

การแยก การควบคุมคุณภาพ และการหาปริมาณสารในสมุนไพรด้วย
โมโนโคลนัล แอนติบอดี
เพ็ญพรรณ เวชวิทย์กุล

Isolation, Qualitation and Quantitation of Substances
in Herbal Drugs by Monoclonal Antibody

Penpun Wetwitayaklung

ภาควิชาเภสัชเวท คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยศิลปากร อ.เมือง จ.นครปฐม 73000

Department of Pharmacognosy, Faculty of Pharmacy, Silpakom University, Nakorn Pathom 73000, Thailand.

Corresponding author. E-mail address: penpan@email.pharm.su.ac.th (P. Wetwitayaklung)

Received 13 January 2004; accepted 30 July 2004

บทสรุป

Immunoaffinity column และ immunoassay เป็นวิธีที่ได้รับการพัฒนามาเพื่อใช้ในการพิสูจน์เอกลักษณ์และวิเคราะห์สารออกฤทธิ์ในสมุนไพร นอกเหนือไปจากวิธีดั้งเดิม เช่น TLC, CC, HPLC และ GC วิธีทั้งสองเป็นวิธีที่ใช้ IgGs หรือ monoclonal antibodies ของสารที่ต้องการแยกและวิเคราะห์เป็นตัวตรวจสอบ วิธีนี้มีความไวและความเฉพาะเจาะจงสูงต่อสารที่ต้องการแยกและวิเคราะห์ที่เหนือกว่าวิธีวิเคราะห์ดั้งเดิม immunoaffinity column สามารถแยกสารและทำให้บริสุทธิ์ได้ด้วยการแยกขั้นตอนเดียว immunoassay สามารถวิเคราะห์สารในความเข้มข้นระดับพิโค-นาโนกรัมได้ อย่างไรก็ตามการวิเคราะห์อาจเกิด cross reactivity ต่อสารที่มีโครงสร้างคล้ายคลึงกันได้ วิธี immunoaffinity column และ immunoassay เหมาะในการตรวจสอบสารที่มีโมเลกุลของน้ำตาลในโครงสร้าง เช่น ซาโปนิน กลัยโคไซด์ กลูคูโรไซด์ และ น้ำตาลที่มีหมู่อะมิโน และสะดวกต่อการวิเคราะห์สารดังกล่าวในยาจากสมุนไพรที่มีส่วนผสมของพืชหลายชนิด

Summary

Immunoaffinity column and immunoassay were developed for identifying and analysing active substances in herbal medicines beyond conventional methods such as TLC, CC, HPLC and GC. Both methods use IgGs or monoclonal antibodies of selected separating and analysing substances as probes. They are highly sensitive and specific methods to the substances, being superior to conventional methods. Immunoaffinity column could isolate and purify in single step separation. Immunoassay could analyse substances in picro-nanogram concentration. However, cross reactivity of these methods might occur within similar structure substances. Immunoaffinity column and immunoassay are suitable for detecting substances which have sugar moiety in their structures, i.e., saponin, glycoside, glucuronide and aminosugar. They are convenient for analysing those substances in the combination of herbs in herbal drug preparations.

บทนำ

ในการควบคุมคุณภาพสารต่าง ๆ จะใช้การแยกและวิเคราะห์หาปริมาณสารด้วยวิธีทางโครมาโตกราฟี เช่นการแยกสารด้วยวิธี คอลัมน์ โครมาโตกราฟี และการวิเคราะห์สารด้วยวิธี Thin Layer Chromatography (TLC), High Performance Liquid Chromatography (HPLC) และ Gas Chromatography (GC) ซึ่งวิธีเหล่านี้มีข้อจำกัดในการแยกและวิเคราะห์ กล่าวคือ หากสารสกัดที่ต้องการแยกหรือวิเคราะห์ปริมาณได้จากสมุนไพรผสมหลายชนิด หรือสารสกัดมีสารหลายชนิดผสมกันอยู่ หรือมีสารปนเปื้อนอยู่เป็นจำนวนมาก การแยกสารจำเป็นต้องผ่านคอลัมน์หลายครั้ง เพื่อแยกให้ได้สารบริสุทธิ์ ในบางกรณีก็ไม่อาจแยกหรือวิเคราะห์หาปริมาณได้เนื่องจากสารถูกชะออกมาพร้อมกัน สารบางชนิดอาจถูกดูดซับหรือสร้างพันธะที่แข็งแกร่งกับวัสดุภาชนะที่ ทำให้ไม่สามารถถูกชะออกมาได้หมด เกิดการสูญเสียสาร ทำให้อายุการใช้งานของคอลัมน์สั้นและทำให้การวิเคราะห์ปริมาณผิดพลาด ในกรณีที่สมุนไพรสกุลหนึ่งๆ มีหลายชนิด (species) หรือหลายสายพันธุ์ เมื่อนำสมุนไพรเหล่านั้นมาเตรียมเป็นตำรับอาจเกิดความสับสน ทำให้ไม่อาจแน่ใจได้ว่าการนำสมุนไพรถูกชนิดมาเตรียมเป็นยาหรือไม่ หรือปนปลอมด้วยสมุนไพรชนิดที่ใกล้เคียงกัน ผลคือความไม่แน่นอนของตำรับซึ่งมีผลต่อประสิทธิภาพในการรักษา และอาจจะเกิดพิษได้ การใช้เทคนิคการแยกและวิเคราะห์สารแบบดั้งเดิมบางครั้งไม่อาจแยกความแตกต่างของชนิดหรือสายพันธุ์ของสมุนไพรเหล่านี้ หรือสมุนไพรอาจมีการสังเคราะห์สารบางชนิดในปริมาณต่ำกว่าความไวของการวิเคราะห์แบบดั้งเดิมที่จะตรวจสอบได้ ดังนั้นนักวิทยาศาสตร์จึงได้มีความพยายามที่จะพัฒนาวิธีวิเคราะห์ด้วยระบบภูมิคุ้มกันวิทยา (immunoassay) เช่น enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) และ western blot ที่มีความไว ให้ผลการวิเคราะห์ที่รวดเร็ว สามารถวิเคราะห์ชนิดสารและตรวจสอบสารในปริมาณน้อยในระดับนาโน-พิโคกรัม มีความเฉพาะเจาะจงต่อสารที่จะวิเคราะห์ จึงใช้แยกชนิดของสมุนไพรได้ นอกจากนี้ยังนำไปพัฒนาเป็น immunoaffinity column ที่สามารถแยกสารให้บริสุทธิ์ภายในขั้นตอนเดียวได้

การแยกและวิเคราะห์สารด้วยวิธี immunoaffinity column และ immunoassay เป็นวิธีที่ใช้สารก่อภูมิคุ้มกัน (antibody) ของสารที่ต้องการแยกหรือวิเคราะห์เป็นตัวตรวจสอบ มีการใช้ทั้ง polyclonal antibody (Yoon, 1998; Ahn, 2002) และ monoclonal antibody (MAb) ซึ่งต่างกันที่วิธีการกระตุ้นให้สัตว์ทดลองเกิดสารก่อภูมิคุ้มกัน ในที่นี้จะขอลำถึงแต่การใช้ MAb ซึ่งมีความเฉพาะเจาะจงต่อสารที่ต้องการวิเคราะห์ และเหตุที่สารที่ต้องการวิเคราะห์มีขนาดเล็กเกินไปที่จะกระตุ้นให้สัตว์ทดลองสร้างสารก่อภูมิคุ้มกันได้ จึงต้องมีการพัฒนาเทคนิคการทำให้สารกลายเป็น immunogen และพัฒนาให้สามารถใช้วิธีทาง TLC ร่วมกับ immunoassay ดังจะได้อธิบายต่อไป

วิธีการสืบค้นข้อมูล

การสืบค้นข้อมูลจะทำการทบทวนวรรณกรรมจากหนังสือและวารสารต่างประเทศ

เนื้อหาที่ทบทวน

ขั้นตอนการเตรียมสารก่อภูมิคุ้มกันและเทคนิคอันเกี่ยวเนื่องกับการแยกและวิเคราะห์ปริมาณของสารในพืชสมุนไพรโดยวิธี immunoaffinity column และ immunoassay เป็นวิธีที่มีความจำเพาะ และต้องอาศัยความชำนาญมากกว่าวิธีดั้งเดิมอย่างมาก ดังจะกล่าวต่อไป และขอสมมุติในที่นี้ว่าสารที่ต้องการแยกหรือวิเคราะห์คือสาร X ซึ่งเป็นสารที่มีโครงสร้างของน้ำตาลโมเลกุล

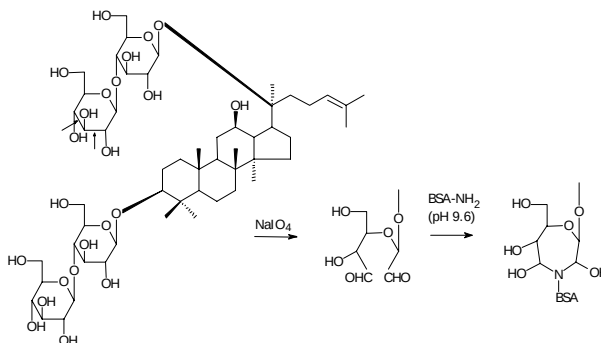
การสังเคราะห์ antigenic conjugate (X-BSA, X-HSA) (Lu, 2003)

ขั้นตอนนี้เป็นการเปลี่ยนสาร X ซึ่งมีโมเลกุลขนาดเล็ก และยังไม่สามารถกระตุ้นภูมิคุ้มกันของสัตว์ทดลอง ให้กลายเป็นสารก่อภูมิคุ้มกัน โดยการเชื่อมสาร X กับ carrier protein ซึ่งโดยปกติจะเลือกใช้ Bovine Serum Albumin (BSA) หรือ Human Serum Albumin (HAS) เนื่องจากหาง่าย และให้ผลการกระตุ้นให้เกิด

ภูมิคุ้มกันได้ดีในสัตว์ทดลอง

การทำปฏิกิริยาระหว่างสาร X กับสารโซเดียมไอโอเตต (NaIO_4) ในน้ำ ที่อุณหภูมิห้อง จากนั้นเติม BSA หรือ HSA แล้วนำไปแยกสารโดยใช้วิธี dialysis จะได้ X-BSA หรือ X-HSA (ตามลำดับ) ซึ่งเป็นสารก่อภูมิคุ้มกันที่สามารถเหนี่ยวนำให้มีการสร้างลิมโฟไซต์ (lymphocyte) ที่ม้ามของสัตว์ทดลอง

ปฏิกิริยาของสาร X กับ NaIO_4 เป็นการเกิดปฏิกิริยาเคมีระหว่างโครงสร้างน้ำตาลของสาร X กับ NaIO_4 ดังแสดงในรูปที่ 1 ปฏิกิริยานี้ทำให้วงแหวนของน้ำตาลแตกออกได้เป็นหมู่แอลดีไฮด์ 2 หมู่ (dialdehyde) และเมื่อเติม BSA หรือ HSA หมู่อะมิโนของโปรตีนจะทำปฏิกิริยากับหมู่แอลดีไฮด์เกิดเป็นพันธะเชื่อม (conjugate) โมเลกุลทั้งสอง



รูปที่ 1 ขั้นตอนการเกิดปฏิกิริยาเคมีของน้ำตาลกับ NaIO_4 เพื่อสังเคราะห์สารก่อภูมิคุ้มกัน

การกระตุ้นสารก่อภูมิคุ้มกัน (Immunization)(Lu, 2003)

สาร X-BSA ที่เตรียมได้ เมื่อนำมาละลายใน phosphate buffer saline (PBS) และอิมัลซิไฟ (emulsify) ใน Freund's complete adjuvant แล้วนำมาฉีดทางช่องท้อง (intraperitoneal) ของหนู ตามด้วยการฉีดกระตุ้น (booster) ในสองอาทิตย์ต่อมาด้วย X-BSA ใน Freund's incomplete adjuvant และฉีดกระตุ้นอีกมากกว่า 2 ครั้ง เข้าทางเส้นเลือดที่หางโดยฉีดห่างกันทุกๆ 2 อาทิตย์ เมื่อตรวจพบการตอบสนองทางภูมิคุ้มกัน (immune response) หากพบว่าระดับสารก่อภูมิคุ้มกันในซีรัม (serum antibody titer) สูงและมีความเจาะจงต่อ X-BSA ในระดับเหมาะสม ก็จะทำการแยกม้ามของหนูออกมาสกัดแยกเซลล์ลิมโฟไซต์ (lymphocyte cell)

จากการศึกษาพบว่าส่วนของอะกลัยโคน (aglycone) และส่วนของน้ำตาลของสาร X อาจเป็นส่วนสำคัญในการก่อภูมิคุ้มกัน

การหลอมเซลล์ (Lu, 2003)

เป็นขั้นตอนที่ใช้ hybridoma technology กล่าวคือ นำเซลล์ลิมโฟไซต์ที่แยกได้จากม้ามของหนูมาหลอมรวมกับเซลล์มะเร็งพลาสมา (myeloma cell) ของหนูด้วย polyethyleneglycol (PEG) เซลล์ที่หลอมแล้วจะเป็นเซลล์ลูกผสมที่เรียกว่า hybridomas cell (Roitt, 1993) ซึ่งมีความสามารถที่จะมีชีวิตและแบ่งตัวเพิ่มจำนวนได้ในอาหารเลี้ยงเซลล์ เซลล์ลูกผสมที่ได้จะถูกนำมาคัดแยกเป็นเซลล์เดี่ยวๆ และเลี้ยงในอาหารเลี้ยง จากนั้นจึงเลือกเอาแต่เซลล์ที่สามารถผลิต MAb ต่อสาร X ด้วยความจำเพาะสูง คือสามารถจับกับสาร X ได้ดี (high affinity) ไปขยายพันธุ์ (clone) ในอาหารเลี้ยงเซลล์ชนิดพิเศษ โดยวิธี limited dilution เพื่อให้การผลิต MAb จำนวนมากต่อไป

การแยก MAb ให้บริสุทธิ์ (Lu, 2003)

MAb ที่ผลิตได้เป็น IgG ชนิด anti-X monoclonal antibody (anti-X MAb) การแยก MAb ชนิดนี้ให้บริสุทธิ์เริ่มจากการกรองอาหารเลี้ยงเซลล์ผ่านแผ่นกรองขนาด 0.45 μm ของเหลวที่กรองได้ถูกนำมาปรับ pH ให้เท่ากับ 7 แล้วจึงนำไปแยกด้วยโปรตีนคอลัมน์ (protein column) ที่เหมาะสม ล้างคอลัมน์ด้วย ฟอสเฟต บัฟเฟอร์ (pH=7) แล้วชะล้าง MAb ที่ถูกดูดซับในคอลัมน์ออกมาด้วย ชิเตรต บัฟเฟอร์ (pH=3) ปรับสารละลาย MAb ที่ชะล้างได้ให้เป็นกลาง จากนั้นนำสารละลายที่ได้มาแยกโดยวิธี dialysis ในน้ำ 5 ครั้ง แล้วนำ MAb ที่แยกได้ไประเหยแห้งโดยใช้ความเย็น (lyophilized) ก่อนจะนำไปเตรียมในรูปของสารละลาย MAb เพื่อใช้ในการแยกและวิเคราะห์สาร X ต่อไป

วิธีวิเคราะห์ปริมาณสารสำคัญโดยใช้วิธี immunoassay

วิธีการนี้ได้หลายวิธี ได้แก่

Competitive Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (Competitive ELISA)

วิธีนี้จะใช้ X-HSA เป็น coating antigen สำหรับเริ่มปฏิกิริยาของ ELISA ดังนี้ (Fukuda, 2000a; Fukuda, 2000b; Lu, 2003)

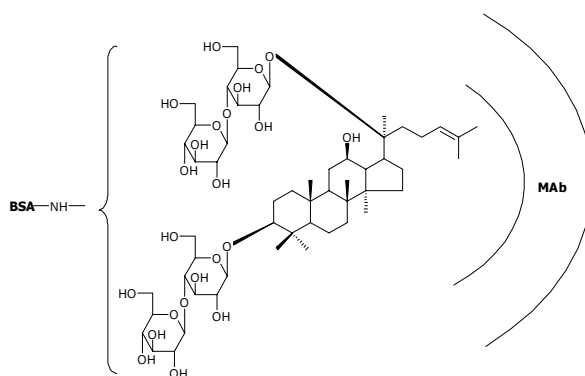
เริ่มจากทำให้ X-HSA ถูกดูดซับที่ผิวของ 96 well immunoplate แล้วจัดการดูดซับที่ไม่เจาะจงออกไปด้วยนมพร่องมันเนย (skim milk) จากนั้นเติมสาร X ในความเข้มข้นต่างๆตามด้วย MAb solution แล้วนำไปบ่ม สาร X และ X-HSA จะเกิดการแข่งขันกันในการเข้าจับกับ MAb เมื่อบ่มจนครบเวลาและล้าง well สาร X และสาร X ที่จับกับ MAb (X-MAb) จะถูกล้างทิ้งไป เหลือแต่ X-HSA และ X-HSA ที่จับกับ MAb (X-HSA-MAb) ซึ่งเมื่อเติม peroxidase-labeled anti-mouse-IgG เพื่อให้ IgG จับกับ MAb อีกต่อหนึ่งตามด้วยการเติมสารละลายของสารตั้งต้น (substrate) ของเอนไซม์ peroxidase ที่ประกอบไปด้วย ชิเตรต บัฟเฟอร์, H_2O_2 และ 2,2'-azinobis (3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) diammonium salt (ABTS) เอนไซม์ peroxidase จะทำปฏิกิริยากับ H_2O_2 และ ABTS เกิดสีที่สามารถนำไปวัดค่าดูดกลืนแสงที่ 405 nm

วิธีนี้หากมีสารมาตรฐานของ X ก็สามารถใช้ขั้นตอนเหล่านี้ในการเตรียม calibration curve แล้วนำไปคำนวณหาปริมาณของสาร X ในสารสกัดตัวอย่างที่ต้องการวิเคราะห์ปริมาณของสาร X ได้หรือจะใช้เพื่อตรวจสอบว่าสารสกัดตัวอย่างที่นำมาตรวจสอบนั้นมีสาร X อยู่หรือไม่ ซึ่งจะให้ผลการวิเคราะห์ที่รวดเร็วและมีความแม่นยำ

Western blotting (Fukuda, 2001)

วิธีนี้ถูกนำมาประยุกต์ใช้ร่วมกับการแยกสารด้วย TLC โดยจะต้องทำการแยกสาร X ออกจากสารอื่นๆที่มีในสารสกัดด้วย TLC เสียก่อน ซึ่งจะต้องเตรียมโครมาโตแกรม (chromatogram) ไว้ 2 ชุดภายใต้สภาวะเดียวกัน โครมาโตแกรมแผ่นแรกจะนำพ่นสารละลายกรดซัลฟูริก แล้วนำไปอบเพื่อจะใช้เป็นแผ่นเปรียบเทียบกับโครมาโตแกรมแผ่นที่ 2 ซึ่งแผ่นโครมาโตแกรมนี้จะถูกนำไปทำให้เกิดการเคลื่อนย้ายสาร (blot) จากโครมาโตแกรมสู่แผ่น polyvinylidene difluoride membrane, Immobilon-N (PVDF) ด้วยการพ่นสารละลาย blotting solution คือ $i\text{-PrOH} : \text{MeOH} : \text{H}_2\text{O}$ (1:4:16) ลงบนโครมาโตแกรม แล้วปิดทับด้วยแผ่น PVDF ตามด้วยการปิด glass microfiber filter sheet ลงบนแผ่นทั้งสอง นำแผ่นทั้งหมดไปให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 120°C แยกแผ่น PVDF ที่ผ่านการเคลื่อนย้ายสาร แล้วมาทำให้แห้ง แล้วนำไปแช่ในสารละลายโซเดียมโอไอเดต (NaIO_4) ที่มี BSA ขั้นตอนนี้จะทำให้สาร X บนแผ่น PVDF เปลี่ยนไปเป็น X-BSA และจะติดอยู่กับแผ่น PVDF (Shan, 1999) แต่ปฏิกิริยานี้อาจไปเปลี่ยนแปลง (modified) สาร ซึ่งอาจจะทำให้เกิด cross reactivity ขึ้นระหว่างสารที่มีโครงสร้างใกล้เคียงกันได้ จากนั้นนำแผ่น PVDF ที่ได้ไปแช่ใน anti-X MAb ขั้นตอนนี้จะทำให้ anti-X MAb ทำปฏิกิริยากับสาร X ดังแสดงในรูปที่ 2 จากนั้นเติมสารละลายเจือจางของ

peroxidase-labeled goat antimouse IgG แล้วเติมสารตั้งต้นของเอนไซม์ peroxidase เช่น 4-chloro-1-naphthol, H_2O_2 (ให้ผลเป็น spot บนแผ่น PVDF สีฟ้า) หรือ 3-amino-9-ethylcarbazole, H_2O_2 ที่มี N,N-dimethylformamide (ให้ผลเป็น spot บนแผ่น PVDF สีแดง) ซึ่งแผ่น PVDF นี้จะแสดงเฉพาะจุดของสาร X และอนุพันธ์ของสาร X ที่เกิด cross reactivity ได้ และสามารถนำไปเทียบกับโครมาโตแกรมแผ่นที่ 1 ที่จะแสดง จุดของสารทุกตัวที่มีอยู่ในสารสกัด ทำให้ทราบถึงตำแหน่งของสารที่ต้องการศึกษาบนโครมาโตแกรมแผ่นที่ 1 ได้ อีกทั้งยังอาศัยรูปแบบของการเกิด จุดบนโครมาโตแกรมและแผ่น PVDF ในการระบุชนิดของสารสกัดว่ามาจากพืชสายพันธุ์ใด เนื่องจากพืชสายพันธุ์ต่างกันจะมีการสังเคราะห์สารบางตัวต่างกันไป กล่าวคือใช้ทำ chromatographic fingerprint ได้



รูปที่ 2 การเกิดปฏิกิริยาระหว่าง X-BSA กับ MAb ของสาร X

Immunoaffinity column (Fukuda, 2000a; Fukuda, 2000b)

Immunoaffinity เป็นวิธีการเชื่อม MAb เข้ากับวัสดุภาวคคงที่ เพื่อให้ MAb ทำหน้าที่ในการแยกสาร X ออกจากสารตัวอื่น ๆ โดย MAb จะจับกับสาร X อย่างเจาะจง สารอื่น ๆ จะถูกชะล้างออกจากคอลัมน์ไปก่อน จากนั้นใช้ บัฟเฟอร์ที่เหมาะสมชะล้างสาร X ออกมา ขั้นตอนการเตรียม immunoaffinity column ทำได้ดังนี้

ละลาย MAb ในสารละลายเจือจางของ Affi gel Hz coupling buffer แล้วนำไปแยกสารโดยวิธี ไดอะไลซิส จากนั้นเติม $NaIO_4$ ผสมให้เข้ากันในที่มืด เติมกลีเซอรอล แล้วนำไปแยกสารโดยวิธี ไดอะไลซิส พร้อมกันนั้น นำ Affi-gel Hz hydrazide gel มาล้างด้วย coupling buffer นำสารละลาย MAb ที่เตรียมไว้เติมลงในเจล ผสมให้เข้ากันที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 24 ชั่วโมง บรรจุเจลลงใน คอลัมน์พลาสติกขนาดเล็ก ล้างคอลัมน์ด้วย PBS จนกว่าค่าที่ตรวจได้จาก ELISA จะเทียบเท่ากับสีพื้นหลัง แสดงว่าได้กำจัด MAb ส่วนที่ไม่ได้จับบนเจลออกไปจนหมด คอลัมน์ที่เตรียมได้พร้อมจะใช้งานในการแยกสารและสามารถเก็บคอลัมน์ที่เตรียมได้ใน PBS ที่มี โซเดียม อะไซด์ (sodium azide) ที่อุณหภูมิ $4^{\circ}C$ ได้นานโดยคุณภาพไม่ลดลง

ผลการศึกษา immunoassay ในพืชสมุนไพร

ตัวอย่างการศึกษา immunoassay ในพืชสมุนไพร ได้แสดงไว้ในตารางที่ 1

ตารางที่ 1 การศึกษา immunoassay ด้วย MAb ในพืชสมุนไพร

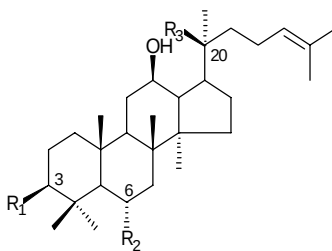
ชนิดของพืช	ตัวอย่างสาร (X)
<i>Panax ginseng</i> C.A.Mey.	Ginsenoside Rb1, Rg1 (Fukuda, 2001)
<i>Glycyrrhiza uralensis</i> Fisch	Glycyrrhizin (Shan, 1999)
<i>Paeonia lactiflora</i> Pallas	Paeoniflorin, albiflorin (Lu, 2003)
<i>Solanum khasianum</i> Clarke	Solamargine (Putalun, 2000)
<i>Coleus forskohlii</i> Briq.	Forskloin (Yanagihara, 1996)

โสม (Ginseng) (Fukuda, 1999; Fukuda, 2001)

จากการศึกษาถึงการใช้ western blot เพื่อตรวจสอบ ginsenoside Rb1 (GRb1) และ GRg1 พบว่า Anti-GRb1 MAb ที่ใช้ตรวจสอบ GRb1 สามารถเกิด cross reaction ต่อ GRc, GRd ในระดับ 0.024% และต่อ GRe และ GRg1 ในระดับที่ต่ำกว่า 0.005%

Anti GRg1 MAb ที่ใช้ตรวจสอบ GRg1 สามารถเกิด cross reaction ต่อ GRe, GRf, 20-gluc GRf และ GRh1 โดยมี cross reaction ต่อ GRe ในระดับ 3.3%

เหตุที่เกิด cross reaction เนื่องจากโครงสร้างทางเคมีของสารมีความใกล้เคียงกัน กล่าวคือ GRb1, GRc และ GRd ทุกตัวมีโครงสร้างอะกลัยโคนเป็น protopanaxadiol เหมือนกัน ส่วน GRg1, GRe, GRf, 20-gluc-GRf และ GRh1 ทุกตัวมีโครงสร้างอะกลัยโคนเป็น protopanaxatriol ที่เหมือนกัน สาร 2 กลุ่มนี้ ไม่เกิด cross reaction ระหว่างกลุ่ม แสดงให้เห็นว่าวิธี immunoassay สำหรับ ginsenoside สามารถแยกความแตกต่างของอะกลัยโคนที่อาจเป็นส่วนหนึ่งของโครงสร้างที่เกิดปฏิกิริยากับ MAb ออกจากกัน ทำให้สามารถวิเคราะห์อะกลัยโคนต่างชนิดกันด้วยวิธี western blot ได้ในเวลาเดียวกันโดยไม่มีผลรบกวนกัน (รูปที่ 3)



สาร	อะกลัยโคน	R ₁	R ₂	R ₃
Ginsenoside Rh1	protopanaxatriol	OH	-O-Glc	OH
Ginsenoside Rg1		OH	-O-Glc	-O-Glc
Ginsenoside Rf		OH	-O-Glc ² -Glc	OH
Ginsenoside Re		OH	-O-Glc ² -Rha	-O-Glc
20-Ginsenoside Rf		OH	-O-Glc ² -Glc	-O-Glc
Ginsenoside Rd	protopanaxadiol	-O-Glc ² -Glc	H	-O-Glc
Ginsenoside Rc		-O-Glc ² -Glc	H	-O-Glc ⁶ -Ara
Ginsenoside Rb1		-O-Glc ² -Glc	H	-O-Glc ⁶ -Glc

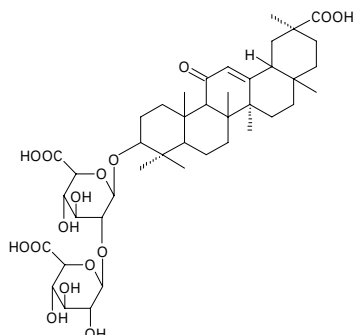
รูปที่ 3 สูตรโครงสร้างของ ginsenoside ชนิดต่าง ๆ

นอกจากนี้ยังพบว่าตำแหน่งของการเกิดพันธะระหว่างอะกลัยโคนกับน้ำตาลมีผลต่อการเกิดปฏิกิริยากับ MAb โดยที่ anti-GRb1 MAb ต้องการน้ำตาล เชื่อมที่ C-3 หากเป็นน้ำตาลเชื่อมที่ C-6 จะยับยั้งปฏิกิริยา ส่วน anti-GRg1 MAb ต้องการน้ำตาลเชื่อมที่ C-6 หากเชื่อมที่ C-3 จะยับยั้งปฏิกิริยา สำหรับน้ำตาลที่ตำแหน่งอื่นๆ นอกไปจากนี้ไม่มีผลต่อปฏิกิริยา เช่น 20-gluc-GRf ถูกยับยั้งได้ตามปกติเหมือนสารในกลุ่มของมันเป็น จึงสรุปได้ว่าบริเวณรอบๆ วงแหวน A และ B ของ ginsenoside แสดงหน้าที่เป็น epitope ต่อ MAb

สำหรับ immunoaffinity column ที่เตรียมได้พบว่าคอลัมน์มีความคงตัวดี แม้ผ่านการชะล้างไปกว่า 10 ครั้ง คอลัมน์ก็ยังใช้ในการแยกสารได้ (Fukuda, 2000b) ในการแยก GRb1 ด้วย immunoaffinity column ของ anti-GRb1 MAb พบว่ามี cross reaction กับ malonyl GRb1 โดยจะมี malonyl GRb1 ปนออกมากับ GRb1 ในปริมาณเล็กน้อย หากนำสารละลายของสารทั้งสองมาทำปฏิกิริยากับ 0.1% KOH ในเมทานอล นาน 1 ชั่วโมง จะได้ GRb1 ที่บริสุทธิ์

ชะเอม (Glycyrrhizae)

ผลจาก western blot เพื่อตรวจสอบ glycyrrhizin (รูปที่ 4) พบว่า glycyrrhizin เกิด cross reaction กับ glycyrrhetic acid 3-O-glucuronide ในระดับ 4.36% ด้วยเหตุที่ glycyrrhizin มี carboxylic acid group อยู่ 3 หมู่ โมเลกุลมีความมีขั้วสูง การเคลื่อนย้ายสารจาก TLC สู่แผ่นเยื่อจึงเกิดได้น้อย (low blotting efficiency) ทำให้ดูเหมือนว่าระดับการเกิด cross reaction สูง สำหรับอะกลัยโคนของ glycyrrhizin คือ glycyrrhetic acid ไม่เกิดปฏิกิริยากับ MAb แสดงให้เห็นว่า western blot ตรวจสอบสารได้เมื่อสารมีน้ำตาลในโครงสร้าง (Shan, 1999)



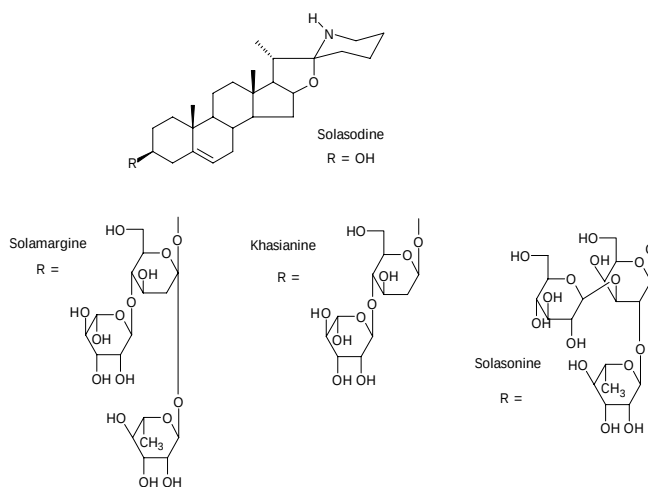
รูปที่ 4 โครงสร้างของ glycyrrhizin

ผลจาก ELISA พบว่า glycyrrhizin เกิด cross reaction กับ glycyrrhetic acid 3-O-glucuronide ในระดับ 4.36% และเกิดกับ glycyrrhetic acid ในระดับ 2.13% โดยไม่มี cross reaction กับ สเตอรอยด์ ตัวอื่น ๆ แสดงให้เห็นว่าส่วนของอะกลัยโคนของ glycyrrhizin จาก glycyrrhizin-BSA เป็นส่วนที่กระตุ้นให้สร้างภูมิคุ้มกัน (immunogenic) วิธี ELISA นี้มีความไวต่อสารที่ต้องการวิเคราะห์มากกว่า HPLC 1,000 เท่า (Tanaka, 1998)

สามารถประยุกต์วิธี ELISA มาใช้ในการแยกสายพันธุ์ของ glycyrrhizae ชนิดต่างๆ โดยการผลิต antiserum ที่เฉพาะเจาะจงต่อโปรตีนจากรากของ glycyrrhizae สายพันธุ์ที่ต้องการ จากนั้นนำมาใช้ในการทำปฏิกิริยากับโปรตีนที่สกัดมาจากตัวอย่าง glycyrrhizae ชนิดต่างๆ ที่ต้องการตรวจสอบ หากเป็นสายพันธุ์ที่ตรงกันก็จะให้ผลบวกกับ ELISA ที่ชัดเจน เนื่องจาก antiserum มีความเฉพาะเจาะจง และมีความไวต่อโปรตีนของ glycyrrhizae สายพันธุ์ที่ตรวจสอบ วิธีนี้อาจเรียกชื่ออย่างเจาะจงว่า Selected Antibody Enzyme Immuno Assay (SAEIA) นอกจากนี้ยังนำ antiserum ที่ผลิตได้ไปทำ western blot (Kitagawa, 1997)

พืชสกุลมะเขือ (Solanum)

พบว่า anti-solamargine MAb มี cross reaction ต่อ solasodine glycoside ตัวอื่นๆ (รูปที่ 5) ดังนั้น สำหรับพืชชนิดนี้สามารถใช้วิธี ELISA ไปใช้ในการหาความเข้มข้นรวมของ solasodine glycoside (ดูตารางที่ 2) ที่มีในสารสกัดหยาบได้โดยไม่ต้องนำไปผ่านขั้นตอนการสกัดแยก (Putalun, 2000)



รูปที่ 5 โครงสร้างของ solasodine, solamargine, khasianine และ solasonine

ตารางที่ 2 ความเข้มข้นรวมของ solasodine glycosides ในผลของ Solanum สายพันธุ์ต่าง ๆ

ชนิดของ <i>Solanum</i> sp.	ปริมาณของ solasodine glycosides ($\mu\text{g}/\text{mg}$ dry wt.)
<i>S. lyratum</i> Thunb.	0.65 ± 0.01
<i>S. verbascifolium</i> L.	3.63 ± 0.28
<i>S. melongena</i> L.	2.30 ± 0.26
<i>S. stramonifolium</i> L.	0.15 ± 0.02
<i>S. indicum</i> L.	0.23 ± 0.03
<i>S. aculeatissimum</i> Jacq.	2.66 ± 0.44
<i>S. trilobatum</i> L.	0.31 ± 0.03
<i>S. torvum</i> Swartz.	0.15 ± 0.02
<i>S. spirale</i> Roxb.	0.18 ± 0.01
<i>S. nigrum</i> L.	4.81 ± 0.19
<i>S. wrightii</i> Benth.	41.56 ± 3.26
<i>S. khasianum</i> Clarke	53.43 ± 3.90

การประยุกต์ใช้

การใช้ immunoaffinity column ร่วมกับวิธีวิเคราะห์ western blotting และ ELISA สามารถนำมาประยุกต์ใช้ได้ดังนี้

- แยกและวิเคราะห์สารที่มีโมเลกุลของน้ำตาลในโครงสร้าง เช่น ซาโปนิน กลัยโคไซด์ กลูคูโรไซด์ และ น้ำตาลที่มีหมู่อะมิโน
- แยกความแตกต่างของอะกลัยโคนของสารสำคัญออกจากกันโดยใช้ MAb ทำให้สามารถวิเคราะห์อะกลัยโคนต่างชนิดกันได้ในเวลาเดียวกัน (Fukuda, 2001) ยกเว้นสารบางชนิดที่มีระดับ cross reaction สูง เช่น solasodine glycosides (Putalun, 2000)
- สำรองหาสารออกฤทธิ์ที่มีปริมาณต่ำๆ ในพืช
- ใช้ในการแยกสายพันธุ์ของพืชสมุนไพรที่มีความใกล้เคียงกัน (Kitagawa, 1997)
- ใช้ในการตรวจหาปริมาณสารในการเพาะพันธุ์เนื้อเยื่อพืช เพื่อตรวจหาสายพันธุ์ที่ให้ผลผลิตหรือมีปริมาณสารสำคัญสูงได้อย่างรวดเร็ว (Yanagihara, 1996)

บทวิจารณ์

การตรวจสอบและวิเคราะห์สารในสมุนไพรนั้นพบว่าปริมาณสารขึ้นกับ การเพาะปลูก การเก็บเกี่ยว การดูแลหลังการเก็บเกี่ยว การสกัด และตัวทำละลายที่ใช้สกัด ซึ่งในการวิเคราะห์สารสำคัญนอกจากการทำ chromatogram fingerprint ของ TLC, HPLC, GC แล้ว immunoassay ก็เป็นวิธีใหม่ที่มีความไวสูงและเฉพาะเจาะจงต่อสาร โดยการใช้ anti-X monoclonal antibody (anti-X MAb) เป็นตัวช่วยให้การตรวจสอบสารสำคัญในสมุนไพรอย่างมีความเฉพาะเจาะจง

โดยปกติวิธี immunoassay จะใช้ตรวจวัดสารที่มีน้ำหนักโมเลกุลสูง ดังนั้นการจะตรวจวัดสารในสมุนไพรซึ่งมักเป็นสารที่มีโมเลกุลขนาดเล็ก จึงต้องอาศัยเทคนิคทำให้สารที่ต้องการตรวจวัดมีโมเลกุลขนาดใหญ่ขึ้นเป็น hepten-BSA หรือ hepten-HSA โดยให้สารทำปฏิกิริยากับ BSA หรือ HSA เสียก่อนเพื่อทำให้โมเลกุลของสาร X กลายเป็นส่วนหนึ่งของสารก่อกัมมิต้านทานที่สามารถจับกับสารก่อกัมมิต้านกันได้ (epitope) และยังช่วยให้ hepten-BSA หรือ hepten-HSA ยึดติดกับแผ่นเยื่อ (membrane) หรือผนังของ well ทำให้สามารถใช้ enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) หรือ western blotting ในการพิสูจน์เอกลักษณ์และวิเคราะห์หาปริมาณต่อไป นอกจากนี้ anti-X MAb ยังสามารถนำไปเตรียม immunoaffinity column ที่มีประโยชน์ในการแยกสาร X ให้มีความบริสุทธิ์แม้จะผ่านการชะล้างผ่านคอลัมน์เพียงครั้งเดียว อย่างไรก็ตามวิธีนี้พบว่าการเกิด cross reaction กับสารที่มีโครงสร้างใกล้เคียงกับสาร X ได้ ทำให้ผลการวิเคราะห์ที่ได้เป็นปริมาณสารโดยรวมของสาร X และอนุพันธ์ของมัน ดังนั้นหากสารเกิด cross reaction ซึ่งกันและกันได้ก็ไม่ว่าจะใช้วิธี immunoaffinity column ในการแยกสารในกลุ่มนี้ได้ สำหรับข้อดีของ immunoaffinity column และ immunoassay คือ ใช้สารสกัดในการแยกและวิเคราะห์น้อยกว่าวิธีดั้งเดิม ข้อจำกัดคือการแยกและการวิเคราะห์ได้เฉพาะสารที่มีโครงสร้างของน้ำตาลในโมเลกุล อีกทั้งต้องผ่านขั้นตอนการเตรียมและแยก anti-X MAb ให้ได้เสียก่อน ซึ่งขั้นตอนนี้เป็นวิธีการที่ละเอียดอ่อน และต้องการความชำนาญ ดังนั้นการจะแยกและวิเคราะห์สารด้วยวิธี immunoaffinity column และ immunoassay นั้นต้องอาศัยผู้ที่มีความเชี่ยวชาญและชำนาญกว่าวิธีดั้งเดิม

เอกสารอ้างอิง

- Ahn, K. S., Hahn, B. S., Lee, J. P., Chang, S. Y., Lee, H. K., Jeong, C. S., et al. (2002). Evaluation of musk by enzyme-linked immunosorbent assay. *Biological & Pharmaceutical Bulletin*, 25, 418-421.
- Fukuda, N., Tanaka, H., & Shoyama, Y. (1999). Western blotting for ginseng saponins, ginsenosides using anti-ginsenoside Rb1 monoclonal antibody. *Biological & Pharmaceutical Bulletin*, 22, 219-220.
- Fukuda, N., Tanaka, H., & Shoyama, Y. (2000a). Applications of ELISA, western blotting and immunoaffinity concentration for survey of ginsenosides in cross reactivity drugs of Panax species and traditional Chinese herbal medicines. *Analyst*, 125, 1425-1429.
- Fukuda, N., Tanaka, H., & Shoyama, Y. (2000b). Isolation of the pharmacologically active saponin ginsenoside Rb1 from ginseng by immunoaffinity column chromatography. *Journal of Natural Product*, 63, 283-285.
- Fukuda, N., Tanaka, H., & Shoyama, Y. (2001). Double staining of ginsenosides by western blotting using anti-ginsenoside Rb1 and Rg1 monoclonal antibodies. *Biological & Pharmaceutical Bulletin*, 24, 1157-1160.
- Kitagawa, T., Yang, Z., Bai, G., Fujiwara, K., Akahori, A., Sonoi, S., et al. (1997). A general enzyme immunoassay for the licorice root component contained in traditional Chinese medicines. *Biological & Pharmaceutical Bulletin*, 20, 211-216.
- Lu, Z., Morinaga, O., Tanaka, H., & Shoyama, Y. (2003). A quantitative ELISA using monoclonal antibody to survey paeoniflorin and albiflorin in cross reactivity drugs and traditional chinese herbal medicines. *Biological & Pharmaceutical Bulletin*, 26, 862-866.
- Putalun, W., Tanaka, H., Yahara, S., Lhieochaiphon, S., & Shoyama, Y. (2000). Survey of solasodine-type glycoalkaloids by western blotting and ELISA using anti-solamargine monoclonal antibody. *Biological & Pharmaceutical Bulletin*, 23, 72-75.
- Roitt, I., Brostoff, J., & Male, D. (1993). Immunology (3rd ed.). London: Mosby-Year Book.
- Shan, S., Tanaka, H., & Shoyama, Y. (1999). Western blotting method for the immunostaining detection of glucuronides of glycyrrhetic acid using anti-glycyrrhizin monoclonal antibody. *Biological & Pharmaceutical Bulletin*, 22, 221-223.
- Tanaka, H., & Shoyama, Y. (1998). Formation of a monoclonal antibody against glycyrrhizin and development of an ELISA. *Biological & Pharmaceutical Bulletin*, 21, 1391-1393.
- Yanagihara, H., Sakata, R., Shoyama, Y., & Murakami, H. (1996). Rapid analysis of small samples containing forskolin using monoclonal antibodies. *Planta Medica*, 62, 169-172.
- Yoon, S. R., Nah, J. J., Kim, S. K., Nam, K. Y., Jung, D. W., Nah, S. Y., et al. (1998). Determination of ginsenoside Rf and Rg2 from Panax ginseng using enzyme immunoassay. *Chemical & Pharmaceutical Bulletin*, 46, 1144-1147.