HYPHENATED TECHNIQUES OF ANALYTICAL INSTRUMENTS IN NATURAL PRODUCT RESEARCH

Onoomar Poobrasert [*] ***Malai Satirapun***

Department of Pharmaceutical Chemistry. Faculty of Pharmacy. Silpakorn University. Nakhon-Pathom

Abstract

Hyphenated techniques are the coupling of two or more analytical instruments together through appropriate interfaces. The instruments coupled could be between those performing chromatographic separations or with those providing spectroscopic data. Hyphenated techniques enable compounds to be detected more effectively from mixtures with small amount without prior purification. This article reviews the application of hyphenated techniques in natural product research.

Keywords: hyphenated techniques, chromatography, spectroscopy, natural products

[*]To whom correspondence should be addressed. E-mail: onoomar@email.pharm.su.ac.th, Tel. 0 3425 5800, Fax. 0 3425 5801

เทคนิคคู่ต่อเครื่องมือวิเคราะห์ในงานวิจัยทางผลิตภัณฑ์ธรรมชาติ

อรอุมา ภู่ประเสริฐ มาลัย สถิรพันธุ์*

ภาควิชาเภสัชเคมี คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยศิลปากร นครปฐม

บทคัดย่อ

เทคนิคคู่ต่อเครื่องมือวิเคราะห์เป็นการนำเครื่องมือที่ใช้ในการวิเคราะห์ตั้งแต่ 2 เครื่องขึ้นไปมาต่อกันโดยอาศัยส่วนต่อประสานที่เหมาะสม เครื่องมือที่นำมาคู่ต่อกันอาจจะเป็นเครื่องมือทางโครมาโทกราฟีด้วยกัน หรือเครื่องมือทางโครมาโทกราฟีกับเครื่องมือทางสเปกโทรสโกปี ทำให้การตรวจหาสารที่อยู่ในของผสมกระทำได้อย่างรวดเร็ว ใช้สารปริมาณน้อย และไม่จำเป็นต้องอยู่ในรูปของสารบริสุทธิ์ บทความนี้นำเสนอเทคนิคคู่ต่อของเครื่องมือวิเคราะห์ชนิดต่างๆที่นิยมใช้ในปัจจุบัน เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพงานวิจัยทางด้านผลิตภัณฑ์ธรรมชาติ

คำสำคัญ: เทคนิคคู่ต่อ โครมาโทกราฟี สเปกโทรสโกปี ผลิตภัณฑ์ธรรมชาติ

บทนำ

การคู่ต่อ (coupling) เครื่องมือวิเคราะห์ หรือ Hyphenated techniques เป็นการนำเครื่องมือที่ใช้ในงานวิเคราะห์ตั้งแต่ 2 เครื่อง หรือ 2 ชนิดขึ้นไปมาต่อกัน อาจจะเป็นเครื่องมือทางโครมาโทกราฟีด้วยกัน เช่น เครื่องโครมาโทกราฟีชนิดแก๊ส (Gas Chromatography, GC) 2 เครื่องต่อกันเป็น GC-GC หรือ เครื่องมือทางโครมาโทกราฟีกับเครื่องมือทางสเปกโทรสโกปี เช่น เครื่องโครมาโทกราฟีชนิดแก๊สคู่ต่อกับเครื่องสเปกโทรมิเตอร์ชนิดมวล (Mass Spectrometer, MS) เป็น GC-MS โดยอาศัยส่วนต่อประสาน (interface) ที่เหมาะสมทำให้สารที่ออกจากเครื่องมือวิเคราะห์เครื่องที่หนึ่งสามารถผ่านเข้าสู่เครื่องมือวิเคราะห์เครื่องที่สอง เพื่อทำการวิเคราะห์ข้อมูลเพิ่มเติมได้ทันที[1] เทคนิคคู่ต่อที่นิยมนำมาใช้ในปัจจุบัน ได้แก่ GC-MS LC-MS (Liquid Chromatography- Mass Spectrometry) LC-NMR (Liquid Chromatography- Nuclear Magnetic Resonance Spectrometry) LC-NMR-MS (Liquid Chromatography- Nuclear Magnetic Resonance Spectrometry- Mass Spectrometry) นอกจากนี้ยังมีการคู่ต่อเครื่องมือวิเคราะห์อื่นๆ ที่อยู่ในระหว่างการพัฒนาส่วนต่อประสานที่เหมาะสมเพื่อให้สามารถนำมาใช้งานได้ ทั้งในด้านการวิเคราะห์ปริมาณและคุณภาพ โดยเฉพาะการวิเคราะห์หาปริมาณของสาร (assay) และการอธิบายโครงสร้าง (structure

* ติดต่อได้ที่ *onoomar@email.pharm.su.ac.th* โทรศัพท์ 0 3425 5800 โทรสาร 0 3425 5801

elucidation) ของสารบริสุทธิ์ ที่อยู่ในส่วนผสมต่างๆ เช่น สารสกัดจากพืช ทำให้การวิเคราะห์ปริมาณ และการอธิบายโครงสร้างทางเคมีขององค์ประกอบต่างๆ ในของผสมหรือสารสกัดที่มีความซับซ้อนเป็นไปอย่างง่ายดาย รวดเร็ว และสามารถตรวจหาสารทั้งที่ทราบโครงสร้างแล้วหรืออธิบายโครงสร้างของสารใหม่ได้โดยไม่จำเป็นต้องแยกสารให้เป็นสารบริสุทธิ์ก่อน

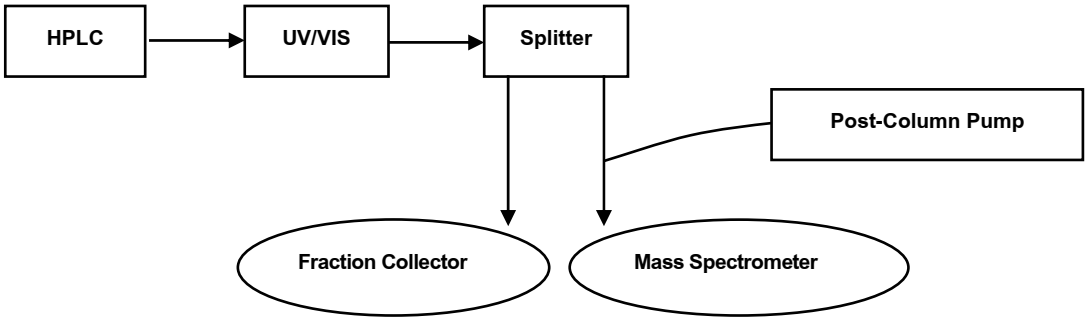
บทความนี้นำเสนอตัวอย่างการประยุกต์ใช้เทคนิคคู่ต่อเครื่องมือวิเคราะห์ ในการตรวจคัดทางเคมี การศึกษาทางเคมีอนุกรมวิธาน และการศึกษาวิจัยทางด้านพฤกษเคมีและผลิตภัณฑ์ธรรมชาติ เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพของกระบวนการค้นหาสารจากธรรมชาติในการพัฒนาเป็นยา

การประยุกต์ใช้เทคนิคคู่ต่อเครื่องมือวิเคราะห์ในการตรวจคัดทางเคมีเพื่อป้องกันการทำซ้ำ

ในการศึกษาทางด้านพฤกษเคมีและผลิตภัณฑ์ธรรมชาติ ขั้นตอนการตรวจคัดทางเคมี หรือ Dereplication เป็นกระบวนการเบื้องต้นในการป้องกันการทำซ้ำ ซึ่งหมายถึงการป้องกันไม่ให้มีการค้นหาสารบริสุทธิ์ซ้ำกับสารที่เคยมีผู้ศึกษามาก่อน ทำให้การศึกษาทางพฤกษเคมีรวดเร็วขึ้น สามารถระบุได้ว่าในสารสกัดที่สนใจมีสารใดอยู่บ้างเป็นการเบื้องต้น อาจเป็นสารใหม่ที่ไม่เคยมีรายงานมาก่อน หรือเป็นสารที่เคยมีผู้รายงานไว้แล้ว โดยไม่ต้องเสียเวลา และงบประมาณในการแยกสารบริสุทธิ์แต่ละตัวออกจากสารสกัด ก่อนที่จะนำมาศึกษาโครงสร้างทางเคมีเพื่อให้ทราบว่าเป็นสารใด ทำให้สามารถตัดสินใจได้อย่างรวดเร็วขึ้นว่าควรทำการศึกษาสารสกัดนั้นต่อไปหรือไม่

ขั้นตอนอย่างง่ายในการทำ dereplication ประกอบด้วย การแยกสาร การรวบรวมข้อมูล และการวิเคราะห์ข้อมูล ซึ่งอาจแสดงเป็นแผนภูมิอย่างง่ายใน รูปที่ 1

เทคนิคคู่ต่อที่นิยมนำมาใช้ในการทำ dereplication เพื่ออธิบายโครงสร้างทางเคมีภายหลังการตรวจพบสารที่ถูกชะจากเครื่องโครมาโทกราฟีชนิดของเหลวสมรรถนะสูง (HPLC) ด้วย UV-Vis diode-array spectrometer ก็คือ LC-MS ซึ่งจะมีส่วนต่อประสานที่ทำให้ตัวอย่างซึ่งอยู่ในสถานะของเหลวที่ผ่านจาก HPLC เปลี่ยนเป็นไอออนก่อนผ่านเข้าสู่เครื่องสเปกโทรมิเตอร์ชนิดมวล โดยสารสกัดที่ถูกชะผ่าน HPLC และ UV-Vis diode-array spectrometer จะผ่านเข้าสู่ตัวแยก (splitter) ซึ่งจะทำการแยกสารที่ถูกชะออกเป็น 2 ส่วน ส่วนหนึ่ง (ประมาณร้อยละ 90) ถูกเก็บไว้ในหลุมทดสอบ (เช่น 96-well plate) สำหรับนำไปทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพ อีกส่วนหนึ่ง (ร้อยละ 10) ถูกนำไปผ่าน MS ซึ่งเมื่อเสร็จสิ้นกระบวนการ จะปรากฏข้อมูลของสารสกัดแต่ละตัว ดังนี้ สเปกตรัมของ UV-Vis สเปกตรัมชนิดมวล (ทั้งไอออนบวกและลบ) และผลการทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพ ในการประมวลผลต้องอาศัยฐานข้อมูลต่างๆ เช่น NAPRALERT (Natural Product Alert) Chemical Abstracts Medline ฯลฯ ซึ่งจะให้ข้อมูลที่มีผู้รายงานไว้เกี่ยวกับสารบริสุทธิ์ต่างๆ ที่พบในพืชซึ่งอยู่ในสปีชีส์หรือสกุลเดียวกันกับพืชที่ทำการศึกษา ทำให้ทราบว่าสารสกัดที่นำมาศึกษาควรจะมีสารใดอยู่บ้าง เหมือนหรือแตกต่างจากที่เคยมีรายงานไว้ และสมควรศึกษาต่อไปหรือไม่

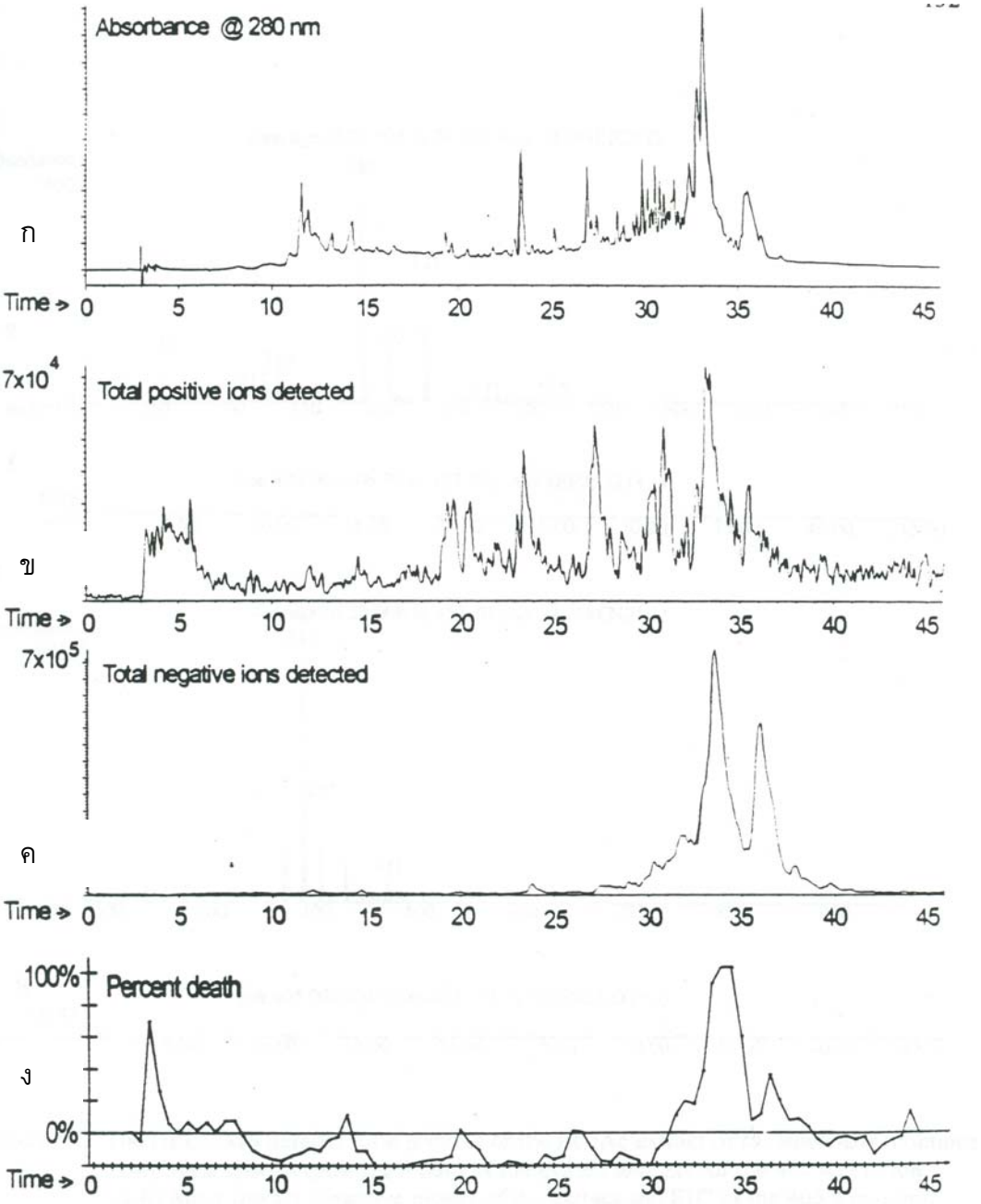


รูปที่ 1 แผนภูมิแสดงขั้นตอนการทำ dereplication[2]

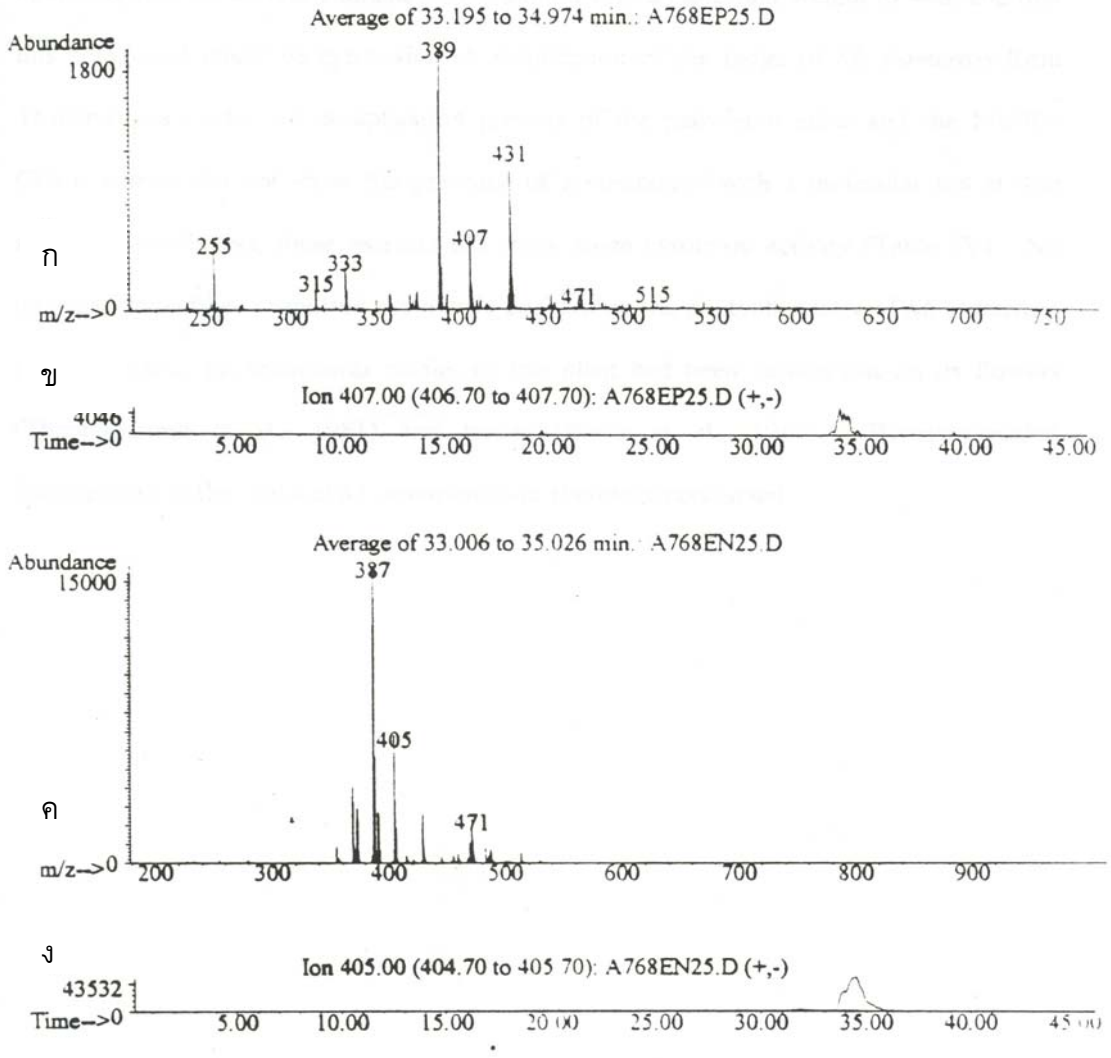
ในการประยุกต์ใช้ LC-MS สิ่งที่ต้องคำนึงถึง คือ ความสามารถในการทำให้สารที่สนใจเกิดการแตกตัวได้ในวัฏภาคเคลื่อนที่ที่ใช้อยู่ใน LC ดังนั้นการเลือกวัฏภาคเคลื่อนที่ที่เหมาะสมต่อทั้งการแยกสาร และการทำให้เกิดการแตกตัวของสารที่สนใจจึงเป็นปัจจัยที่สำคัญ มิฉะนั้นวัฏภาคเคลื่อนที่ที่มีส่วนผสมของสารที่ไม่สามารถระเหยได้ (non-volatile components) จะปนเปื้อนเข้าสู่แหล่งกำเนิดไอออน เช่น ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ที่นิยมใช้ใน LC จะไม่สามารถใช้กับ LC-MS ได้

ตัวอย่างการทำ dereplication ของสารสกัดจากต้นสารภี (*Mammea siamensis* (Miq.) T. Anders)[3] เมื่อนำสารสกัดหยาบเมทานอลไปผ่าน LC-MS จะแสดงข้อมูลของสารสกัดที่ผ่านออกจาก HPLC ณ เวลาต่างๆ ได้แก่ ค่าการดูดกลืนแสงของสารสกัดที่ความยาวคลื่น 280 นาโนเมตร (รูปที่ 2ก) ปริมาณไอออนบวกและลบ (รูปที่ 2ข และ 2ค) และความเป็นพิษต่อเซลล์ทดสอบ ZR-75-1 (รูปที่ 2ง) ซึ่งข้อมูลดังกล่าวทำให้ทราบว่าปริมาณไอออนบวกและลบที่ออกมาจากสารสกัดที่เวลาประมาณ 34 นาที น่าจะมีฤทธิ์ทำให้เกิดการตายของเซลล์ทดสอบ และเมื่อพิจารณาไอออนที่ผ่าน MS ณ เวลานั้น จะพบว่าเป็นของสารที่มีมวล 407 ใน positive mode (รูปที่ 3ก และ 3ข) หรือ 405 ใน negative mode (รูปที่ 3ค และ 3ง) ซึ่งแสดงว่าสารที่มีมวลโมเลกุล 406 อาจมีฤทธิ์ทำให้เซลล์ตาย จากนั้นนำข้อมูลนี้ไปตรวจสอบกับข้อมูลที่มีอยู่ เพื่อประกอบการตัดสินใจในการศึกษาต่อไป โดยไม่จำเป็นต้องทำการแยกสารให้ได้สารบริสุทธิ์ก่อนตามวิธีดั้งเดิม

นอกจากนี้การทำ dereplication อาจใช้เทคนิคคู่ต่อ LC-MS/NMR (LC-MS/ Nuclear Magnetic Resonance Spectrometer) ซึ่งเป็นการผนึกความสามารถในการวิเคราะห์สารด้วยเครื่อง LC-MS และ LC-NMR เข้าด้วยกัน โดยสารประมาณ 90-95 % จาก LC จะผ่านเข้าสู่ NMR (ซึ่งเป็นเครื่องมือที่ไม่ทำลายโครงสร้างของสาร) และที่เหลือผ่านเข้าสู่ MS (ซึ่งเป็นเครื่องมือที่ทำลายโครงสร้างของสาร) โดยสามารถทำการวิเคราะห์สารด้วย NMR และ MS ไปพร้อมๆ กันได้[4] ปัจจุบันการใช้ LC-MS/NMR ส่วนใหญ่จะเป็นระบบ "stop-flow"[5] ที่สามารถเก็บข้อมูลของ NMR แบบสองมิติได้ด้วย ทำให้สามารถทำนายโครงสร้างของสารได้อย่างรวดเร็ว และพบว่าการใช้ LC-MS/NMR มีข้อเหนือกว่า LC-NMR ตรงที่สามารถตรวจพบสารที่ไม่สามารถตรวจพบด้วย LC-NMR ได้ เช่น การพบ ecdysteroids ตัวใหม่ใน *Silene otites* Sm.[5] นอกจากนี้ยังสามารถใช้ในการศึกษาทางพฤกษเคมี เช่น การพบแอลคาลอยด์ 9 ตัวในพืชสกุล *Litsea* จากไต้หวัน โดยใช้สารสกัดน้อยกว่าการศึกษาตามปกติถึง 50 เท่า และใช้เวลาสั้นกว่า[5]



รูปที่ 2 โครมาโทแกรมของ HPLC-MS ที่ได้จากการทำ dereplication ของสารสกัดจากต้นสารภี ก. ค่าการดูดกลืนแสงที่ 280 นาโนเมตร ข. Total positive ions ค. Total negative ions ง. ร้อยละการตายของเซลล์ ZR-75-1[3]



รูปที่ 3 HPLC-MS ของสารสกัดจากต้นสารภี ก. สเปกตรัมชนิดมวลที่เวลาประมาณ 33-35 นาที (positive mode) ข. EIC ของมวลที่ 407 a.m.u. ค. สเปกตรัมชนิดมวลที่เวลาประมาณ 33-35 นาที (negative mode) ง. EIC ของมวลที่ 405 a.m.u.[3]

การประยุกต์ใช้เทคนิคคู่ต่อเครื่องมือวิเคราะห์ในการศึกษาทางเคมีอนุกรมวิธาน

GC-MS เป็นการคู่ต่อเครื่องมือที่ใช้ในการศึกษาเกี่ยวกับสารที่ระเหยได้ โดยหลักของการคู่ต่อ GC กับ MS คือการผ่านสารที่ต้องการวิเคราะห์ซึ่งอยู่ในวัฏภาคเคลื่อนที่ของ GC และสามารถระเหยได้ภายใต้อุณหภูมิของคอลัมน์ (ไม่เกิน 400°C) เข้าสู่สภาพสุญญากาศของ MS ซึ่งโดยส่วนใหญ่ในการศึกษาเกี่ยวกับผลิตภัณฑ์ธรรมชาติ GC-MS จะเหมาะสมสำหรับการวิเคราะห์หาสารในกลุ่มน้ำมันหอมระเหย (essential oil) ซึ่งระเหยง่ายและเสถียรต่ออุณหภูมิในการวิเคราะห์ นอกจากนี้การทำอนุพันธ์ของสาร (derivatization) เพื่อเพิ่มความสามารถในการระเหยก็ช่วยให้สามารถวิเคราะห์สารบางกลุ่มได้

การนำ GC-MS มาใช้ในการศึกษาทางด้านอนุกรมวิธานของพืช จากการรวบรวมของ Kite และคณะ[6] พบว่าพืชในตระกูลถั่ว (Legume) แม้จะพบน้ำมันหอมระเหยไม่มากนัก แต่จะพบ quinolizidine alkaloids กว่า 200 ชนิด ซึ่งเป็นแอลคาลอยด์หลักที่ผลิตโดยพืชในวงศ์นี้ โดยโครงสร้างของ quinolizidine ring ที่สามารถระเหยและวิเคราะห์ได้ด้วย GC-MS ทำให้การพิสูจน์ทราบโครงสร้างของสารในกลุ่มนี้ทำได้รวดเร็วขึ้นกว่าการใช้วิธีเดิม ที่ต้องผ่านกระบวนการทำให้ได้สารบริสุทธิ์แต่ละตัวก่อนที่จะนำมาอธิบายโครงสร้างทางเคมีของสารได้ การนำสารสกัดจากพืชจำนวนเล็กน้อยมาผ่านการทำให้บริสุทธิ์บางส่วนแล้วผ่านเข้าสู่เครื่อง GC-MS จะได้ข้อมูลเกี่ยวกับมวลของสาร ซึ่งเมื่อนำไปเปรียบเทียบกับสเปกตรัมชนิดมวล และลักษณะการแตกกระจายของไอออน (fragmentation) ของสารในกลุ่มนี้ตามที่เคยมีผู้รายงานไว้ ทำให้สามารถตรวจพบ quinolizidine alkaloids บางตัวในพืชสกุลที่ไม่เคยมีรายงานมาก่อน หรือในกรณีที่ GC-MS ไม่สามารถตรวจพบ quinolizidine alkaloids ในพืชสกุลที่ควรพบตามวิธีการจัดแบบเดิม ทำให้ต้องมีการจัดอนุกรมวิธานใหม่ เมื่อมีข้อมูลทางด้านเคมีอนุกรมวิธานมาสนับสนุนเพิ่มขึ้น นอกจากนี้ GC-MS ยังเป็นเครื่องมือสำคัญที่ช่วยในการรวบรวมข้อมูลเกี่ยวกับการกระจายตัวของ quinolizidine alkaloids ที่พบในพืชต่างๆ เพื่อช่วยในการศึกษาทางด้านวิวัฒนาการชาติพันธุ์ (phylogeny) ของพืชในตระกูลนี้และยังทำให้การศึกษาทางด้านเคมีอนุกรมวิธานมีความซับซ้อนน้อยลง

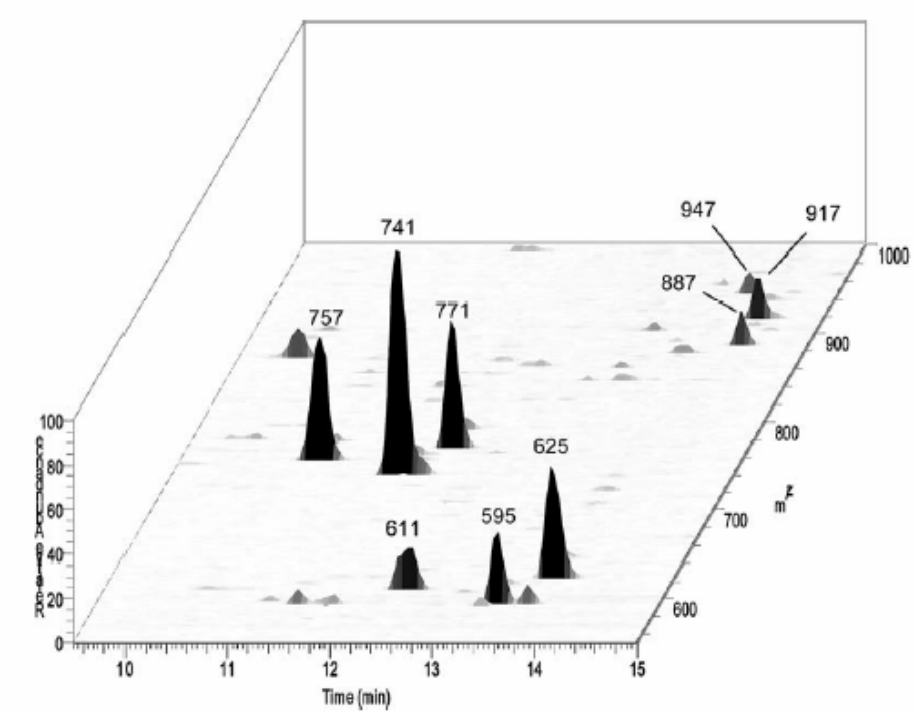
การประยุกต์ใช้เทคนิคคู่ต่อเครื่องมือวิเคราะห์ในการศึกษาทางด้านพฤกษเคมี

นอกจากการนำ GC-MS มาใช้ในการวิเคราะห์หาองค์ประกอบทางเคมีของสารที่สามารถระเหยได้และไม่สลายตัวง่ายด้วยความร้อน เช่น น้ำมันหอมระเหย และสารกลุ่ม quinolizidine alkaloids ในพืชแล้ว ยังสามารถวิเคราะห์สารที่ถูกทำอนุพันธ์เพื่อช่วยให้ระเหยได้ด้วย เช่น polyhydroxyalkaloids และ hydroxypipecolic acid ในพืชตระกูลถั่ว[6] ซึ่งจะถูกทำให้เป็นอนุพันธ์ของ trimethylsilyl ในกรณีที่ต้องการยืนยันมวลโมเลกุลอาจใช้แหล่งกำเนิดไอออนแบบ chemical ionization (CI) เนื่องจากถ้าใช้แบบ electron impact (EI) อาจทำให้ไม่พบไอออนโมเลกุล (Molecular ion) ได้

LC-MS เป็นเทคนิคคู่ต่ออีกเทคนิคหนึ่งที่ถูกนำมาใช้ในงานวิเคราะห์ทางพฤกษเคมีมากขึ้น เนื่องจากมีการพัฒนาอย่างต่อเนื่องให้มีความสะดวกในการใช้งาน ส่วนต่อประสานที่นิยมใช้ในปัจจุบันคือ Electrospray (ES) และ Atmospheric pressure chemical ionization (APCI) ทั้งสองชนิดเป็น soft ionization และทำให้เกิดไอออนโมเลกุลแบบ $[M+H]^+$ $[M+Na]^+$ หรือ $[M-H]^-$ โดยที่ ES เป็นตัวเลือกอันดับหนึ่งเหมาะกับทั้งชีวโมเลกุลขนาดใหญ่และโมเลกุลขนาดเล็กทั่วไป สเปกตรัมชนิดมวลที่ได้จะให้ข้อมูลด้านมวลโมเลกุล แต่มักขาดข้อมูลด้านโครงสร้างของโมเลกุล ส่วน APCI เป็นส่วนต่อประสานทางเลือก ใช้กับโมเลกุลที่มีขั้วน้อยกว่า ระเหยได้ดีกว่า และทำให้เกิดการแตกกระจายของไอออนโมเลกุลมากกว่า ทำให้ได้ข้อมูลด้านโครงสร้างโมเลกุลมากกว่า ในการศึกษาโครงสร้างของโมเลกุล จะต้องทำให้ไอออนโมเลกุลที่สนใจเกิดการแตกกระจายมากขึ้น เพื่อพิจารณาลักษณะของการแตกกระจาย สามารถทำได้ด้วยเทคนิคที่เรียกว่า Collision-induced decomposition (CID) โดยการแยกไอออนโมเลกุลที่สนใจด้วย

LC-MS ถูกนำมาใช้ในการวิเคราะห์สารประกอบพวกฟลาโวนอยด์ (flavonoids) อัลคาลอยด์ (alkaloids) และกรดอะมิโนที่ไม่ใช่โปรตีน (non-protein amino acids) ในพืชตระกูลถั่วได้อย่างง่ายดาย และสามารถทำนายการเกิดไอออนทั้งจาก ES และ APCI โดยที่สารกลุ่มฟลาโวนอยด์และสารประกอบฟีนอลอื่นๆ สามารถทำการวิเคราะห์ได้ด้วยคอลัมน์ C18 reverse phaseที่มีวัฏภาคเคลื่อนที่เป็นโปรแกรมเกรเดียนท์ระหว่างน้ำกับเมทานอลหรืออะซีโตไนไตรล์ ภายใต้สภาวะที่เป็นกรด และยังสามารถคัดกรองฟลาโวนอยด์กลุ่มที่ไม่สามารถตรวจพบได้บ่อยอีกด้วย เช่น ไอโซฟลาโวนอยด์ (isoflavonoids) และ นีโอฟลาโวนอยด์ (neoflavonoids)[6]

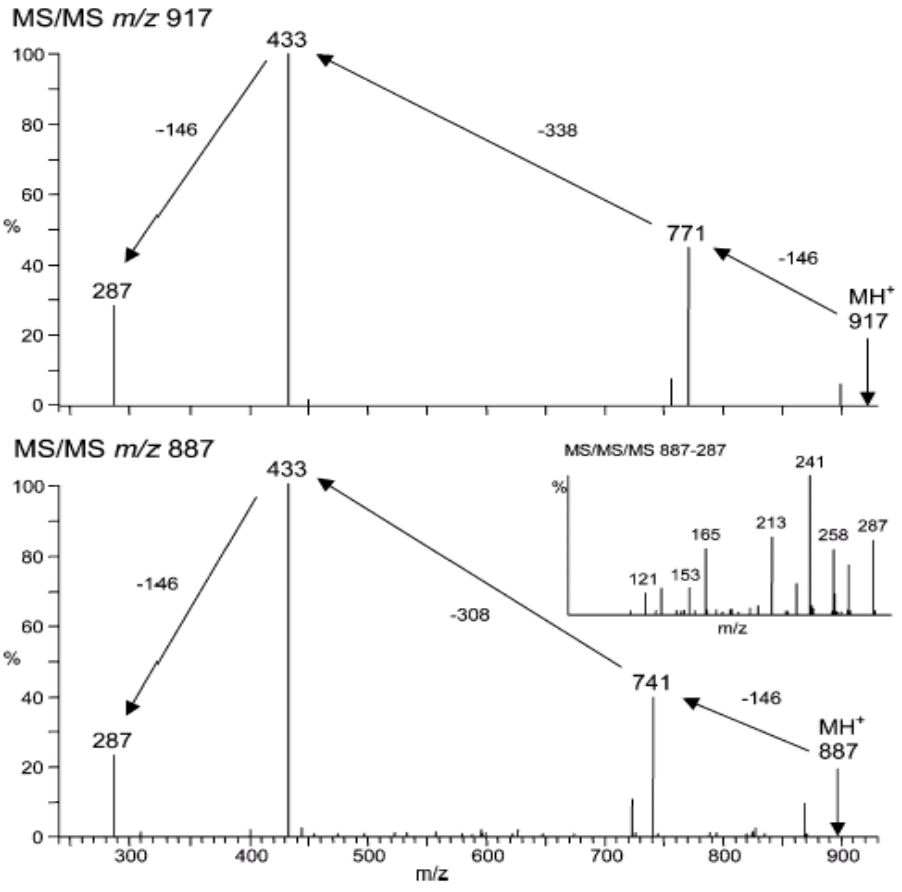
ในอดีตการวิเคราะห์ฟลาโวนอยด์ซึ่งมักอยู่ในรูปของฟลาโวนอยด์ไกลโคไซด์จะตรวจหาได้เฉพาะส่วนของอะไกลโคน (aglycone) โดยต้องนำไกลโคไซด์มาไฮโดรไลซ์ก่อน การใช้ LC-ES-MS จะสามารถวิเคราะห์ฟลาโวนอยด์ในรูปของฟลาโวนอยด์ไกลโคไซด์ได้เลยโดยไม่ต้องผ่านการทำให้บริสุทธิ์หรือไฮโดรไลซ์ และมีความเหมาะสมเป็นอย่างยิ่งเนื่องจากสารที่ถูกชะจะกลายเป็นไอออนโดยมีการแตกกระจายน้อยมาก ดังนั้นฟลาโวนอยด์ที่ออกมาพร้อมกันแต่มีมวลต่างกันจะถูกตรวจพบได้จากโครมาโทแกรมสามมิติ ซึ่งมีค่า *m/z* ในมิติที่สามต่างกัน ดังรูปที่ 4 ซึ่งแสดงฟลาโวนอยด์ไกลโคไซด์จากสารสกัดหยาบของใบพืชตระกูลถั่ว ซึ่งถูกชะออกมาพร้อมกันแต่มีมวลโมเลกุลต่างกันคือมีค่า 887 และ 917 a.m.u. ในขณะที่การใช้ APCI ซึ่งเกิดการแตกกระจายของไอออนโมเลกุลบางส่วนอาจทำให้เกิดการสับสนในการแปรผลสำหรับสารที่ถูกชะออกมาในเวลาเดียวกันได้ ในขณะที่การใช้เทคนิค CID ในเครื่องวิเคราะห์มวลชนิดแทนเดม (MS/MS) มาช่วยทำให้เกิดการแตกกระจายของไอออนโมเลกุลไกลโคไซด์ จะช่วยในการหาลำดับการหลุดออกของน้ำตาลในฟลาโวนอยด์ไกลโคไซด์ได้ ทำให้สามารถทราบทั้งจำนวนและชนิดของน้ำตาลหรือสารประกอบอื่นๆที่มีอยู่ได้ ดังรูปที่ 5 ซึ่งเป็นสเปกตรัมชนิดมวลของมวลที่ 887 และ 917 a.m.u. ที่กล่าวถึงในรูปที่ 4 การสูญเสียมวลที่ 146 308 และ 338 a.m.u. แสดงกลุ่มของ rhamnosyl, cinnamoylhexoyl และ feruloylhexosyl ตามลำดับ นอกจากนั้นการทำให้ไอออนอะไกลโคนที่เหลืออยู่เกิดการแตกกระจายด้วย CID ก็จะได้สเปกตรัมชนิดมวลซึ่งนำไปเปรียบเทียบกับฐานข้อมูลเพื่อการพิสูจน์เอกลักษณ์อะไกลโคนได้ต่อไป ในการพิสูจน์เอกลักษณ์เฉพาะอะไกลโคน การใช้ ES เป็นส่วนต่อประสานจะต้องใช้เครื่องวิเคราะห์มวลชนิด MS/MS/MS ส่วนการใช้ APCI ซึ่งทำให้เกิดไอออนลูก หรือไอออนย่อยอยู่แล้วอาจใช้เพียง MS/MS นอกจากนี้ยังมีการนำ HPLC-DAD-MS (HPLC-Diode Array Detector-MS) มาใช้ในการศึกษาทั้งชนิดและปริมาณของไอโซฟลาโวนอยด์ใน *Astragalus membranaceus* (Fisch. ex Link) Bge. โดยการเตรียมสารสกัดด้วยการใช้ matrix solid-phase dispersion (MSPD) แล้วเปรียบเทียบกับการสกัดด้วยการใช้ ultrasonic และเครื่อง Soxhlet พบว่าการสกัดและการวิเคราะห์ทั้งเชิงคุณภาพ (โดยการเปรียบเทียบสเปกตรัมของ UV กับสารมาตรฐานและการเปรียบเทียบมวล) และเชิงปริมาณด้วยวิธีนี้สามารถตรวจพบไอโซฟลาโวนอยด์ที่มีอยู่ในพืชต้นนี้ได้[7]



ในการศึกษาทางด้านพฤกษเคมี บางครั้งการแยกสกัดสารบริสุทธิ์ออกจากผลิตภัณฑ์ธรรมชาติต้องอาศัยเครื่องมือหลายชนิดประกอบกัน ตัวอย่างเช่นการศึกษาพืชน้ำจืด *Potamogeton lucens* L. โดยการใช้ LC-UV-MS (ประกอบด้วย LC-UV-DAD และ LC-APCI-MS) ทำให้พบ *ent*-labdane glycosides 2 ตัว และกรดไขมัน 1 ตัว โดยการเปรียบเทียบสเปกตรัมของ UV และสเปกตรัมชนิดมวลกับสารที่เคยพบจาก *Potamogeton* สปีชีส์อื่น และยังอาศัย on-flow LC-NMR ช่วยในการอธิบายโครงสร้างของสารที่ไม่เคยพบในสปีชีส์อื่นมาก่อน นอกจากนี้ยังใช้ GC-MS ในการพิสูจน์เอกลักษณ์ของกรดไขมันที่เคยพบมาก่อนแล้ว[8]

การประยุกต์ใช้ LC-MS และ LC-NMR มีความสำคัญอย่างมากในการวิเคราะห์สารสกัดจากพืช ทำให้การพิสูจน์โครงสร้างของสารบริสุทธิ์ในสารสกัดเป็นไปอย่างรวดเร็ว ประหยัดเวลา และใช้สารในปริมาณน้อย ทำให้การค้นหาสารที่สนใจ (โดยเฉพาะสารใหม่ที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพ) เป็นไปอย่างมีประสิทธิภาพ เนื่องจากสามารถตรวจคัดทางเคมีไปได้พร้อมๆ กับการทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพของสาร[9-11] การตรวจคัดทางเคมีในที่นี้หมายถึงการพิสูจน์โครงสร้างของสารเพื่อแยกความแตกต่างระหว่างสารที่เคยมีการค้นพบมาแล้ว (ซึ่งก็คือการทำ dereplication นั่นเอง) กับสารใหม่ที่มีอยู่ในสารสกัด ตัวอย่างการประยุกต์ใช้ LC-MS และ LC-NMR เช่น การพบสารกลุ่มต่างๆ ของพืชหลายตัวในสกุล Gentianaceae[6,9] การค้นพบสารบริสุทธิ์ 9 ตัวที่มีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรียใน *Vernonia fastigiata* Oliver & Hiern โดยไม่ต้องทำการแยกสารแต่ละตัวออกมาก่อน[6]

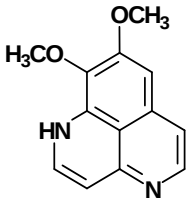
นอกจากนี้เมื่อนำ LC-NMR มาประกอบการทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพของสารสกัดที่ได้ตามหลักการของ Bioassay-Directed Fractionation ยังทำให้กระบวนการค้นหายาจากผลิตภัณฑ์ธรรมชาติเป็นไปอย่างรวดเร็ว โดยการเตรียมห้องสมุดของสารสกัดจากพืชที่ได้จากการใช้เทคนิคต่างๆ นำมารวมกันเป็นระบบอัตโนมัติ เช่น flash chromatography solid-phase extraction preparative HPLC แล้วเก็บส่วนของสารสกัดไว้ในหลุมทดสอบขนาด 96 หรือ 384 หลุม ซึ่งในแต่ละหลุมจะประกอบด้วยสารประมาณ 1-5 ตัวปนกันอยู่ ซึ่งส่วนหนึ่งจะถูกนำไปผ่าน LC-MS (หรือใช้ Evaporative Light Scattering Detector, ELSD เป็นเครื่องตรวจสอบมวล) เพื่อหาน้ำหนักโมเลกุลและปริมาณสาร และอีกส่วนหนึ่งจะถูกนำไปทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพ จากนั้นนำส่วนของสารสกัดที่แสดงฤทธิ์ทางชีวภาพไปทำให้บริสุทธิ์ในระดับไมโครกรัม แล้วทดสอบฤทธิ์อีกครั้งหนึ่งเพื่อยืนยันผลและอธิบายโครงสร้างทางเคมีโดยอาศัย LC-NMR ต่อไป ตัวอย่างเช่น การเตรียมห้องสมุดของสารสกัดจากเปลือกของ *Taxus brevifolia* Nutt. ที่สถาบันมะเร็งแห่งชาติของสหรัฐอเมริกา พบสารที่เป็นยารักษามะเร็งหลายตัวจากการใช้วิธีนี้ ซึ่งในขั้นตอนของสารสกัดที่ได้จาก flash chromatography จะยังไม่แสดงฤทธิ์นี้[11]



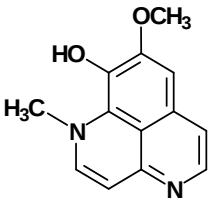
เทคนิค LC-NMR ยังถูกนำไปใช้ในการศึกษาเกี่ยวกับผลิตภัณฑ์ธรรมชาติทางทะเล (Marine Natural Products) เช่น การพบอัลคาลอยด์ aaptamine จากปะการัง *Aaptos* sp. ที่เก็บได้จากชายฝั่งทะเลในประเทศอินโดนีเซีย[12] โดยอาศัย LC-MS และ stop-flow LC-NMR ซึ่งจากการผ่าน LC-MS พบว่าสารที่มีมวลโมเลกุลเท่ากับ 228 a.m.u. ซึ่งผ่านออกจาก LC-MS ที่เวลา 10.3 นาที เป็นสารที่แสดงฤทธิ์ในการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ GFAT (glutamine:fructose-6-phosphate amidotransferase) ซึ่งเกี่ยวข้องกับการรักษาโรคเบาหวานชนิดที่ 2 และจากฐานข้อมูลของผลิตภัณฑ์ธรรมชาติทางทะเล พบว่ามีสาร 4 ตัว คือ aaptamine isoaaptamine aaptosine และอนุพันธ์ของ paragracine ที่มีมวลโมเลกุลเท่ากับ 228 a.m.u. (รูปที่ 6) ดังนั้นข้อมูลที่มีอยู่ยังไม่เพียงพอในการพิสูจน์ว่าสารที่ได้ควรเป็นตัวใด จึงนำสารสกัดผ่านเข้าสู่ stop-flow LC-NMR อีกครั้งโดยใช้คอลัมน์ของ HPLC และสภาวะเดียวกับที่ใช้ใน LC-MS ซึ่งสารบริสุทธิ์ที่ผ่านออกมาที่เวลา 10.3 นาที จะผ่านเข้าสู่ NMR ต่อไป

เมื่อพิจารณาสเปกตรัมของ ^{1}H-NMR พบโปรตอนบนวงแหวนเบนซีน 5 ตัว โดยเป็นโปรตอนเดี่ยว 1 ตัว และโปรตอนที่คู่ควบกัน 2 คู่ ทำให้สามารถตัดอนุพันธ์ของ paragracine ออกไปได้เนื่องจากมีโปรตอนเพียง 2 ตัว และเมื่อเปรียบเทียบค่าเคมิคัลชิฟของโปรตอนที่ได้กับค่าของสารทั้ง 3 ตัวที่เคยมีรายงานไว้ พบว่ามีค่าใกล้เคียงกับของ aaptamine จึงสรุปได้ว่าสารบริสุทธิ์ที่แยกได้และมีฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของ GFAT คือ aaptamine ซึ่งแสดงให้เห็นว่า LC-NMR เป็นเครื่องมือที่มีประโยชน์ในการศึกษาเกี่ยวกับผลิตภัณฑ์ธรรมชาติเพื่อพัฒนาเป็นยา และยังช่วยเพิ่มประสิทธิภาพของกระบวนการ dereplication เมื่อใช้ร่วมกับ LC-MS

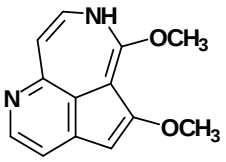
ดังที่ได้กล่าวแล้วว่านอกจากการใช้ LC-MS และ LC-NMR ร่วมกันแล้ว ยังมีการคู่ต่อเครื่องมือทั้ง 3 ชนิดเข้าด้วยกันเป็น LC-MS/NMR[13-14] เพื่อใช้ในงานวิเคราะห์ต่างๆ ทั้งนี้ LC-NMR มีข้อด้อยกว่า LC-MS ตรงที่มีความไวต่ำ และค่อนข้างยุ่งยากในการใช้งาน เนื่องจากต้องใช้ตัวทำละลายที่มีการแทนที่โปรตอนด้วยดิวทีเรียม ต้องลดการรบกวนสัญญาณ (solvent suppression) ที่เกิดจากโปรตอนในวัฏภาคเคลื่อนที่ และต้องมีการปรับปริมาณของสารที่ผ่านออกจาก LC เข้าสู่ NMR ในขณะที่ MS เป็นเทคนิคที่ทำให้สารตัวอย่างถูกทำลาย (จากการแตกกระจายของไอออน) แต่มีความไวสูงกว่า ดังนั้นการนำเครื่องมือทั้ง 3 ชนิดมาคู่ต่อกันทำให้ได้ข้อมูลเกี่ยวกับ MS และ NMR ไปพร้อมๆกัน โดยเป็นการคู่ต่อแบบคู่ขนาน[15] แต่ยังต้องมีการพัฒนาให้เครื่องมือทั้ง 3 ชนิดมีการทำงานที่เข้ากันได้ เช่น อาจเกิดผลกระทบจากตัวทำละลายที่มีดิวทีเรียมต่อการทำงานของ MS อย่างไรก็ตาม LC-MS/NMR ไม่สามารถแทนที่ LC-MS LC-NMR หรือแม้แต่ NMR ได้ เนื่องจากในบางกรณีต้องมีการทำสารสกัดให้บริสุทธิ์มากขึ้นก่อน หรือสารที่มีโครงสร้างซับซ้อนย่อมต้องอาศัยข้อมูลทางสเปกโทรสโกปีที่ละเอียดมากขึ้น ดังนั้นการเลือกใช้เครื่องมือต่างๆ ต้องให้มีความเหมาะสมเพื่อให้เกิดประสิทธิภาพสูงสุด[16]



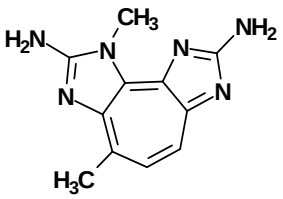
aaptamine



isoaaptamine



aaptosine



paragracine derivative

บทสรุป

เทคนิคคู่ต่อเครื่องมือวิเคราะห์ เป็นการนำเครื่องมือที่ใช้ในการแยกสารให้บริสุทธิ์ โดยอาศัยหลักการทางโครมาโทกราฟี มาคู่ต่อกับเครื่องมือที่ใช้ในการอธิบายโครงสร้างของสาร โดยอาศัยข้อมูลทางสเปกโทรสโปกี จัดเป็นการนำเครื่องมือวิเคราะห์หลายเครื่องมาต่อตรงกัน (online) โดยผ่านส่วนต่อประสานที่เหมาะสม ทำให้การวิเคราะห์ทั้งเชิงปริมาณและเชิงคุณภาพเป็นไปอย่างมีประสิทธิภาพมากขึ้น โดยเฉพาะงานวิจัยทางด้านผลิตภัณฑ์ธรรมชาติที่มีสารสกัดปริมาณน้อยและอยู่ในรูปของผสม

เอกสารอ้างอิง

1. อรอุมา ภู่ประเสริฐ และ มาลัย สถิรพันธุ์. 2549. เทคนิคการคู่ต่อเครื่องมือวิเคราะห์ในทางเภสัชศาสตร์. วารสารไทยไภษัชยนิพนธ์ 3(9) : 1-23.
2. Constant HL. and Beecher CWW. 1995. A Method for the dereplication of natural product extracts using electrospray HPLC/MS. Nat Prod Lett 6: 193-196.
3. Poobrasert O. 1997. Degradation studies of physostigmine and a phytochemical study of *Mammea siamensis*. Ph D Thesis. Univ Illinois at Chicago. p 132-133.
4. Guttman A., Varoglu M., and Khandurina J. 2004. Multidimensional separations in the pharmaceutical arena. DDT 9(3): 136-44.
5. Corcoran O., and Spraul M. 2003. LC-NMR-MS in drug discovery. DDT 8: 624-631.
6. Kite GC., Veitch NC., Grayer RJ., and Simmonds MSJ. 2003. The use of hyphenated techniques in comparative phytochemical studies of legumes. Biochem System Ecol 31: 813-43.
7. Xiao HB., Krucker M., Albert K., and Liang XM. 2004. Determination and identification of isoflavonoids in *Radix astragali* by matrix solid phase dispersion extraction and high-performance liquid chromatography with photodiode array and mass spectrometric detection. J Chromatogr A 1032: 117-124.
8. Waridel P., Wolfender J-.L., Lachavanne J.-B., and Hostettmann K. 2004. *ent*-Labdane glycosides from the aquatic plant *Potamogeton lucens* and analytical evaluation of the lipophilic extract constituents of various *Potamogeton* species. Phytochem 65: 945-954.
9. Wolfender J-L., Rodriguez S., and Hostettmann K. 1998. Liquid chromato-graphy coupled to mass spectrometry and nuclear magnetic resonance spectroscopy for the screening of plant constituents. J Chromatogr A 794: 299-316.
10. Wolfender J-L., Ndjoko K., and Hostettmann K. 2003. Liquid chromato- graphy with ultraviolet absorbance-mass spectrometric detection and with nuclear magnetic resonance spectroscopy: a

powerful combination for the on-line structural investigation of plant metabolites. J Chromatogr A 1000: 437-455.

11. Eldridge GV., Vervoort HC., Lee CM., Cremin PA., Williams CT., Hart SM., *et al*. 2002. High-throughput method for the production and analysis of large natural product libraries for drug discovery. Anal Chem 74: 3963-3971.
12. Bobzin SA., Yang S., and Kasten TP. 2000. Application of liquid chromatography-nuclear magnetic resonance spectroscopy to the identification of natural products. J Chromatogr B 748: 259-267.
13. Elipe MVS. 2003. Advantages and disadvantages of nuclear magnetic resonance spectroscopy as a hyphenated technique. Anal Chim Acta 497: 1-25.
14. Novak P. 2004. LC-NMR or a deeper insight into complex mixtures. J Chemists Chem En 53: 441-447.
15. Lindon JC. 2003. HPLC-NMR-MS: Past, present and future. DDT 8: 1021-1022.
16. Exarchou V., Krucker M., Van Beek TA., Vervoort J., Gerothanassis IP., and Albert K. 2005. LC-NMR coupling technology: Recent advancements and applications in natural products analysis. Magn Reson Chem 43: 681-687.