การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการทดสอบไฮดรอกซีโพรลีน ด้วยเทคนิคโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูงร่วมกับตัวตรวจวัดชนิดไดโอดแอเรย์

Optimization Conditions for Hydroxyproline Testing by High Performance Liquid Chromatography with Diode Array Detectors

จรรยา แสงเขียว[1*]
Janya Sangkhiaw[1*]

บทคัดย่อ

งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการทดสอบไฮดรอกซีโพรลีนด้วยเทคนิคโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูงร่วมกับตัวตรวจวัดชนิดไดโอดแอเรย์ (HPLC-DAD) และเพื่อเปรียบเทียบประสิทธิภาพการทดสอบด้วยตัวตรวจวัดชนิดไดโอดแอเรย์และฟลูออเรสเซนต์ (HPLC-FLD) พบว่าความยาวคลื่นของตัวอย่างที่เหมาะสม คือ 270 นาโนเมตร แบนวิธ 10 นาโนเมตร และความยาวคลื่นอ้างอิง 360 นาโนเมตร แบนวิธ 100 นาโนเมตร มีช่วงในการวัด 0.5-50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ขีดจำกัดในการวัดอยู่ที่ 0.5 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตรวจสอบความแม่นและความเที่ยงของผลการทดสอบที่ได้จาก HPLC-DAD และ HPLC-FLD ด้วยวัสดุอ้างอิงมาตรฐานและตัวอย่างควบคุมคุณภาพ พบว่าค่าเฉลี่ยที่ได้เมื่อเทียบกับค่าอ้างอิง และเปรียบเทียบกับ HPLC-FLD ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95% มีความเที่ยงในการทำซ้ำ HORRAT น้อยกว่า 2 เป็นไปตามเกณฑ์มาตรฐาน แสดงให้เห็นว่าการทดสอบไฮดรอกซีโพรลีนด้วย HPLC-DAD มีความถูกต้องแม่นยำ สามารถเป็นทางเลือกเพื่อนำไปใช้งานควบคู่หรือใช้งานทดแทนกันได้
คำสำคัญ: ตัวตรวจวัดชนิดไดโอดแอเรย์ ตัวตรวจวัดชนิดฟลูออเรสเซนต์ ไฮดรอกซีโพรลีน

Abstract

The purposes of this research were to study the optimum conditions for hydroxyproline testing by high performance liquid chromatography with diode array detector (HPLC-DAD) and to compare with Fluorescence detectors (HPLC-FLD), it was found that the optimum sample wavelength was 270 nm, bandwidth 10 nm, and reference wavelength 360 nm, bandwidth 100 nm with a measurement range of 0.5-50 µg/ml. The detection limit is 0.5 µg/ml. According to validation the accuracy of HPLC-DAD test results with standard reference materials and quality control samples. It was found that the mean obtained compared to the reference value and HPLC-FLD was not significantly different at the 95% confidence level, with HORRAT reproducibility less than 2, meeting the standard criteria. It also showed that the HPLC-DAD was accurate. Moreover, it can be used as an alternative or as a replacement for each other.
Keywords: fluorescence detector, diode array detector, hydroxyproline

บทนำ

แอล-ไฮดรอกซีโพรลีน (L-hydroxyproline) หรือไฮดรอกซีโพรลีน (hydroxyproline) เป็นกรดอะมิโนที่สังเคราะห์ได้จากปฏิกิริยาไฮดรอกซีเลชัน (hydroxylation) ของโพรลีน พบมากถึง 14.4% ในองค์ประกอบของคอลลาเจน (collagen) ของเนื้อเยื่อสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม (Ceuninck *et al*., 2004). ซึ่งจะพบในตำแหน่ง Y ของไตรเปปไทด์ Gly-X-Y ภายในโครงสร้างเกลียวของ collagen โดย hydroxyproline จะช่วยให้โครงสร้างมีความคงตัว และพบในโปรตีนชนิดอื่นปริมาณที่น้อยมาก ดังนั้น hydroxyproline จึงเป็นตัวบ่งชี้ปริมาณ collagen ใน

[1] สถาบันค้นคว้าและพัฒนาผลิตภัณฑ์อาหาร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ กรุงเทพมหานคร 10900
[1] Institute of Food Research and Product Development, Kasetsart University. Kasetsart Bangkok 10900
*Corresponding author: e-mail: j.agroin@gmail.com
Received: *May 26, 2023*, Accepted: *August 12, 2023*, Published: *April 20, 2024*

ตัวอย่างอาหารหรือเครื่องดื่ม ซึ่งสามารถคำนวณปริมาณ collagen ได้จากปริมาณ hydroxyproline คูณด้วย conversion factor ในการทดสอบ hydroxyproline สามารถทดสอบได้หลายวิธี เช่นทดสอบด้วยการวัดสีด้วยเครื่องสเปกโทรโฟโตมิเตอร์ ที่เรียกว่า colorimetric method (AOAC, 2019) หรือทดสอบด้วยเทคนิคโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง (HPLC) ซึ่งเป็นเครื่องมือที่มีใช้ในห้องปฏิบัติการทั่วไป โดยสามารถใช้ร่วมกับตัวตรวจวัดได้หลายชนิดเช่น ใช้ตัวตรวจวัดชนิดฟลูออเรสเซนต์ (HPLC-FLD) ซึ่งมีความไวสูงและเฉพาะเจาะจง แต่จำเป็นต้องใช้ร่วมกับสารก่ออนุพันธ์เพื่อให้เกิดการเรืองแสงก่อนวัดด้วยตัวตรวจวัด โดยสารก่ออนุพันธ์สามารถใช้ได้หลายชนิด เช่น (จรรยา, 2564) ใช้ HPLC-FLD ร่วมกับ 9-Fluorenylmethyl chloroformate (FMOC-Cl) ในการทดสอบเครื่องดื่มที่มีส่วนผสมของคอลลาเจน ส่วน (Dai et al., 2014) ใช้ HPLC-FLD ร่วมกับ o-phthaldialdehyde สำหรับตรวจสอบกรดอะมิโนในอาหาร และยังพบว่าสามารถใช้ร่วมกับตัวตรวจวัดชนิดอัลตราไวโอเลต หรือHPLC-UV ร่วมกับสารก่ออนุพันธ์ 4-Chloro-7-nitrobenzofurazan (NBD-Cl) ในการทดสอบ proline และ hydroxyproline ในหนังหมู (Aditya, 2017) และ (Green et al., 1992) ใช้ HPLC-UV ร่วมกับ phenyl isothiocyanate ในการทดสอบ hydroxyproline ในสารละลาย collagen นอกจากนี้ยังพบว่า (Schwarza *et al*., 2005) ทำการทดสอบ hydroxyproline และกรดอะมิโนในพลาสมา โดยใช้ร่วมกับตัวตรวจวัดชนิดไดโอดแอเรย์ (Diode Array Detector) หรือ HPLC-DAD และ ion-exchange chromatography (IEC) พบว่า การทดสอบด้วย HPLC-DAD ใช้เวลาในการทดสอบมากกว่า แต่มีข้อดี คือ มีช่วงในการทดสอบกว้าง และค่าใช้จ่ายในการบำรุงรักษาคอลัมน์น้อยกว่าการทดสอบด้วย IEC โดย HPLC-DAD มีจุดเด่น คือ สามารถทำการทดสอบสารได้หลายชนิดพร้อมกัน หากสารนั้นมีการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่นต่างกัน เช่น การทดสอบสีสังเคราะห์ในอาหารและเครื่องดื่มด้วย HPLC-DAD ซึ่งสามารถทดสอบได้ถึง 11 ชนิดพร้อมกัน (Xiao-Li *et al*., 2016) และ (Rejczak and Tuzimski, 2017) ซึ่งจุดเด่นนี้ทำให้ยังมีการใช้งานอย่างแพร่หลายในห้องปฏิบัติการทั่วไป นอกจากนี้มีการศึกษาเปรียบเทียบการใช้ HPLC-DAD ร่วมกับสารทำอนุพันธ์ o-phthaldialdehyde ทดสอบ fumonisin ในข้าวโพด พบว่าสามารถใช้ HPLC-DAD ทดแทน HPLC-FLD ได้โดยให้ผลการทดสอบที่ถูกต้องเช่นเดียวกัน (Ndube *et al.,* 2009)

ห้องปฏิบัติการศูนย์บริการประกันคุณภาพอาหาร สถาบันค้นคว้าและพัฒนาผลิตภัณฑ์อาหาร ซึ่งเป็นห้องปฏิบัติการที่ให้บริการวิเคราะห์/ทดสอบอาหาร วัตถุดิบ และสารเสริมคุณภาพต่าง ๆ รวมทั้งให้บริการทดสอบ hydroxyproline ที่เป็นส่วนประกอบของคอลลาเจนในผลิตภัณฑ์ต่าง ๆ โดยให้บริการมาอย่างต่อเนื่อง ซึ่งจากข้อมูลการให้บริการวิเคราะห์/ทดสอบ และปริมาณการใช้งานเครื่องมือที่ผ่านมา พบว่าในการทดสอบ hydroxyproline เดิมใช้เครื่อง HPLC-FLD ซึ่งมีการใช้ร่วมกับรายการทดสอบอื่น ๆ จึงทำให้ประสบปัญหาเกิดการรอคอยเป็นเวลานาน และเครื่องมือถูกใช้งานหนัก นอกจากนี้พบว่ายังมีเครื่องมือที่ยังมีการใช้งานน้อย ไม่เต็มประสิทธิภาพ ทางผู้วิจัยจึงทำการศึกษาหาสภาวะที่เหมาะสมในการทดสอบ hydroxyproline ด้วย HPLC-DAD เพื่อใช้เป็นทางเลือกทดแทนหรือใช้ควบคู่กับเครื่องมือเดิมที่ใช้อยู่ได้ เพื่อให้เกิดความคุ้มค่า และเกิดประโยชน์สูงสุด และสามารถสนองความต้องการของลูกค้าได้อย่างรวดเร็ว

วัตถุประสงค์การวิจัย

1. เพื่อศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการทดสอบ hydroxyproline ด้วยเทคนิคโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูงร่วมกับตัวตรวจวัดชนิดไดโอดแอเรย์ (HPLC-DAD)

2. เพื่อเปรียบเทียบประสิทธิภาพการทดสอบ hydroxyproline ด้วยตัวตรวจวัดชนิดไดโอดแอเรย์ (DAD) และฟลูออเรสเซนต์ (FLD)

ระเบียบวิธีวิจัย

เครื่องมือและวัสดุ

เครื่อง HPLC รุ่น HP 1260 infinity II Fluorescence detector (HPLC-FLD) และ diode array detector (HPLC-DAD) บริษัท Agilent Technologies, คอลัมน์ ACE 5 C18 (4.6x150 mm, 5 µm diameter) บริษัท advanced chromatography technologies, สารมาตรฐาน 4-Hydroxyproline purity >99% ยี่ห้อ TCI chemical 9-Fluorenylmethyl chloroformate (FMOC-Cl) ยี่ห้อ Sigma-Aldrich (assay 99% for HPLC), methanol (HPLC grade) และ acetonitrile (HPLC grade) ยี่ห้อ Scharlau, boric acid, sodium dihydrogen

phosphate (AR grade) และ sodium hydroxide (AR grade) ยี่ห้อ Merck hydrochloric acid (AR grade) ยี่ห้อ Labscan วัสดุอ้างอิงมาตรฐาน Standard Reference Material SRM 1546a meat homoginized (NIST) ที่มีค่า hydroxyproline ตามใบรับรอง (certified value) เท่ากับ 0.23±0.02 กรัม/100 กรัม และตัวอย่างเครื่องดื่มที่มีส่วนผสมของคอลลาเจน มี hydroxyproline เท่ากับ 0.074±0.006 กรัม/100 กรัม ใช้เป็นตัวอย่างควบคุมคุณภาพ, (QC sample)

การเตรียมสารละลายมาตรฐานและการเตรียมตัวอย่าง

เตรียมสารละลายมาตรฐาน 4-Hydroxyproline ละลายใน 0.02 M HCl ให้มีความเข้มข้น 0.1, 0.5, 1, 5, 10, 25 และ 50 µg/ml เพื่อสร้างกราฟมาตรฐาน เตรียม 0.4 M borate buffer pH 9.5 โดยชั่ง boric acid 2.47 กรัม ละลายด้วยน้ำกลั่นและปรับ pH 9.5 ด้วย 4 M NaOH และ 50% FMOC-Cl ใน acetonitrile

เตรียมตัวอย่างทดสอบโดยชั่งตัวอย่างเครื่องดื่มที่มีส่วนผสมของคอลลาเจน 0.5-1.0 กรัม ใส่หลอดสำหรับย่อยตัวอย่าง เติม 6 M HCl 5 มิลลิลิตร นำไปย่อยด้วยเครื่อง block digestion ที่อุณหภูมิ 110 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง (จรรยา, 2564) เมื่อครบกำหนดเวลา นำสารละลายตัวอย่างที่เจือจางด้วยน้ำกลั่น จากนั้นนำสารละลายส่วนใสจากข้างต้น 125 ไมโครลิตร เติมสารละลาย 0.4 M borate buffer pH 9.5 ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร ทำอนุพันธ์ด้วย 50% FMOC-Cl ปริมาตร 125 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันโดยเขย่าอย่างรุนแรงด้วยเครื่องผสม (vortex mixer) จนสารละลายใส ตั้งทิ้งไว้ 1 นาที กรองสารละลายด้วย Nylon syringe filter ขนาด 13 มิลลิเมตร, 0.45 ไมครอน ใส่ขวดสีชาสำหรับวิเคราะห์ด้วยเครื่อง HPLC

ขั้นตอนวิธีการดำเนินการ

1.การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการทดสอบ hydroxyproline ด้วย HPLC-DAD

1.1 ศึกษาความยาวคลื่นในการทดสอบตัวอย่าง (sample wavelength) และความยาวคลื่นอ้างอิง (reference wavelength) ที่เหมาะสม ดำเนินการโดยเตรียมอนุพันธ์ของสารละลายมาตรฐาน hydroxyproline และนำไปสแกน spectrum ด้วย HPLC-DAD ที่ 200-900 นาโนเมตร เพื่อหาความยาวคลื่นที่ดูดกลืนแสงสูงสุด (maximum absorbance wavelength : λ max) สำหรับกำหนด sample wavelength และศึกษา reference wavelength ที่เหมาะสม โดยทำการเปรียบเทียบ drift, baseline noise และ signal/noise ในการทดสอบโดยใช้และไม่ใช้ reference wavelength

1.2 ศึกษา bandwidth ที่เหมาะสมของ sample wavelength โดยศึกษาค่า areas และ baseline noise โดยใช้ bandwidth 4, 10 และ 16 นาโนเมตร และเปรียบเทียบ bandwidth สำหรับ reference wavelength ที่ 316 นาโนเมตร (อ้างอิงจากค่า emission wavelength ของ hydroxyproline) และ reference wavelength ที่ได้จากข้อ 1.1

1.3 เมื่อได้ sample wavelength และ reference wavength ที่เหมาะสมแล้ว ทำการทดสอบกับตัวอย่างวัสดุอ้างอิงมาตรฐาน SRM 1546a และตัวอย่างควบคุมคุณภาพ โดยใช้เฟสเคลื่อนที่ A เป็น 0.05 M NaH_2PO_4 pH 7.8 และเฟสเคลื่อนที่ B เป็น methanol : acetonitrile : DI water ในอัตราส่วน 45 : 45 : 10 (v/v/v) อัตราการไหล 0.7 มิลลิลิตรต่อนาที อุณหภูมิคอลัมน์ 35 องศาเซลเซียส สภาวะการไหลของเฟสเคลื่อนที่แบบผสม (Gradient) เริ่มต้น เฟสเคลื่อนที่ A 60% เฟสเคลื่อนที่ B 40% จนถึงเฟสเคลื่อนที่ B 100% ภายในเวลา 15 นาที

2. การทดสอบ hydroxyproline ด้วย HPLC-FLD

ทำการทดสอบ hydroxyproline โดยใช้ HPLC-FLD กำหนดความยาวคลื่นกระตุ้น (Excitation wavelengths, Ex) 270 นาโนเมตร และความยาวคลื่นเรืองแสง (emission wavelengths, Em) ที่ 316 นาโนเมตร โดยใช้ตัวอย่างทดสอบ ตัวทำละลายเฟสเคลื่อนที่และคอลัมน์ชนิดเดียวกัน โดยดัดแปลงวิธีการทดสอบจาก (จรรยา, 2564)

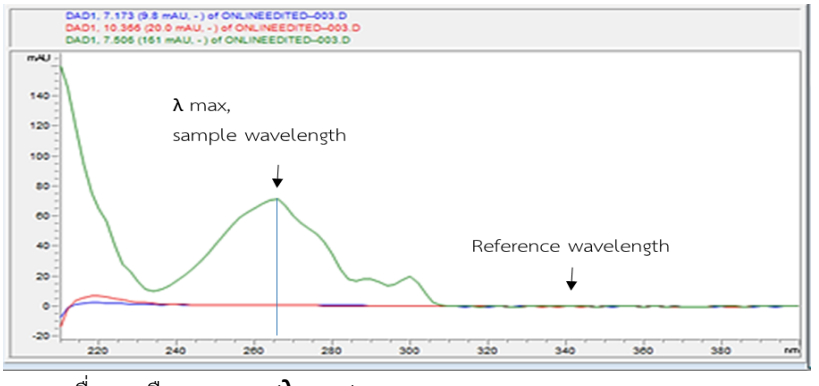
3. เปรียบเทียบประสิทธิภาพการทดสอบ hydroxyproline และตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีทดสอบ hydroxyproline ด้วย HPLC-DAD และ HPLC-FLD ตรวจสอบขีดจำกัดในการตรวจวัด (Limit Of Detection, LOD) ซึ่งเป็นค่าความเข้มข้นต่ำที่สุดที่เครื่องมือสามารถตรวจวัดได้ (Instrumental Detection Limit, IDL) โดยทำเจือจางสารละลายมาตรฐานที่มีความเข้มข้น 0.1-1.0 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ทำการเปรียบเทียบสัญญาณ

(signal) ของสารที่วัดได้กับสัญญาณรบกวน (noise) หรือ signal-to-noise ratio โดยค่า signal-to-noise ratio ที่ยอมรับควรมากกว่า 3 ตรวจสอบช่วงของการวัดและความเป็นเส้นตรง ด้วยกราฟมาตรฐานความสัมพันธ์เชิงเส้นตรงระหว่างความเข้มข้นสารมาตรฐาน hydroxyproline กับพื้นที่ใต้กราฟ ใช้ค่าสัมประสิทธิ์การตัดสินใจ หรือ R^2 เป็นเกณฑ์พิจารณาความเป็นเส้นตรงของกราฟมาตรฐาน โดย $R^2 \geq 0.995$ ทดสอบตัวอย่างวัสดุอ้างอิงมาตรฐาน SRM 1546a และตัวอย่างควบคุมคุณภาพจำนวน 7 ซ้ำ และตรวจสอบความเที่ยงของการทำซ้ำ (precision) โดยใช้เกณฑ์ HORRAT ไม่เกิน 2 ตามวิธี (AOAC, 2012) ตรวจสอบความแม่น (accuracy) โดยทดสอบตัวอย่างวัสดุอ้างอิงมาตรฐาน SRM 1546a เปรียบเทียบค่าเฉลี่ยที่ทดสอบได้กับค่ามาตรฐานตามใบรับรอง (certified value) และเปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยที่ทดสอบได้จาก HPLC-DAD และ HPLC-FLD โดยใช้สถิติ t-test ที่ระดับความเชื่อมั่น 95%

ผลการวิจัย

การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการทดสอบ hydroxyproline ด้วย HPLC-DAD

จากการสแกน spectrum ของสารละลาย hydroxyproline ด้วย HPLC-DAD พบว่า ความยาวคลื่นที่สามารถตรวจพบ hydroxyproline อยู่ระหว่าง 240-300 นาโนเมตร โดยความยาวคลื่นที่มีการดูดกลืนแสงและให้ค่าสัญญาณสูงสุดอยู่ที่ประมาณ 265-270 นาโนเมตร และความยาวคลื่นช่วง 310-400 นาโนเมตร เป็นช่วงที่ตรวจไม่พบ hydroxyproline ดังนั้นในงานวิจัยนี้จึงกำหนดความยาวคลื่นที่ใช้ในการทดสอบ hydroxyproline โดยใช้ค่าเฉลี่ยของความยาวคลื่นที่สามารถตรวจพบ hydroxyproline ได้แก่ sample wavelength เท่ากับ 270 นาโนเมตร แสดงดังภาพที่ 1 และตารางที่ 1



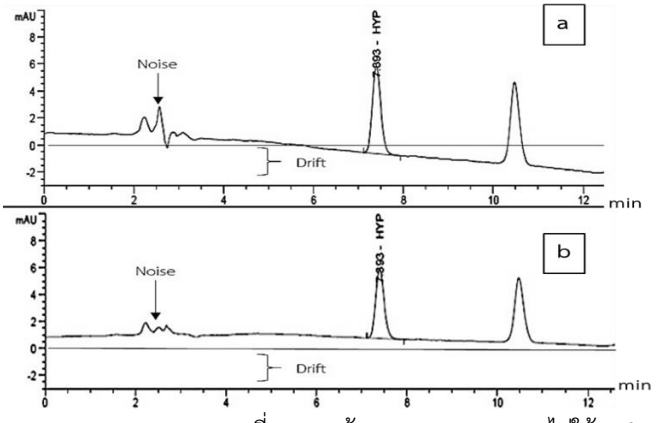
ภาพที่ 1 ความยาวคลื่นดูดกลืนแสงสูงสุด (λ max) ของสารละลายมาตรฐาน hydroxyproline

ตารางที่ 1 ค่า drift noise และ signal/noise เมื่อทดสอบด้วย HPLC-DAD แบบใช้และไม่ใช้ค่า reference wavelength

determination	with reference wavelength	with out reference wavelength
drift (mAU/h)	-5.399	-22.238
ASTM baseline noise (mAU)	0.0466	0.0804
signal/noise	5.1	3.2

จากการดูดกลืนแสงของ hydroxyproline ตามภาพที่ 1 ช่วงความยาวคลื่น 310-400 นาโนเมตร ซึ่งเป็นช่วงที่ตรวจไม่พบ hydroxyproline จึงเหมาะสำหรับใช้เป็น reference wavelength และเมื่อศึกษาผลการใช้ reference wavelength พบว่า เมื่อใช้ reference wavelength ทำให้ค่า drift จะลดลง จาก -22.238 mAU/h เหลือ -5.399 mAU/h และสัญญาณรบกวนที่ baseline หรือ baseline noise ลดลงจาก 0.0804 mAU เหลือ 0.0466 mAU ส่วน signal/noise มีค่าสูงขึ้นจาก 3.2 เป็น 5.1 ดังนั้นในงานวิจัยนี้จึงทำการทดสอบโดยการใช้ reference wavelength โดยกำหนดความยาวคลื่นของ reference wavelength เท่ากับ 360 นาโนเมตร เนื่องจากการใช้ reference wavelength จะช่วยลดการเปลี่ยนแปลงของ baseline ของตัวทำละลายเคลื่อนที่

โดยเฉพาะในระบบ gradient ทำให้เห็นสัญญาณของสารที่ต้องการทดสอบชัดเจนขึ้น ส่งผลให้สัดส่วนของสัญญาณตัวอย่างต่อสัญญาณรบกวน (signal/noise) สูงขึ้น แสดงดังภาพที่ 2



ภาพที่ 2 โครมาโทแกรมของ hydroxyproline ที่ทดสอบด้วย HPLC-DAD แบบไม่ใช้ reference wavelength (a) และแบบใช้ reference wavelength (b)

จากการศึกษาผลของการใช้ค่า bandwidth สำหรับ sample wavelength ที่ระดับต่าง ๆ เมื่อกำหนดค่า reference wavelength คงที่ พบว่าเมื่อเพิ่ม bandwidth จาก 4 นาโนเมตร เป็น 10 นาโนเมตร จะทำให้ค่า baseline noise ลดลงจาก 0.1120 mAU เป็น 0.1110 mAU แต่เมื่อเพิ่ม bandwidth 16 นาโนเมตร ค่า baseline noise จะเพิ่มขึ้นเป็น 0.1134 mAU ส่วนค่า areas เมื่อใช้ bandwidth 4 นาโนเมตร และ 10 นาโนเมตร จะมี areas เท่ากับ 917.95819 mAU*s และ 920.10815 mAU*s ตามลำดับ และมีค่าลดลงเหลือ 894.81012 mAU*s เมื่อใช้ bandwidth 16 นาโนเมตร ในการทดสอบนี้จึงเลือกใช้ bandwidth สำหรับ sample wavelength เท่ากับ 10 นาโนเมตร เนื่องจากมี baseline noise ต่ำสุด และมี areas สูงสุด แสดงดังตารางที่ 2 และจากการศึกษา bandwidth สำหรับค่า reference wavelength ที่ 360 นาโนเมตร พบว่า เมื่อ bandwidth เพิ่มขึ้น ค่า baseline noise ลดลง ส่วน signal/noise จะเพิ่มขึ้นตามลำดับ โดยการใช้ bandwidth 100 นาโนเมตร จะมีค่า baseline noiseต่ำสุดและ signal/noise สูงที่สุด แสดงดังตารางที่ 3

จากการศึกษาค่า sample wavelength และ bandwidth ที่เหมาะสม จึงกำหนดค่าที่ใช้ในการทดสอบ hydroxyproline ด้วย HPLC-DAD คือ sample wavelength 270 นาโนเมตร bandwidth 10 นาโนเมตร และ reference wavelength 360 นาโนเมตร bandwidth 100 นาโนเมตร

ตารางที่ 2 ค่า areas และ baseline noise เมื่อทดสอบด้วย HPLC-DAD โดยใช้ bandwidth 4 10 และ 16 นาโนเมตร

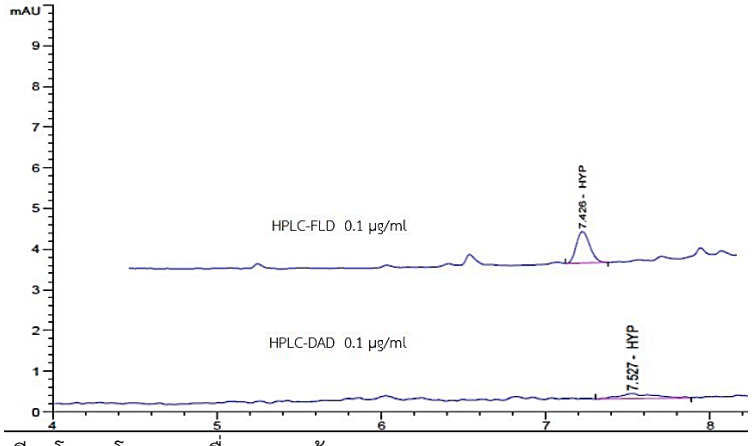
sample wavelength (nm)	Bandwidth (nm)	Areas (mAU*s)	ASTM baseline noise (mAU)
270	4	917.95819	0.1120
270	10	920.10815	0.1110
270	16	894.81012	0.1134

ตารางที่ 3 ค่า areas, baseline noise และ signal/noise ของ reference wavelength เมื่อทดสอบด้วย HPLC-DAD โดยใช้ bandwidth 4 10 30 และ 100 นาโนเมตร

reference bandwidth (nm)	areas (mAU*s)	ASTM baseline noise (mAU)	signal/noise
4	847.85	1.55	547.49
10	848.07	1.55	547.64
30	848.12	1.55	548.17
100	847.63	1.54	549.23

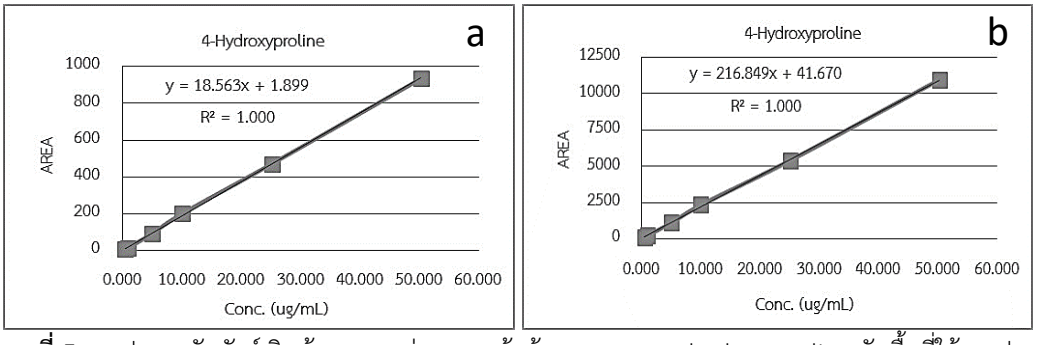
ผลการศึกษาเปรียบเทียบการทดสอบ hydroxyproline ด้วย HPLC-DAD และ HPLC-FLD

จากการตรวจสอบขีดจำกัดในการตรวจวัดของเครื่องมือ (Limit Of Detection, LOD) ซึ่งเป็นค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่ HPLC-FLD และ HPLC-DAD ทดสอบได้ พบว่าที่ระดับความเข้มข้นเท่ากัน 0.1 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร เมื่อทดสอบด้วย HPLC-FLD จะให้สัญญาณและพื้นที่ใต้กราฟสูงกว่าเมื่อทดสอบด้วย HPLC-DAD แสดงดังภาพที่ 4 และเมื่อทดสอบที่ความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถเห็นสัญญาณของสารที่ต้องการทดสอบสูงกว่าสัญญาณรบกวน 3 เท่า พบว่า ความเข้มข้นต่ำสุดจาก HPLC-FLD เท่ากับ 0.1 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร และ HPLC-DAD เท่ากับ 0.5 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ตามลำดับ



ภาพที่ 4 เปรียบเทียบโครมาโทแกรม เมื่อทดสอบด้วย HPLC-FLD และ HPLC-DAD

เมื่อทำการทดสอบ hydroxyproline ด้วย HPLC-DAD และ HPLC-FLD โดยใช้ตัวอย่างทดสอบ ตัวทำละลายเคลื่อนที่ และ คอลัมน์ชนิดเดียวกัน พบว่าเวลาในการชะสารของ HPLC-DAD ใช้เวลา 7.527 นาที มีช่วงการวัด 0.5-50 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ส่วน HPLC-FLD ใช้เวลาในการชะสาร 7.426 นาที มีช่วงการวัด 0.1-50 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร เมื่อสร้างกราฟความสัมพันธ์เชิงเส้นตรงระหว่างความเข้มข้นสารมาตรฐาน hydroxyproline กับพื้นที่ใต้กราฟที่ได้ พบว่า กราฟมาตรฐานมีความเป็นเส้นตรง โดยมีค่าสัมประสิทธิ์การตัดสินใจ หรือ R^2 เท่ากับ 1 แสดงดังภาพที่ 5



ภาพที่ 5 กราฟความสัมพันธ์เชิงเส้นตรงระหว่างความเข้มข้นสารมาตรฐาน hydroxyproline กับพื้นที่ใต้กราฟ จาก HPLC-DAD (a) และ HPLC-FLD (b)

ผลการตรวจสอบความใช้ได้ของวิธี โดยทดสอบความแม่นและความเที่ยงด้วยตัวอย่างวัสดุอ้างอิงมาตรฐาน SRM 1546a ที่มีค่าตามใบรับรอง (certified value) เท่ากับ 0.23±0.02 กรัม/100 กรัม และตัวอย่างควบคุมคุณภาพที่มี hydroxyproline เท่ากับ 0.074±0.006 กรัม/100 กรัม พบว่าค่าเฉลี่ยที่ได้จากการทดสอบด้วยตัวอย่างวัสดุอ้างอิงมาตรฐาน SRM 1546a จาก HPLC-DAD และ HPLC-FLD เท่ากับ 0.219±0.021 กรัม/

100 กรัม และ 0.230±0.017 กรัม/100 กรัม ตามลำดับ ส่วนค่าเฉลี่ยจากการทดสอบตัวอย่างควบคุมคุณภาพด้วย HPLC-DAD และ HPLC-FLD เท่ากับ 0.072±0.007 กรัม/100 กรัม และ 0.076±0.001 กรัม/100 กรัม ตามลำดับ เมื่อเปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยที่ได้จากการทดสอบด้วย HPLC-DAD และ HPLC-FLD พบว่าไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95% เมื่อทดสอบความเที่ยงจากการทำซ้ำโดยประเมินด้วย HORRAT พบว่า การทดสอบด้วย HPLC-DAD และ HPLC-FLD มีค่า HORRAT น้อยกว่า 2 ซึ่งเป็นไปตามเกณฑ์มาตรฐาน (AOAC, 2012) ดังตารางที่ 4

ตารางที่ 4 ทดสอบความแม่นและความเที่ยงของวิธี โดยใช้วัสดุอ้างอิงมาตรฐาน SRM 1546a และตัวอย่างควบคุมคุณภาพ

	concentration (g/100 g)			
Information	SRM 1546a		QC sample	
	HPLC-FLD	HPLC-DAD	HPLC-FLD	HPLC-DAD
Means (n=7)	0.230^{a}±0.017	0.219^{a}±0.021	0.076^{b}±0.001	0.072^{b}±0.007
HORRAT	1.48	1.90	0.57	1.45

Remark: Means with different letters are significantly different ($p \leq 0.05$)

สรุปผลการวิจัย

จากการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการทดสอบ hydroxyproline ด้วย HPLC-DAD พบว่า sample wavelength ที่เหมาะสมในการทดสอบ คือ 270 นาโนเมตร bandwidth 10 นาโนเมตร และ reference wavelength คือ 360 นาโนเมตร bandwidth 100 นาโนเมตร โดยมีช่วงการทดสอบ 0.5-50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร สามารถทดสอบได้ต่ำสุดที่ 0.5 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ส่วนการทดสอบ hydroxyproline ด้วย HPLC-FLD มีช่วงในการทดสอบ 0.1-50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร สามารถทดสอบได้ต่ำสุดที่ 0.1 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ทำการตรวจสอบความถูกต้องของวิธี โดยใช้ตัวอย่างวัสดุอ้างอิงมาตรฐาน SRM 1546a พบว่า ค่าเฉลี่ยที่ทดสอบได้จาก HPLC-DAD และ HPLC-FLD เท่ากับ 0.219±0.021 กรัม/100 กรัม และ 0.230±0.017กรัม/100 กรัม ตามลำดับ ซึ่งอยู่ในช่วง certified value (0.23±0.02 กรัม/100 กรัม) และค่าเฉลี่ยจากการทดสอบด้วยด้วยตัวอย่างควบคุมคุณภาพจาก HPLC-DAD และ HPLC-FLD เท่ากับ 0.072±0.007 กรัม/100 กรัม และ 0.076±0.001 กรัม/100 กรัม ตามลำดับ เมื่อทำการตรวจสอบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยด้วยสถิติ t-test พบว่าผลการทดสอบที่ได้จาก HPLC-DAD และ HPLC-FLD ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95% ส่วนการทดสอบความเที่ยงของการทำซ้ำด้วยเครื่อง HPLC-DAD และ HPLC-FLD โดยใช้เกณฑ์ HORRAT ในตัวอย่าง SRM 1546a ได้เท่ากับ 1.48 และ 1.90 ตามลำดับ และในตัวอย่างควบคุมคุณภาพ ได้เท่ากับ 0.57 และ 1.45 ตามลำดับ ซึ่งมีค่าน้อยกว่า 2 แสดงให้เห็นว่าวิธีทดสอบ hydroxyproline ด้วย HPLC-DAD และ HPLC-FLD มีความถูกต้องแม่นยำและมีความเที่ยงในการทำซ้ำ เป็นไปตามเกณฑ์การตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีตามมาตรฐาน AOAC ไม่แตกต่างกัน

อภิปรายผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ

ในการวิจัยครั้งนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการทดสอบ hydroxyproline ด้วย HPLC-DAD การกำหนดค่า wavelength และ bandwidth ที่เหมาะสม ซึ่งมีผลต่อประสิทธิภาพการแยกสาร โดยการใช้ reference wavelength และ bandwidth จะช่วยลดการเปลี่ยนแปลงของ base line ทำให้สัญญาณรบกวนลดลง เมื่อทำการทดสอบในระบบ gradient ส่งผลให้สัญญาณตัวอย่างชัดเจนขึ้น อย่างไรก็ตามการเพิ่ม bandwidth กว้างเกินไป ถึงแม้ว่าจะทำให้สัญญาณรบกวนน้อยลง แต่มีผลให้ค่าสัญญาณของสารที่ต้องการตรวจสอบต่ำลงด้วยเช่นกัน เนื่องจากจะทำให้ค่าเฉลี่ยของการดูดกลืนแสงลดลง ทำให้เครื่องมือวัดค่า wavelength ที่ได้ไม่ตรงกับค่าที่แท้จริงของสารที่ต้องการทดสอบ ซึ่งสอดคล้องกับคำแนะนำในการกำหนดค่าเริ่มต้นในการทดสอบด้วยเครื่อง HPLC-DAD ของ (Agilent, 2013) และจากการเปรียบเทียบประสิทธิภาพ

การทดสอบด้วย HPLC-DAD พบว่า ใช้เวลาในการทดสอบช้ากว่า HPLC-FLD เล็กน้อย ส่วนผลการทดสอบที่ได้ไม่แตกต่างจากค่าตามใบรับรอง และเมื่อเปรียบเทียบกับผลการทดสอบด้วย HPLC-FLD พบว่าไม่แตกต่างกันทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญ มีความเที่ยงในการทดสอบซ้ำ น้อยกว่า 2 ซึ่งเป็นไปตามเกณฑ์มาตรฐานการตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีทดสอบ แสดงให้เห็นว่าการทดสอบ hydroxyproline ด้วย HPLC-DAD ให้ผลการทดสอบที่ถูกต้องสามารถใช้เป็นทางเลือกเพื่อเพิ่มประสิทธิภาพในการให้บริการหรือเพื่อใช้งานทดแทน HPLC-FLD ที่มีการใช้งานหนัก ซึ่งเป็นไปตามวัตถุประสงค์ของการวิจัย ทั้งนี้ในการทดสอบด้วยเครื่อง HPLC ที่มีตัวตรวจวัดแต่ละชนิด มีจุดเด่น จุดด้อยแตกต่างกัน จุดเด่นของ HPLC-FLD เหมาะสำหรับใช้ทดสอบสารที่มีปริมาณต่ำได้ดีกว่า HPLC-DAD สอดคล้องกับ (Ndube *et al*., 2009) ที่ศึกษาเปรียบเทียบการใช้ HPLC-DAD และ HPLC-FLD ร่วมกับสารทำอนุพันธ์ o-phthaldialdehyde ทดสอบ fumonisin ในข้าวโพด พบว่า การทดสอบด้วย HPLC-FLD สามารถทดสอบได้ในระดับต่ำกว่าการใช้ HPLC-DAD ถึง 20 เท่า ส่วนจุดเด่นของเครื่อง HPLC-DAD คือ สามารถทำการทดสอบสารได้หลายชนิดในเวลาเดียวกัน หากสารนั้น ๆ มีค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่นต่างกัน เช่น การทดสอบสีสังเคราะห์ในอาหาร (Rejczak and Tuzimski , 2017) ถึงแม้ว่า HPLC-DAD ไม่เหมาะสมในการทดสอบสารที่ต้องการที่มีปริมาณน้อยได้ ผู้ใช้งานสามารถใช้ตัวอย่างในปริมาณเพิ่มขึ้น หรือทำการปรับฟังก์ชันการใช้งานของเครื่องมือด้วยการเพิ่มปริมาณสารที่เข้าเครื่องให้สูงขึ้น ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับความเชี่ยวชาญของผู้ใช้งานที่จะต้องศึกษาเทคนิคการใช้เครื่องมือเพิ่มขึ้น นอกจากนี้ควรตรวจสอบความเหมาะสมของระบบ (system suitability testing) ของวิธีทางโครมาโทกราฟี ก่อนการทดสอบด้วยวิธีที่พัฒนาขึ้นเพื่อใช้พิจารณาความเหมาะสมของระบบในการปฏิบัติงานประจำ และควรศึกษาเพิ่มเติมในตัวอย่างชนิดอื่น ๆ ซึ่งองค์ประกอบที่มีอยู่ในตัวอย่างแต่ละชนิดอาจมีผลต่อการทดสอบด้วยเครื่อง HPLC-DAD ได้เช่นกัน

แต่อย่างไรก็ตามสามารถใช้ HPLC-DAD ทดแทน HPLC-FLD ได้โดยให้ผลการทดสอบที่ถูกต้อง ซึ่งเป็นการใช้เครื่องมือที่มีอยู่อย่างคุ้มค่า และเกิดประโยชน์สูงสุด โดยการเลือกเครื่องมือที่มีการใช้งานน้อย คือ เครื่อง HPLC-DAD เพื่อนำมาใช้งานทดแทนหรือใช้งานควบคู่กันไปกับเครื่องมือที่มีการใช้งานหนัก เช่น HPLC-FLD ทำให้ลดความเสียหายจากการใช้งานเครื่องมือเกินกำลัง นอกจากนี้ยังสามารถช่วยทำให้การบริการทดสอบทำได้รวดเร็วขึ้น ลดการรอคอย เนื่องจากสามารถใช้งานทั้งสองเครื่องควบคู่กันได้ ตรงตามวัตถุประสงค์ในการศึกษาครั้งนี้

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้สำเร็จลงด้วยดี จากการอนุเคราะห์ของหัวหน้าศูนย์บริการประกันคุณภาพอาหาร สถาบันค้นคว้าและพัฒนาผลิตภัณฑ์อาหาร ที่สนับสนุนเครื่องมือและอุปกรณ์ต่าง ๆ อีกทั้งยังให้การสนับสนุนบุคลากรพัฒนาความรู้ต่อยอดจากงานประจำสู่งานวิจัย เพื่อตอบสนองความต้องการของผู้ใช้บริการของห้องปฏิบัติการศูนย์บริการประกันคุณภาพอาหาร ผู้วิจัยต้องขอขอบคุณมา ณ โอกาสนี้

เอกสารอ้างอิง

จรรยา แสงเขียว. 2564. วิธีทดสอบหาปริมาณคอลลาเจนในผลิตภัณฑ์เครื่องดื่มที่มีส่วนผสมของคอลลาเจนไฮโดรไลเซสด้วยเทคนิคโครมาโทรกราฟีของเหลวสมรรถนะสูงร่วมกับตัวตรวจวัดชนิดฟลูออเรสเซนส์. วารสารวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มทร. สุวรรณภูมิ. 5(1): 34-45.

Aditya, A. 2017. Isolation purification and collagen characterization from porcine skin, collagen: analysis of the glycine proline and hydroxyproline components using of High Performance Liquid Chromatography. International Journal of Applied Pharmaceutics. 10(1): 294-298.

Agilent Technologies. 2013. Optimizing the Detector. 101-106. in Agilent 1200 Infinity Series DAD User Manual. Agilent Technologies. Hewlett-Packard-Strasse, Waldbronn. 276 pages.

AOAC. 2012. Guidelines for Single-Laboratory Validation of Chemical Methods for Dietary Supplements and Botanicals. Official Methods of Analysis of the Association of Official Analytical Chemists. Official Methods of Analysis of AOAC International. 19 Edition, Appendix K. AOAC. Washington DC.

AOAC 2019. Official method 990.26, Official methods of Analysis of the Association of Official Analytical Chemists. Official Methods of Analysis of AOAC International. 21 Edition, AOAC, Washington DC.

Dai, Z., Wu, Z., Jia, S. and W. Guoyao. 2014. Analysis of amino acid composition in proteins of animal tissues and foods as pre-column o-phthaldialdehyde derivatives by HPLC with fluorescence detection. Journal of Chromatography B. 964: 116-127. DOI: 10.1016/j.jchromb.2014.03.025.

De Ceuninck, F., Sabatini, M. and P. Philippe. 2004. Cartilage and Osteoarthritis (Methods in Molecular Medicine, 101) Humana Press Inc. Totowa. 360 pages.

Green, G.D. and R. Krystle. 1992. Determination of hydroxyproline by high pressure liquid chromatography. Analytical Biochemistry. 201: 265-269.

Ndube, N., Westhuizen, L. and S.S. Gordon. 2009. Determination of fumonisins in maize by HPLC with ultraviolet detection of o-phthaldialdehyde derivatives. Mycotox Research. 25: 225-228.

Rejczak, T. and T. Tomasz. 2017. Application of High-Performance Liquid Chromatography with Diode Array Detector for Simultaneous Determination of 11 Synthetic Dyes in Selected Beverages and Foodstuffs. Food Analysis Methods. 10: 3572-3588.

Schwarza, L.E., Robertsa, W.L. and P. Marzia. 2005. Analysis of plasma amino acids by HPLC with photodiode array and fluorescence detection. Clinica Chimica Acta. 354: 83-90.

Xiao-Li, Y., Hai-Long, W., Hui-Wen, G., Yong, H., Li, W., Hui, X., Shou-Xia, X. and R.Q. Yu. 2016. Identification of synthetic colorants using HPLC-DAD and chemometrics. Journal of Chromatography A. 1435: 75-84.