

วิธีไฮโดรฟิลิกอินเตอร์แอคชันลิควิดโครมาโทกราฟี  
แบบใหม่ที่ปราศจากการเตรียมอนุพันธ์  
สำหรับหาปริมาณฟีนิลอลานีนและไทโรซีน

A New Derivatization-Free Hydrophilic Interaction Liquid  
Chromatography (HILIC) Method for the Quantification of  
Phenylalanine and Tyrosine

วรารุช ตียพงษ์พัฒนา\* และวรพรต วณิชชานันท์

สาขาวิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์

ศูนย์รังสิต ตำบลคลองหนึ่ง อำเภอคลองหลวง จังหวัดปทุมธานี 12120

Warawut Tiyapongpattana\* and Woraphot Wanichalanant

Department of Chemistry, Faculty of Science and Technology, Thammasat University,

Rangsit Centre, Khlong Neung, Khlong Luang, Pathum Thani 12120

บทคัดย่อ

งานวิจัยนี้ได้เสนอวิธีใหม่สำหรับการหาปริมาณฟีนิลอลานีนและไทโรซีนแบบปราศจากการเตรียมอนุพันธ์ด้วยเทคนิคไฮโดรฟิลิกอินเตอร์แอคชันลิควิดโครมาโทกราฟี (hydrophilic interaction liquid chromatography, HILIC) โดยแยกแบบ HILIC ด้วยคาร์ตคอลลัมน์ (3 มิลลิเมตร x 10 มิลลิเมตร x 3 ไมโครเมตร) และคอลลัมน์สำหรับวิเคราะห์ (3 มิลลิเมตร x 150 มิลลิเมตร x 3 ไมโครเมตร) ที่มีวัฏภาคหนึ่ง คือ หมู่ไฮดรอกซีโพรพิลที่สร้างพันธะกับซิลิกาเจล วัฏภาคเคลื่อนที่ประกอบด้วยอะซิโตนไนโตรส : 50 mM แอมโมเนียมฟอสเฟต pH 3 อัตราส่วน 84 : 16 (v/v) ที่อัตราการไหล 0.8 มิลลิลิตรต่อนาที ฟีนิลอลานีนและอัลฟา-เมทิลฟีนิลอลานีน (สารมาตรฐานภายใน) ตรวจวัดที่ความยาวคลื่น 210 นาโนเมตร และไทโรซีนที่ 225 นาโนเมตร กราฟมาตรฐานภายในมีความเป็นเส้นตรงในช่วง 1-500 มิลลิกรัมต่อลิตร ( $r^2 = 0.9999$ ) ซีดจำกัดการตรวจวัดของฟีนิลอลานีนและไทโรซีน 0.7 และ 0.3 มิลลิกรัมต่อลิตร ตามลำดับ ซีดจำกัดการหาปริมาณของฟีนิลอลานีนและไทโรซีน 1 และ 0.8 มิลลิกรัมต่อลิตร ตามลำดับ แล้วนำวิธีที่พัฒนาขึ้นไปวิเคราะห์ปริมาณฟีนิลอลานีนและไทโรซีนในตัวอย่างผลิตภัณฑ์เสริมอาหาร 8 ตัวอย่าง พบว่าอยู่ในช่วง 149-577 และ 396-499 มิลลิกรัมต่อแคปซูล ซึ่งมีค่าร้อยละการกลับคืนอยู่ในช่วง 95-102 และ 97-102 ตามลำดับ ข้อดีของวิธีที่พัฒนาขึ้นนี้ คือ ง่าย สามารถวิเคราะห์ตัวอย่างพร้อมกันอย่างรวดเร็ว (ภายใน 4.5 นาที) และเหมาะสำหรับการนำไปใช้ควบคุมคุณภาพในอุตสาหกรรมยาและผลิตภัณฑ์เสริมอาหาร

\*ผู้รับผิดชอบบทความ : twarawut@tu.ac.th

คำสำคัญ : ไฮโดรฟิลิกอินเตอร์แอคชันลิควิดโครมาโทกราฟี; ฟีนิลอะลานีน; ไทโรซีน; ผลิตภัณฑ์เสริมอาหาร

## Abstract

In this research, a new method for determination of phenylalanine and tyrosine without derivatization based on hydrophilic interaction liquid chromatography (HILIC) was proposed. The HILIC separation was performed using guard column (3 mm x 10 mm x 3  $\mu$ m) and analytical column (3 mm x 150 mm x 3  $\mu$ m) with dihydroxypropyl groups bonded to silica gel as the stationary phase. The mobile phase consists of acetonitrile : 50 mM ammonium formate pH 3 at 84:16 (v/v) with a flow rate of 0.8 mL/min. Phenylalanine and  $\alpha$ -methyl phenylalanine (internal standard) were detected at 210 nm and tyrosine was detected at 225 nm. The internal calibration curves were linear in the range of 1-500 mg/L ( $r^2 = 0.9999$ ). Limits of detection of phenylalanine and tyrosine were 0.7 and 0.3 mg/L, respectively. Limits of quantification of phenylalanine and tyrosine were 1 and 0.8 mg/L, respectively. Phenylalanine and tyrosine contents in eight samples of dietary supplements were analyzed using the developed method and found in the range of 149-577 and 396-499 mg/capsule with the recoveries of 95-102 and 97-102 %, respectively. The advantages of the developed method are simple, fast simultaneous analysis (within 4.5 min), and suitable for quality control in pharmaceutical and dietary supplements industry.

**Keywords:** hydrophilic interaction liquid chromatography; phenylalanine; tyrosine; dietary supplement

## 1. บทนำ

ฟีนิลอะลานีน (phenylalanine) คือ กรดอะมิโนที่เป็น “หน่วยโครงสร้าง” ของโปรตีน โดยแอล-ฟีนิลอะลานีน (L-phenylalanine) จัดเป็นกรดอะมิโนที่จำเป็นที่ร่างกายสร้างเองไม่ได้ ต้องได้รับการรับประทานอาหารเท่านั้น อาหารที่อุดมไปด้วยแอล-ฟีนิลอะลานีน คือ เนื้อสัตว์ ปลา ไข่ ชีส และนม [1] ฟีนิลอะลานีนเป็นสารตั้งต้นของไทโรซีน (tyrosine) และสารสื่อประสาทอื่น ๆ ได้แก่ แคททีโคลามีน (catecholamine) อีพิเนฟริน (epinephrine) นอร์อีพิเนฟริน (norepinephrine) ไทรามีน (tyramine) และโดปามีน (dopamine) [2] นอกจากนี้ยังมีการใช้ฟีนิลอะลานีนรักษาโรคต่าง ๆ (โรคผิวหนังชนิดหนึ่ง)

ภาวะซึมเศร้า สมาธิสั้น โรคพาร์กินสัน เป็นต้น [3,4]

ไทโรซีนเป็นสารตั้งต้นของสารสื่อประสาทและเป็นกรดอะมิโนที่ร่างกายสังเคราะห์ได้เองจากฟีนิลอะลานีน แต่หากร่างกายได้รับฟีนิลอะลานีนไม่เพียงพอ จะทำให้ร่างกายสังเคราะห์ไทโรซีนไม่ได้ และส่งผลให้ไทโรซีนกลายเป็นกรดอะมิโนจำเป็นทันที เช่น ในกรณีผู้ที่ป่วยเป็นโรคฟีนิลคีโตนูเรีย จะไม่สามารถเปลี่ยนฟีนิลอะลานีนเป็นไทโรซีนเหมือนคนปกติ [5] หรือในทางกลับกัน ผู้ป่วยที่มีภาวะขาดฟีนิลอะลานีน การรับประทานฟีนิลอะลานีนอาจช่วยบรรเทาภาวะขาดฟีนิลอะลานีนในเด็กที่เป็นโรคไทโรซีนีเมียได้ [3,4]

การรับประทานผลิตภัณฑ์เสริมอาหารจึงเป็นทางเลือกหนึ่งเพื่อบรรเทาภาวะขาดฟีนิลอะลานีนและ/

หรือไพโรซิน ซึ่งปัจจุบันมีผลิตภัณฑ์เสริมอาหารจำนวนมากวางจำหน่ายให้เล็อกบริโภค ดังนั้นเพื่อความปลอดภัยและเป็นการคุ้มครองผู้บริโภคจึงควรมีวิธีที่มีประสิทธิภาพสำหรับตรวจสอบคุณภาพสินค้า

การวิเคราะห์ฟีนอละลานีนและไพโรซินแบบพร้อมกัน นิยมใช้เทคนิคการแยก เช่น วิธีโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง [6-11] หรือวิธีแก๊สโครมาโทกราฟี [12-14] แต่เนื่องจากโครงสร้างโมเลกุลของกรดอะมิโนทั้งสองชนิดมีสภาพขั้วสูงและละลายน้ำได้ดี จึงนิยมอาศัยการเตรียมอนุพันธ์เพื่อให้เหมาะสมกับเทคนิคการแยกและตัวตรวจวัด เช่น การใช้วิธีวัดค่าการดูดกลืนแสง มีการใช้ ninhydrin [6,7], phenyl isothiocyanate [8,9], 6- aminoquinolyl- *N*-hydroxysuccinimidyl carbamate [10] และ o-phthalaldehyde 3-mercaptpropionic acid [11] เป็นสารเตรียมอนุพันธ์สำหรับเพิ่มหมู่โครโมฟอร์ในโครงสร้างเพื่อเพิ่มความสามารถในการดูดกลืนแสงสำหรับเทคนิคโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูงหรือการเตรียมอนุพันธ์ด้วย ethylchloroformate [12], *N*-methyl-*N*-(*tert*-butyldimethylsilyl) trifluoroacetamide [13] และ *N,O*-bis(trimethylsilyl) trifluoroacetamide with trimethylchlorosilane [14] เพื่อลดสภาพขั้วและเพิ่มความสามารถในการระเหยกลายเป็นไอให้เหมาะสมกับเทคนิคแก๊สโครมาโทกราฟี ถึงแม้ว่าการเตรียมอนุพันธ์จะเพิ่มประสิทธิภาพการแยกและการตรวจวัด แต่เป็นการเพิ่มขั้นตอนการเตรียมตัวอย่าง

ซึ่งทำให้เวลาในการวิเคราะห์นานขึ้น

เทคนิคไฮโดรฟิลิกอินเตอร์แอคชันลิกวิดโครมาโทกราฟี (hydrophilic interaction liquid chromatography, HILIC) เป็นหนึ่งในเทคนิคโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง โดยอาศัยพื้นฐานของการใช้วัฏภาคหนึ่งหรือคอลัมน์แบบขั้ว (เหมือนเทคนิค

นอร์มอลเฟส) และวัฏภาคเคลื่อนที่ที่มีขั้ว (เหมือนเทคนิครีเวิร์สเฟส) ซึ่งประกอบด้วยน้ำและตัวทำละลายอินทรีย์ที่ละลายน้ำได้ดี เทคนิค HILIC จึงเหมาะกับการแยกโมเลกุลที่มีสภาพขั้วสูงหรือโมเลกุลที่แตกตัวเป็นไอออนและละลายน้ำได้ดี (เหมือนเทคนิคไอออนโครมาโทกราฟี) [15]

งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์ คือ เพื่อพัฒนาวิธีไฮโดรฟิลิกอินเตอร์แอคชันลิกวิดโครมาโทกราฟีที่มีการตรวจวัดแบบโพโตไดโอดอาร์เรย์เพื่อหาปริมาณฟีนอละลานีนและไพโรซินแบบพร้อมกันในผลิตภัณฑ์เสริมอาหารโดยไม่ผ่านการเตรียมอนุพันธ์ โดยศึกษาสถานะต่าง ๆ ทั้งขั้นตอนการเตรียมตัวอย่างและสถานะการตรวจวัด เพื่อให้ได้วิธีวิเคราะห์ที่มีความเที่ยงและความแม่นยำสูงที่สามารถนำไปประยุกต์ใช้ในงานประจำสำหรับการควบคุมคุณภาพสินค้าในอุตสาหกรรมยาหรือผลิตภัณฑ์เสริมอาหาร

## 2. อุปกรณ์และวิธีการ

### 2.1 สารเคมี

สารเคมีที่ใช้ในงานวิจัยเป็นเกรดสำหรับวิเคราะห์ (analytical grade) ตัวทำละลายอินทรีย์เป็นเกรดสำหรับโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง (HPLC grade) ทั้งหมด และใช้น้ำปราศจากไอออน (ELGASTAT UHQ PS, ELGA, England)

สารเคมีประกอบด้วยแอล-ฟีนอละลานีน (Sigma-Aldrich, USA) แอล-ไพโรซิน (Sigma-Aldrich, USA) อัลฟา-เมทิลฟีนอละลานีน (Sigma-Aldrich, USA) กรดไฮโดรคลอริก (RCI Labscan, Thailand) แอมโมเนียมฟออร์เมต (Sigma-Aldrich, USA) ฟอรัมิก (Fisher, United Kingdom) แอมโมเนีย (Carlo erba, France) ตัวทำละลายอินทรีย์ ได้แก่ อะซิโตนไนไตรล์ (Merck, Germany) เมทานอล (RCI Labscan, Thailand) และเอทานอล (RCI Labscan, Thailand)

## 2.2 เครื่องโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง

เครื่องโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง (Nexera LC-30A, Shimadzu, Japan) ประกอบด้วยเครื่องฉีดตัวอย่างอัตโนมัติ (SIL-30AC, Shimadzu, Japan) ปั๊ม (LC-30AD, Shimadzu, Japan) เครื่องกำจัดฟองอากาศ (DGU-20As, Shimadzu, Japan) ตู้อบคอลัมน์ (CTO-20AC, Shimadzu, Japan) การ์ดคอลัมน์ชนิดไดไฮดรอกซีโพรพิล (Inertsil HILIC, 3 mm x 10 mm x 3  $\mu$ m; GL Sciences, Japan) คอลัมน์วิเคราะห์ชนิดไดไฮดรอกซีโพรพิล (Inertsil HILIC, 3 mm x 150 mm x 3  $\mu$ m; GL Sciences, Japan) ตัวตรวจวัดชนิดโฟโตไดโอดอาร์เรย์ (SPD-20A, Shimadzu, Japan) โปรแกรมควบคุมการทำงานและประมวลผล Lab Solution (version 5.93)

เครื่องโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูงตั้งอุณหภูมิตู้อบคอลัมน์ที่ 30 องศาเซลเซียส ปริมาณการฉีดตัวอย่าง 4 ไมโครลิตร ภูมิภาคเคลื่อนที่ประกอบด้วยอะซิโตนไตรลและสารละลายแอมโมเนียมฟอสเฟตเข้มข้น 50 mM อัตราส่วน 84:16 (v/v) ที่อัตราการไหล 0.8 มิลลิิตรต่อนาที ตรวจวัดฟีนอลอะลานีนและอัลฟา-เมทิลฟีนอลอะลานีนที่ความยาวคลื่น 210 นาโนเมตร และไทโรซีนที่ความยาวคลื่น 225 นาโนเมตร

## 2.3 ตัวอย่างผลิตภัณฑ์เสริมอาหาร

ตัวอย่างผลิตภัณฑ์เสริมอาหารชนิดสารอาหารเดี่ยว (single nutrient formulation) และชนิดสารอาหารผสม (multi-nutrients formulation) เป็นผลิตภัณฑ์ที่วางจำหน่ายในประเทศไทย ซึ่งมีทั้งที่ผลิตในประเทศไทยและต่างประเทศ

นำตัวอย่างผลิตภัณฑ์เสริมอาหาร 20 แคปซูล มาชั่งน้ำหนักเพื่อหาน้ำหนักเฉลี่ยของผงของ

แต่ละแคปซูล จากนั้นนำผงผลิตภัณฑ์เสริมอาหารทั้งหมดผสมให้เป็นเนื้อเดียวกัน แล้วเก็บตัวอย่างผลิตภัณฑ์เสริมอาหารไว้ในขวดสีชา ปิดฝาให้มิดชิด เก็บไว้ในที่แห้ง ไมโคเดนแสงแดด

## 2.4 วิธีการทดลอง

### 2.4.1 การสกัดฟีนอลอะลานีนและไทโรซีนจากผลิตภัณฑ์เสริมอาหาร

ชั่งตัวอย่างผลิตภัณฑ์เสริมอาหาร 0.0250 กรัม ลงในหลอดทดลองที่มีฝาปิดขนาด 50 มิลลิิตร เติมสารละลายอัลฟา-เมทิลฟีนอลอะลานีน (สารมาตรฐานภายใน) เข้มข้น 1,000 มิลลิกรัมต่อลิตร ปริมาตร 750 ไมโครลิตร จากนั้นเติมสารละลายกรดไฮโดรคลอริก เข้มข้น 0.1 M ปริมาตร 24.25 มิลลิิตร ปิดฝา นำไป Vortex เป็นเวลา 3 นาที นำสารละลายส่วนใสด้านบนปริมาตร 1 มิลลิิตร มาเจือจางด้วยอะซิโตนไตรลแล้วปรับปริมาตรเป็น 10.00 มิลลิิตร นำสารละลายที่ได้ไปกรองด้วยเมมเบรนชนิดไนลอนขนาดรูพรุน 0.2 ไมโครเมตร จากนั้นฉีดเข้าสู่เครื่องโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง

### 2.4.2 การสร้างกราฟมาตรฐานภายใน

กราฟมาตรฐานภายใน (internal calibration curve) เป็นกราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของฟีนอลอะลานีนหรือไทโรซีน (แกน x) กับอัตราส่วนของพื้นที่ใต้พีคระหว่างฟีนอลอะลานีนหรือไทโรซีนกับสารมาตรฐานภายใน (แกน y)

การเตรียมสารละลายมาตรฐานผสมฟีนอลอะลานีนและไทโรซีนสำหรับการสร้างกราฟมาตรฐานภายในใช้สารละลายกรดไฮโดรคลอริกเข้มข้น 0.1 M เป็นตัวทำละลาย เตรียมได้จากการเจือจางสารละลายมาตรฐานปฐมภูมิแต่ละชนิด เข้มข้น 5,000 มิลลิกรัมต่อลิตร เพื่อใช้เตรียมสารละลายมาตรฐานทุติยภูมิเข้มข้น 1,000 มิลลิกรัมต่อลิตร จากนั้นนำสารละลายนี้ไปใช้เตรียมสารละลาย

มาตรฐานผสมในช่วงความเข้มข้น 1-500 มิลลิกรัมต่อลิตร ปริมาตร 10 มิลลิลิตร ซึ่งทุกความเข้มข้นจะมีสารละลายมาตรฐานภายในเข้มข้น 30 มิลลิกรัมต่อลิตร

### 3. ผลการทดลอง

#### 3.1 การหาสภาวะที่เหมาะสมของวิธี HILIC

งานวิจัยนี้สนใจเทคนิค HILIC เพื่อใช้สำหรับการแยกฟีนอละลานีนและไทโรซีน โดยมีอัลฟา-เมทิลฟีนอละลานีนเป็นสารมาตรฐานภายใน โดยเลือกใช้วัฏภาคหนึ่งที่มีหมู่ไฮดรอกซีโพรพิลที่สร้างพันธะกับซิลิกาเจล ซึ่งคงค้าง (retain) สารมีขั้วสูงได้ดี โดยในการเลือกสภาวะที่เหมาะสมของแต่ละพารามิเตอร์จะพิจารณาจากความสามารถในการแยก (resolution) รูปร่างพีก (peak shape) สภาพไว (sensitivity) และเวลาในการวิเคราะห์ (analysis time)

##### 3.1.1 ความยาวคลื่นที่ใช้ตรวจวัด

เนื่องจากฟีนอละลานีน ไทโรซีน และอัลฟา-เมทิลฟีนอละลานีนมีหมู่ฟังก์ชันที่สามารถดูดกลืนแสงอัลตราไวโอเล็ต แต่ความสามารถในการ

ดูดกลืนแสงในแต่ละความยาวคลื่นไม่เท่ากัน ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงเลือกใช้เครื่องตรวจวัดค่าการดูดกลืนแสงชนิดโฟโตไดโอดอาร์เรย์ ซึ่งตรวจวัดค่าการดูดกลืนแสงได้หลายความยาวคลื่นพร้อมกัน ทำให้สามารถเลือกความยาวคลื่นที่ให้ค่าการดูดกลืนแสงสูงสุดของสารแต่ละตัว เพื่อให้ได้สภาพไวและความจำเพาะที่ดีที่สุด (รูปที่ 1)

ผลการทดลองพบว่าฟีนอละลานีน และอัลฟา-เมทิลฟีนอละลานีนมีค่าการดูดกลืนแสงสูงสุดที่ความยาวคลื่น 210 นาโนเมตร และไทโรซีนมีค่าการดูดกลืนแสงสูงสุดที่ความยาวคลื่น 225 นาโนเมตร ดังนั้น จึงเลือกตรวจวัดสารทั้งสามชนิดที่ความยาวคลื่นเหล่านี้ เพื่อให้ได้สภาพไวสูงสุด

##### 3.1.2 วัฏภาคเคลื่อนที่

(1) องค์ประกอบของวัฏภาคเคลื่อนที่ วัฏภาคเคลื่อนที่โดยทั่วไปของเทคนิค HILIC ประกอบด้วยตัวทำละลายอินทรีย์สภาพมีขั้วสูงที่ละลายน้ำได้ดี เช่น อะซิโตน ไตรเอทิลเอม และเมทานอลกับน้ำหรือสารละลายบัฟเฟอร์ [15] เนื่องจากฟีนอละลานีนและอัลฟา-เมทิลฟีนอละลานีน มีค่าการดูดกลืนแสงสูงสุดที่

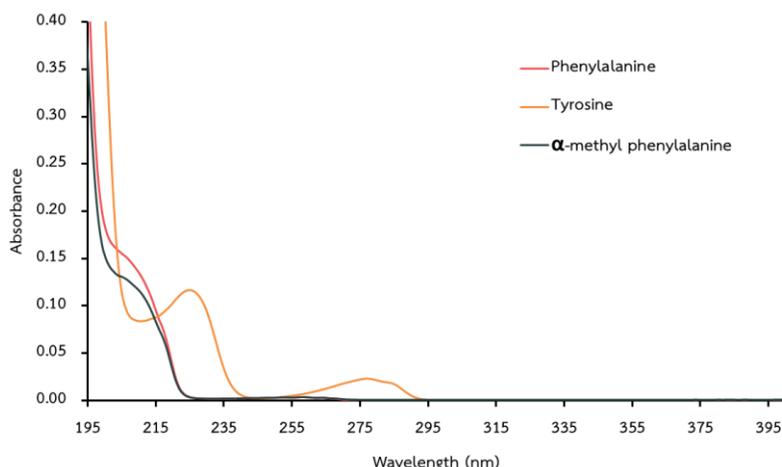
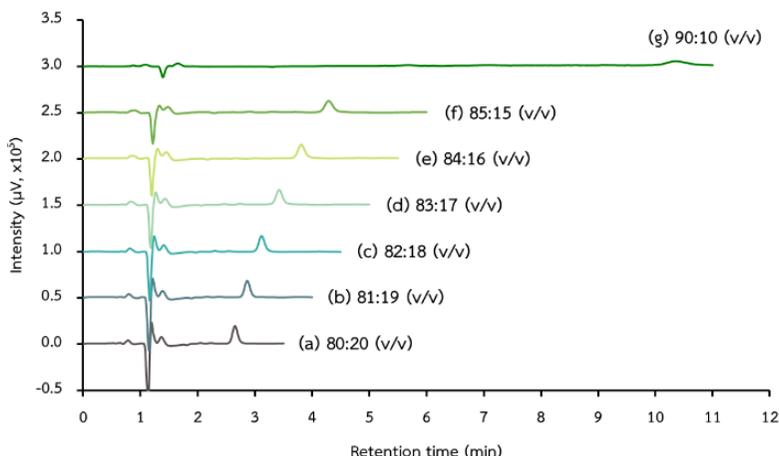
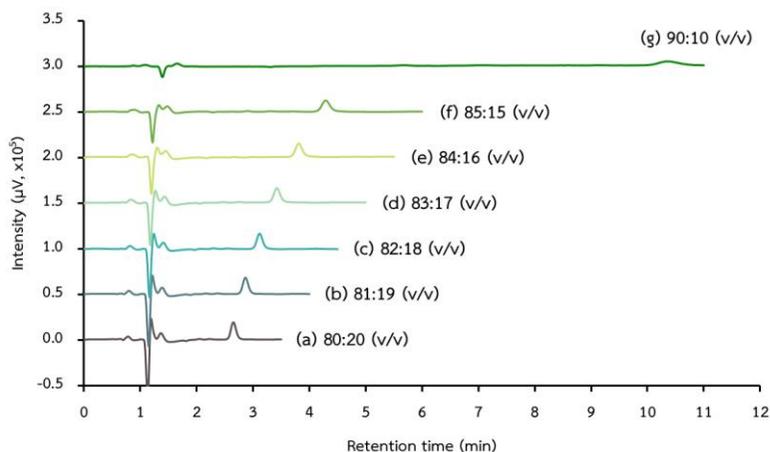


Figure 1 UV absorption spectra of phenylalanine, tyrosine and  $\alpha$ -methyl phenylalanine (internal standard) at 200, 200 and 150 mg/L, respectively



**Figure 2** HILIC chromatograms at 210 nm for the detections of phenylalanine (#) and  $\alpha$ -methyl phenylalanine (\*) using acetonitrile:50 mM of ammonium formate pH 3 at (a) 80:20, (b) 81:19, (c) 82:18, (d) 83:17, (e) 84:16, (f) 85:15 and (g) 90:10 (v/v) as the mobile phase



**Figure 3** HILIC chromatograms at 225 nm for the detections of tyrosine using acetonitrile : 50 mM of ammonium formate pH 3 at (a) 80:20, (b) 81:19, (c) 82:18, (d) 83:17, (e) 84:16, (f) 85:15 and (g) 90:10 (v/v) as the mobile phase

ความยาวคลื่น 210 นาโนเมตร งานวิจัยนี้จึงเลือกใช้อะซิโตนไตรรล์เป็นตัวทำละลายอินทรีย์ เนื่องจากมีค่า UV cut-off ที่ 190 นาโนเมตร คอลัมน์ที่เลือกใช้ในงานนี้มีความสามารถทน pH ได้ในช่วง 2-7.5 ซึ่งโดยปกติสารเติมแต่งไอออน (ionic additive) นิยมใช้แอมโมเนียมอะซิเตตหรือแอมโมเนียมฟอสมेट

เนื่องจากสามารถละลายในอะซิโตนไตรรล์ได้ดี [16] เพื่อควบคุม pH และ ionic strength ของวัฏภาคเคลื่อนที่ ซึ่งบัฟเฟอร์ชนิดนี้ส่งผลต่อสภาพขั้วของสาร ทำให้มีผลต่อพฤติกรรมของการแยกในเทคนิค HILIC [15,16] งานวิจัยนี้ศึกษา pH ของสารละลายบัฟเฟอร์ (pH 3-7) โดยนำมาผสมกับอะซิโตนไตรรล์ที่อัตราส่วน

ต่าง ๆ ตัวอย่าง HILIC โครมาโทแกรม เมื่อใช้สารละลายแอมโมเนียมฟอสเฟต pH 3 ที่อัตราส่วนต่าง ๆ แสดงในรูปที่ 2 และ 3

ผลการทดลองพบว่าเมื่อใช้สารละลายแอมโมเนียมฟอสเฟต pH 3 เข้มข้น 50 mM เป็นวัฏภาคเคลื่อนที่ สารทั้งสามชนิดมีรูปร่างพีคที่ดีที่สุด โดยเมื่อศึกษาอัตราส่วนของอะซิโตนไนโตรล : สารละลายแอมโมเนียมฟอสเฟต pH 3 เข้มข้น 50 mM พบว่าเมื่อเพิ่มปริมาตรของอะซิโตนไนโตรลจะทำให้พีคของสารทั้งสามชนิดเคลื่อนที่ออกมาช้าลง เนื่องจากการลดความแรงของวัฏภาคเคลื่อนที่ โดยจากการศึกษาผลของ pH 3-7 ที่อัตราส่วนต่าง ๆ พบว่าอะซิโตนไนโตรล : สารละลายแอมโมเนียมฟอสเฟต pH 3 เข้มข้น 50 mM อัตราส่วน 84 : 16 (v/v) ให้การแยกที่ดีที่สุด (ค่า resolution > 1.5) มีรูปร่างพีคที่ดี (ค่า tailing factor < 1.5) และใช้เวลาในการวิเคราะห์ที่น่าพอใจ (4.5 นาที) ดังนั้นจึงเลือกสภาวะนี้สำหรับการวิเคราะห์ต่อไป

(2) อัตราการไหล (flow rate) ของวัฏภาคเคลื่อนที่ส่งผลต่อเวลาเคลื่อนที่ของสารในคอลัมน์และเวลาในการวิเคราะห์ ดังนั้นจึงศึกษาอัตราการไหลตั้งแต่ 0.6-1.0 มิลลิลิตรต่อนาที พบว่าอัตราการไหลที่สูงขึ้นทำให้พีคต่าง ๆ เคลื่อนที่ออกมาเร็วขึ้น การวิเคราะห์จึงรวดเร็วขึ้น จนกระทั่งถึงอัตราการไหลที่ 0.8 มิลลิลิตรต่อนาที จะให้ผลการวิเคราะห์รวดเร็วที่สุดและมีการแยกที่ดี หากใช้อัตราการไหลสูงกว่านี้ จะทำให้ความดันของระบบเกินขีดจำกัดของความดันสูงสุดที่คอลัมน์ทนได้ ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงเลือกใช้อัตราการไหลที่ 0.8 มิลลิลิตรต่อนาที

### 3.2 การสกัดฟีนอละลานินและไทโรซีน

ผลิตภัณฑ์เสริมอาหารนอกจากจะมีสารอาหารที่สนใจวิเคราะห์แล้ว ยังอาจมีส่วนผสมอื่น ๆ ได้แก่ กรดอะมิโนชนิดอื่น วิตามิน เกลือแร่ และซิลิกา

เป็นต้น โดยทั้งหมดอยู่ในรูปของผงบรรจุในแคปซูล จึงจำเป็นต้องสกัดไปในสารละลายเพื่อวิเคราะห์ต่อด้วยวิธี HILIC ดังนั้นจึงศึกษาชนิดของตัวสกัด วิธีสกัด และเวลาสกัดที่เหมาะสม โดยใช้ตัวอย่างผลิตภัณฑ์เสริมอาหารชนิดสารอาหารผสมเป็นตัวแทนในการศึกษา

#### 3.2.1 ชนิดของตัวสกัด

ศึกษาตัวสกัด 4 ชนิด คือ (a) อะซิโตนไนโตรล : สารละลายแอมโมเนียมฟอสเฟต pH 3 เข้มข้น 50 mM อัตราส่วน 84 : 16 (v/v) (วัฏภาคเคลื่อนที่) (b) สารละลายแอมโมเนียมฟอสเฟต pH 3 เข้มข้น 50 mM (c) น้ำ type I และ (d) สารละลายกรดไฮโดรคลอริก เข้มข้น 0.1 M ซึ่งตัวสกัดทั้ง 4 ชนิดพิจารณาเริ่มจากสารละลายที่เป็นวัฏภาคเคลื่อนที่ของวิธี HILIC เพื่อป้องกันการเกิดการหักเหของแสงในขั้นตอนการตรวจวัด ซึ่งอาจทำให้การวัดค่าการดูดกลืนแสงผิดพลาดได้ นอกจากนี้ได้เลือกศึกษาตัวสกัดอื่นที่มีสภาพขี้และความสามารถในการละลายเหมาะสมกับสารที่สนใจ การทดลองใช้ปริมาตรของตัวสกัดเท่ากันและใช้วิธีการสกัดแบบการใช้คลื่นเสียงความถี่สูง (ultrasonication) เป็นเวลา 30 นาที ในรูปที่ 4 พบว่าปริมาณของฟีนอละลานินที่ได้จากตัวสกัดทั้ง 4 ชนิด มีปริมาณใกล้เคียงกัน แต่ปริมาณไทโรซีนที่สกัดได้จากสารละลายกรดไฮโดรคลอริก เข้มข้น 0.1 M ได้ปริมาณสูงที่สุด และปริมาณที่สกัดได้จะลดลงเมื่อใช้ น้ำ type I สารละลายแอมโมเนียมฟอสเฟต pH 3 และวัฏภาคเคลื่อนที่ ตามลำดับ เนื่องจากสารละลายกรดไฮโดรคลอริก เข้มข้น 0.1 M มีสภาพขี้และ pH เหมาะสมกับการละลายของไทโรซีนมากที่สุด ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงเลือกสารละลายกรดไฮโดรคลอริก เข้มข้น 0.1 M เป็นตัวสกัด เนื่องจากมีประสิทธิภาพดีที่สุด

#### 3.2.2 วิธีสกัดและเวลาสกัด

เพื่อให้ได้ประสิทธิภาพการสกัดที่ดีที่สุดคือ ได้ปริมาณที่สกัดได้สูงสุดในเวลาที่รวดเร็ว ดังนั้นจึง

ได้ศึกษาวิธีสกัด (agitation method) 3 วิธี โดยแต่ละวิธีได้ศึกษาเวลาสกัด (extraction time) ที่เหมาะสมอีกด้วย ดังนี้

- (1) วิธีการใช้คลื่นเสียงความถี่สูง (ultrasonicator): 5, 15, 30 และ 45 นาที (รูปที่ 5a)
- (2) วิธีเขย่า (horizontal shaker): 1, 5, 10, 15 และ 30 นาที (รูปที่ 5b)
- (3) วิธี Vortex: 0.5, 1, 2, 3, 4 และ 5

นาที (รูปที่ 5c)

ผลการทดลองพบว่าวิธีสกัดทั้ง 3 วิธีให้ผลการทดลองไปในแนวทางเดียวกัน คือ เมื่อใช้เวลานานขึ้นจะทำให้ได้ปริมาณที่สกัดมากขึ้น และจะคงที่เมื่อถึงสภาวะสมดุล โดยเมื่อสกัดด้วยวิธีการใช้คลื่นเสียงความถี่สูงเป็นเวลา 30 นาที วิธีเขย่าเป็นเวลา 15 นาที และวิธี Vortex เป็นเวลา 3 นาที ซึ่งเป็นเวลาสกัดที่ดีที่สุดของแต่ละวิธีสกัดนั้น สามารถ

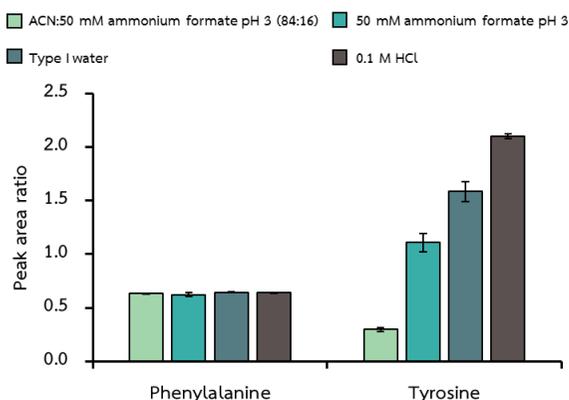


Figure 4 Effect of extractant on the extraction efficiency

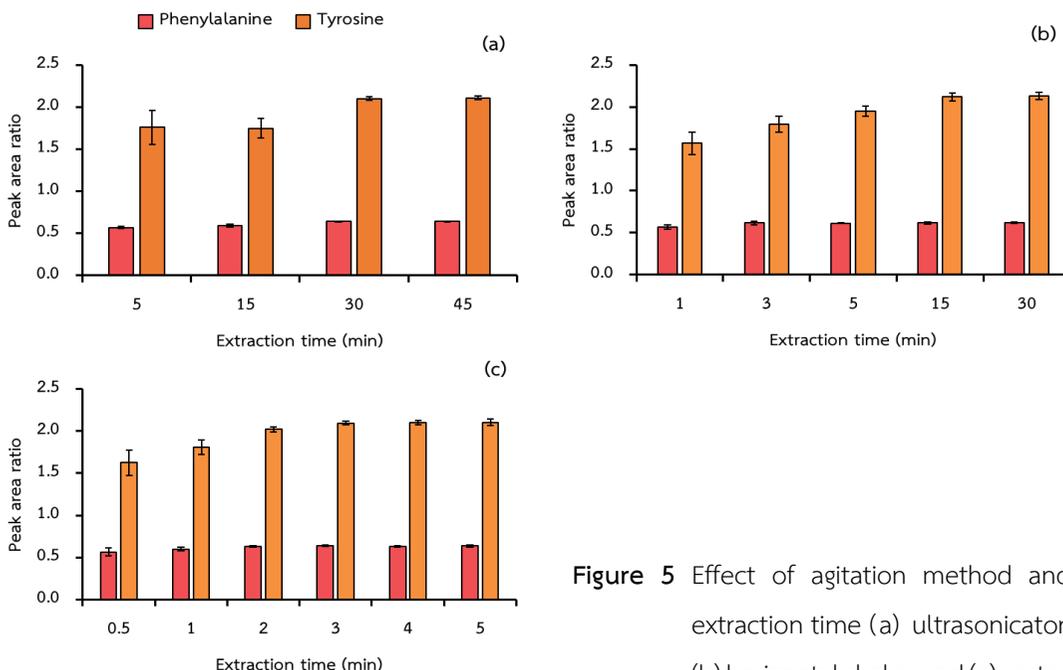


Figure 5 Effect of agitation method and extraction time (a) ultrasonicator, (b) horizontal shaker and (c) vortex

สกัดฟีนอละลาโนนและไทโรซีนได้ปริมาณใกล้เคียงกัน ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงเลือกใช้การสกัดด้วยวิธี Vortex เป็นเวลา 3 นาที เนื่องจากมีประสิทธิภาพที่ดีและใช้เวลาสกัดเร็วที่สุด

### 3.3 การตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์

การตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์ (method validation) อาศัยเกณฑ์จาก “Appendix K: Guidelines for dietary supplements and botanicals, Part I: AOAC guidelines for single-laboratory validation of chemical methods for dietary supplements and botanicals” โดย The Association of Analytical Communities (AOAC) [17] ภายใต้สภาวะที่เหมาะสมของวิธีที่พัฒนาขึ้น ช่วงความเป็นเส้นตรงและสัมประสิทธิ์การวิเคราะห์ (linear range and determination of coefficient) ขีดจำกัดการตรวจวัด (limit of detection) ขีดจำกัดการหาปริมาณ (limit of quantification) ความเที่ยง (precision) และความแม่นยำ (accuracy) แสดงในตารางที่ 1 พบว่าวิธีที่พัฒนาขึ้นมีความเป็นเส้นตรงอยู่

ในช่วงความเข้มข้น 1-500 มิลลิกรัมต่อลิตร และมีค่า  $r^2 = 0.9999$  แสดงให้เห็นว่าวิธีที่พัฒนาขึ้นมีช่วงความเป็นเส้นตรงที่กว้าง สามารถวิเคราะห์หาปริมาณฟีนอละลาโนนและไทโรซีนในตัวอย่างที่มีความเข้มข้นที่ต่างกันได้ สามารถตรวจวัดฟีนอละลาโนนและไทโรซีนต่ำถึง 0.7 และ 0.3 มิลลิกรัมต่อลิตร และหาปริมาณได้ต่ำถึง 1 และ 0.8 มิลลิกรัมต่อลิตร ตามลำดับ วิธีนี้มีความเที่ยงที่สูงมากเนื่องจากการใช้สารมาตรฐานภายใน โดยมีค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ 0.73-0.93 % และ 1.75-1.76 % ของการทำซ้ำภายในวันเดียว และการซ้ำระหว่างวัน ตามลำดับ ทำให้ค่า HorRat, อยู่นอกช่วงที่กำหนด โดยผลการตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีที่พัฒนาขึ้นนี้พบว่ายังอยู่ในช่วงการยอมรับได้ของ AOAC

### 3.4 การวิเคราะห์หาปริมาณฟีนอละลาโนนและไทโรซีนในผลิตภัณฑ์เสริมอาหาร

ได้นำวิธีที่พัฒนาขึ้นไปประยุกต์ใช้ในการหาปริมาณฟีนอละลาโนนและไทโรซีนในผลิตภัณฑ์เสริมอาหาร 8 ตัวอย่าง ทั้งแบบชนิดสารอาหารเดี่ยวและชนิดสารอาหารผสม ดังแสดงในตารางที่ 2 พบว่า

**Table 1** Method validation of the HILIC method for the analysis of phenylalanine and tyrosine

Parameters	Results		Criteria <sup>a</sup>
	Phenylalanine	Tyrosine	
Internal calibration curve <sup>b</sup>	1-500 ( $r^2 = 0.9999$ )	1-500 ( $r^2 = 0.9999$ )	$r^2 > 0.99$
Limit of detection (LOD) <sup>b</sup>	0.7	0.3	3S/N
Limit of quantification (LOQ) <sup>b</sup>	1	0.8	10S/N
Precision (%RSD)			
- intra day <sup>c</sup>	0.73 % (HorRat <sub>r</sub> = 0.18)	0.93 % (HorRat <sub>r</sub> = 0.23)	HorRat <sub>r</sub> = 0.5-2
- inter day <sup>c</sup>	1.75 % (HorRat <sub>r</sub> = 0.29)	1.76 % (HorRat <sub>r</sub> = 0.29)	HorRat <sub>r</sub> = 0.5-2

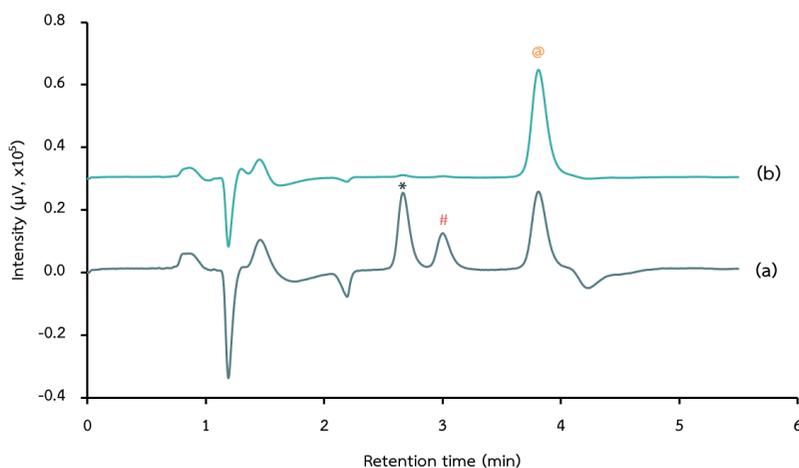
<sup>a</sup> Criteria of appendix K: Guidelines for dietary supplements and botanicals, part I: AOAC guidelines for single-laboratory validation of chemical methods for dietary supplements and botanicals [17];

<sup>b</sup> mg/L; <sup>c</sup> Ten replicates (n = 10)

**Table 2** Phenylalanine and tyrosine contents and recovery studied in dietary supplements

Samples	Phenylalanine				Tyrosine			
	Labels	Contents	Recoveries (%) <sup>a</sup>		Labels	Contents	Recoveries (%) <sup>a</sup>	
	(mg/capsule)	(mg/capsule) <sup>a</sup>	10 mg/L <sup>b</sup>	50 mg/L <sup>b</sup>	(mg/capsule)	(mg/capsule) <sup>a</sup>	10 mg/L <sup>b</sup>	50 mg/L <sup>b</sup>
A (Lot No. I) *	500	500.24±1.00	99.04±0.73	98.71±0.23	- <sup>c</sup>	n.d. <sup>d</sup>	101.10±0.01	96.78±0.23
A (Lot No. II) *	500	501.50±1.38	97.64±0.39	96.38±0.46	-	n.d.	101.83±0.32	99.08±0.74
B (Lot No. I) *	-	n.d.	101.22±0.28	96.56±0.08	500	497.36±2.76	99.68±0.91	97.19±0.44
B (Lot No. II) *	-	n.d.	97.75±0.07	98.20±0.27	500	499.20±1.17	101.45±0.56	100.89±0.42
C (Lot No. I) **	576.45	573.79±1.01	99.58±0.27	96.20±0.76	-	n.d.	101.53±0.08	96.55±0.86
C (Lot No. II) **	576.45	577.40±3.88	95.48±0.52	101.84±0.92	-	n.d.	101.97±0.10	101.16±0.14
D (Lot No. I) **	150	150.71±2.09	101.31±0.73	101.06±0.40	400	400.72±3.55	101.85±0.50	98.95±0.99
D (Lot No. II) **	150	148.70±0.41	98.34±0.04	99.69±1.43	400	395.76±2.75	99.28±0.94	101.89±0.37

<sup>a</sup> Three replicate injections (n=3) (mean±SD); <sup>b</sup> Fortified concentration; <sup>c</sup> (-) is not labeled; <sup>d</sup> n.d. is nondetectable; \* Single nutrient formulation; \*\* Multi-nutrients formulation.



**Figure 6** The HILIC chromatograms of sample D (Lot No. I) (a) phenylalanine (#) and  $\alpha$ -methyl phenylalanine (\*) at 210 nm and (b) tyrosine (@) at 225 nm.

ปริมาณฟีนิลอะลานีนและไทโรซีนอยู่ในช่วง 149-577 และ 396-499 มิลลิกรัมต่อแคปซูล ซึ่งไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญกับผลลากที่ระบุที่ระดับความเชื่อมั่นที่ 95 % เมื่อทดสอบแบบ paired t-test นอกจากนี้ได้ศึกษาความแม่นยำของวิธี โดยอาศัยค่าร้อยละการกลับคืน (% recovery) ที่ความเข้มข้น 10 และ 50 มิลลิกรัมต่อลิตร พบว่าฟีนิลอะลานีนและไทโรซีนมีค่าร้อยละการกลับคืนในช่วง 95.48-101.84

และ 96.55-101.97 ซึ่งอยู่ในช่วงการยอมรับของ AOAC (ร้อยละ 90-108) แสดงให้เห็นว่าวิธีที่พัฒนาขึ้นมีความแม่นยำสูง โดยโครมาโทแกรมของผลิตภัณฑ์เสริมอาหาร ตัวอย่าง D (Lot No. I) แสดงดังรูปที่ 6 จะเห็นได้ว่าพีคของฟีนิลอะลานีนและไทโรซีนรวมถึงสารมาตรฐานภายในแยกออกจากเมทริกซ์ได้ดี

#### 4. สรุป

งานวิจัยนี้ได้พัฒนาวิธีไฮโดรฟิลิกอินเตอร์แอคชั่นลิควิดโครมาโทกราฟีที่มีการตรวจวัดชนิดโพโตไดโอดอาร์เรย์สำหรับการหาปริมาณฟีนิลอะลานีนและไทโรซีนแบบพร้อมกันในผลิตภัณฑ์เสริมอาหาร โดยใช้เวลาในการตรวจวัดเพียง 4.5 นาที วิธีที่พัฒนาขึ้นนี้เป็นวิธีที่มีความเที่ยงและความแม่นยำสูงเนื่องจากมีการใช้สารละลายมาตรฐานภายในอัลฟา-เมทิลฟีนิลอะลานีนร่วมด้วย นอกจากนี้ในขั้นตอนการเตรียมตัวอย่างมีขั้นตอนที่ง่าย ไม่ต้องมีขั้นตอนการเตรียมอนุพันธ์ วิธีการสกัดมีประสิทธิภาพที่ดีและใช้เวลาสกัดเพียง 3 นาที วิธีที่พัฒนาขึ้นนี้ ผ่านเกณฑ์การยอมรับของการตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีตามแนวทางของ AOAC จึงสามารถนำวิธีนี้ไปใช้ในการหาปริมาณฟีนิลอะลานีนและไทโรซีนในตัวอย่างผลิตภัณฑ์เสริมอาหารเพื่อคุ้มครองและสร้างความปลอดภัยให้กับผู้บริโภคได้ นอกจากนี้วิธีที่พัฒนาขึ้นนี้อาจสามารถนำไปประยุกต์ใช้กับตัวอย่างประเภทอื่น ๆ ได้ เช่น อาหาร เลือดหรือปัสสาวะ แต่อาจต้องมีการพัฒนาวิธีการเตรียมตัวอย่างให้สะอาดขึ้นเพื่อกำจัดตัวรบกวนในตัวอย่างแต่ละประเภท

**5. กิตติกรรมประกาศ**

โครงการวิจัยนี้ได้รับการสนับสนุนจากงบประมาณแผ่นดิน มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์ ประจำปีงบประมาณ 2561 สัญญาเลขที่ 7/2561 ขอขอบคุณสาขาวิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี ศูนย์เครื่องมือวิทยาศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี (CSIC) และศูนย์เครื่องมือวิทยาศาสตร์เพื่อการวิจัยขั้นสูง (TU-CSEAR) สำนักงานวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีขั้นสูง มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์

**6. References**

[1] Foods Highest in Phenylalanine, Available

Source: <https://nutritiondata.self.com/foods-000086000000000000000000-1.html>, August 1, 2019.

[2] Showing Metabocard for L-Phenylalanine (HMDB0000159), Available Source: <http://www.hmdb.ca/metabolites/HMDB0000159>, May 12, 2018.

[3] Glushakov, A.V., Dennis, D.M., Sumners, C., Seubert, C. N. and Martynyuk, A. E., 2003, L- phenylalanine selectively depresses currents at glutamatergic excitatory synapses, *J. Neurosci. Res.* 72: 116-124.

[4] Wendisch, V.F., 2007, *Amino Acid Biosynthesis – Pathways, Regulation and Metabolic Engineering*, Springer, Berlin, Heidelberg, 413 p.

[5] Arn, P.H., 2014, *Encyclopedia of the Neurological Sciences*, Volume 3, 2nd Ed., Academic Press, Oxford, 887 p.

[6] Allard, P., Cowell, L. D., Zytovicz, T.H., Korson, M. S. and Ampola, M. G. , 2004, Determination of phenylalanine and tyrosine in dried blood specimens by ion-exchange chromatography using the Hitachi L-8800 analyzer, *Clin. Biochem.* 37: 857-862.

[7] Boucher, J.L., Charret, C., Coudray-Lucas, C., Giboudeau, J. and Cynober, L., 1997, Amino acid determination in biological fluids by automated ion- exchange chromatography: Performance of Hitachi L-8500A, *Clin. Chem.* 43: 1421-1428.

[8] Dale, Y., Mackey, V., Mushi, R., Nyanda, A.,

- Maleque, M. and Ike, J., 2003, Simultaneous measurement of phenylalanine and tyrosine in phenylketonuric plasma and dried blood by high-performance liquid chromatography, *J. Chromatogr. B* 788: 1-8.
- [9] Palego, L., Giannaccini, G. and Lucacchini, A., 2012, RP-LC of Phenylthiocarbamyl Amino Acid Adducts in Plasma Acetonitrile Extracts: Use of Multiple Internal Standards and Variable Wavelength UV Detection, pp. 201-217, In Alterman, M.A. and Hunziker, P. (Eds.), *Amino Acid Analysis: Methods and Protocols*, Methods in Molecular Biology, Humana Press, Totowa, New Jersey.
- [10] Narayan, S.B., Ditewig-Meyers, G., Graham, K.S., Scott, R. and Bennett M.J., 2011, *Clin. Chem. Lab Med.* 49: 1177-1185.
- [11] Schwarz, E.L., Roberts, W.L. and Pasquali, M., 2005, Analysis of plasma amino acids by HPLC with photodiode array and fluorescence detection, *Clin. Chim. Acta* 354: 83-90.
- [12] Namera, A., Yashiki, M., Nishida, M. and Kojima, T., 2002, Direct extract derivatization for determination of amino acids in human urine by gas chromatography and mass spectrometry, *J. Chromatogr. B* 776: 49-55.
- [13] Deng, C., Deng, Y., Wang, B. and Yang, X., 2002, Gas chromatography-mass spectrometry method for determination of phenylalanine and tyrosine in neonatal blood spots, *J. Chromatogr. B* 780: 407-413.
- [14] Xiong, X., Sheng, X., Liu, D., Zeng, T., Peng, Y. and Wang, Y., 2015, A GC/MS-based metabolomic approach for reliable diagnosis of phenylketonuria, *Anal. Bioanal. Chem.* 407: 8825-8833.
- [15] Buszewski, B. and Noga, S., 2012, Hydrophilic interaction liquid chromatography (HILIC) – a powerful separation technique, *Anal. Bioanal. Chem.* 402: 231-247.
- [16] Heaton, J. and Smith, N., 2012, Advantages and disadvantages of HILIC: A brief overview, *Chromatogr. Today.* 5: 44-47.
- [17] The Association of Analytical Communities, 2012, Appendix K: Guidelines for Dietary Supplements and Botanicals, Part I: AOAC Guidelines for Single-Laboratory Validation of Chemical Methods for Dietary Supplements and Botanicals, AOAC International, 1-15 p.