [5]



ภาพที่ 2 *โครมาโตแกรมของการใช้เทคนิค HPLC เทียบกับ HPLC-PCD ในตัวอย่างชาเขียว [5]*

ดังนั้น เทคนิค PCD นี้เป็นเทคนิคที่มีประสิทธิภาพอย่างยิ่งสำหรับการประยุกต์ใช้กับงานวิจัยด้านสมุนไพร และยังสามารถพัฒนาต่อยอดเพื่อใช้ในการวิเคราะห์เชิงปริมาณได้อีกด้วย กลุ่มวิจัยและพัฒนาสมุนไพร กองเทคโนโลยีชุมชน กรมวิทยาศาสตร์บริการ จึงเล็งเห็นว่าการนำเทคนิคนี้มาใช้จะช่วยให้สามารถคัดเลือกชนิดของสมุนไพร ตลอดจนสารสำคัญที่มีศักยภาพ ซึ่งเป็นการต่อยอดงานวิจัยให้สามารถใช้ประโยชน์ได้อย่างกว้างขวางมากขึ้น

บรรณานุกรม

1. Camenzuli M., Ritchie H.J., Dennis G.R. and Shalliker R.A. (2013) Reaction flow chromatography for rapid post column derivatisations: The analysis of antioxidants in natural products, *J. Chromatogr. A,* 1303, 62-65. [https://doi.org/10.1016/j.chroma. 2013.06.046]
2. Constantinos K.Z. and Paraskevas D.T. (2013) Liquid chromatography coupled to on-line post column derivatization for the determination of organic compounds: A review on instrumentation and chemistries, Anal. *Chimica Acta,* 798, 1-24. [https://doi.org/10.1016/ j.aca. 2013.07.032]
3. Pisoschi A.M. and Negulescu G.P. (2011) Methods for Total Antioxidant Activity Determination: A Review, *Biochem & Anal Biochem,* 1:106. [doi:10.4172/2161-1009.1000106]
4. Postolia T. and Paraskevas D.T. (2024) High performance liquid chromatography coupled with post – Column derivatization methods in food analysis: Chemistries and applications in the last two decades, *Food Chem.,* 443, 138577. [https://doi.org/10.1016/ j.foodchem. 2024. 138577]
5. Suktham T., Jones A., Acquaviva A., Dennis G.R., Shalliker R.A. Soliven A. (2020) Better than bench top. High speed antioxidant screening via the cupric reducing antioxidant capacity reagent and reaction flow chromatography, *Microchem. J.,* 152, 104348. [https://doi. org/ 10.1016/j.microc.2019.104348]