Research Article

Received: August 6, 2019; Accepted: November 11, 2019

# วิธีไฮโดรฟิลลิกอินเตอร์แอคชั่นลิควิดโครมาโทกราฟีแบบใหม่ที่ปราศจากการเตรียมอนุพันธ์สำหรับหาปริมาณฟีนิลอะลานีนและไทโรซีน

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

วราวุธ ติยพงศ์พัฒนา* และวรพรต วนิชลานันท์

*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**

งานวิจัยนี้ได้เสนอวิธีใหม่สำหรับการหาปริมาณฟีนิลอะลานีนและไทโรซีนแบบปราศจากการเตรียมอนุพันธ์ด้วยเทคนิคไฮโดรฟิลลิกอินเตอร์แอคชั่นลิควิดโครมาโทกราฟี (hydrophilic interaction liquid chromatography, HILIC) โดยแยกแบบ HILIC ด้วยการ์ดคอลัมน์ (3 มิลลิเมตร x 10 มิลลิเมตร x 3 ไมโครเมตร) และคอลัมน์สำหรับวิเคราะห์ (3 มิลลิเมตร x 150 มิลลิเมตร x 3 ไมโครเมตร) ที่มีวัฏภาคนิ่ง คือ หมู่ไดไฮดรอกซีโพรพิวที่สร้างพันธะกับซิลิกาเจล วัฏภาคเคลื่อนที่ประกอบด้วยอะซิโตไนไตรล์ : 50 mM แอมโมเนียมฟอร์เมต pH 3 อัตราส่วน 84 : 16 (v/v) ที่อัตราการไหล 0.8 มิลลิลิตรต่อนาที ฟีนิลอะลานีนและอัลฟา-เมทิลฟีนิลอะลานีน (สารมาตรฐานภายใน) ตรวจวัดที่ความยาวคลื่น 210 นาโนเมตร และไทโรซีนที่ 225 นาโนเมตร กราฟมาตรฐานภายในมีความเป็นเส้นตรงในช่วง 1-500 มิลลิกรัมต่อลิตร ($r^2$ = 0.9999) ขีดจำกัดการตรวจวัดของฟีนิลอะลานีนและไทโรซีน 0.7 และ 0.3 มิลลิกรัมต่อลิตร ตามลำดับ ขีดจำกัดการหาปริมาณของฟีนิลอะลานีนและไทโรซีน 1 และ 0.8 มิลลิกรัมต่อลิตร ตามลำดับ แล้วนำวิธีที่พัฒนาขึ้นไปวิเคราะห์ปริมาณฟีนิลอะลานีนและไทโรซีนในตัวอย่างผลิตภัณฑ์เสริมอาหาร 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 **doi:** 10.14456/tstj.2020.154

**คำสำคัญ :** ไฮโดรฟิลลิกอินเตอร์แอคชั่นลิควิดโครมาโทกราฟี; 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 μm) and analytical column (3 mm x 150 mm x 3 μm) 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

ฟีนิลอะลานิน (phenylalanine) คือ กรดอะมิโนที่เป็น “หน่วยโครงสร้าง” ของโปรตีน โดยแอล-ฟีนิลอะลานีน (L-phenylalanine) จัดเป็นกรดอะมิโนที่จำเป็นที่ร่างกายสร้างเองไม่ได้ ต้องได้รับจากการรับประทานอาหารเท่านั้น อาหารที่อุดมไปด้วยแอล-ฟีนิลอะลานีน คือ เนื้อสัตว์ ปลา ไข่ ชีส และนม [1] ฟีนิลอะลานินเป็นสารตั้งต้นของไทโรซีน (tyrosine) และสารสื่อประสาทอื่น ๆ ได้แก่ แคททีโคลามีน (catecholamine) อิพิเนฟริน (epinephrine) นอร์อิพิเนฟริน (norepinephrine) ไทรามีน (tyramine) และโดปามีน (dopamine) [2] นอกจากนี้ยังมีการใช้ฟีนิลอะลานินรักษาโรคด่างขาว (โรคผิวหนังชนิดหนึ่ง) ภาวะซึมเศร้า สมาธิสั้น โรคพาร์กินสัน เป็นต้น [3,4]

ไทโรซีนเป็นสารตั้งต้นของสารสื่อประสาทและเป็นกรดอะมิโนที่ร่างกายสังเคราะห์ได้เองจากฟีนิลอะลานีน แต่หากร่างกายได้รับฟีนิลอะลานีนไม่เพียงพอ จะทำให้ร่างกายสังเคราะห์ไทโรซีนไม่ได้ และส่งผลให้ไทโรซีนกลายเป็นกรดอะมิโนจำเป็นทันที เช่น ในกรณีผู้ที่ป่วยเป็นโรคฟีนิลคีโตนูเรีย จะไม่สามารถเปลี่ยนฟีนิลอะลานีนเป็นไทโรซีนเหมือนคนปกติ [5] หรือในทางกลับกัน ผู้ป่วยที่มีภาวะขาดฟีนิลอะลานิน การรับประทานฟีนิลอะลานินอาจช่วยบรรเทาภาวะขาดฟีนิลอะลานินในเด็กที่เป็นโรคไทโรซีนีเมียได้ [3,4]

การรับประทานผลิตภัณฑ์เสริมอาหารจึงเป็นทางเลือกหนึ่งเพื่อบรรเทาภาวะขาดฟีนิลอะละนีนและ/

หรือไทโรซีน ซึ่งปัจจุบันมีผลิตภัณฑ์เสริมอาหารจำนวนมากวางจำหน่ายให้เลือกบริโภค ดังนั้นเพื่อความปลอดภัยและเป็นการคุ้มครองผู้บริโภคจึงควรมีวิธีที่มีประสิทธิภาพสำหรับตรวจสอบคุณภาพสินค้า

การวิเคราะห์ฟีนิลอะลานีนและไทโรซีนแบบพร้อมกัน 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-mercaptopropionic acid [11] เป็นสารเตรียมอนุพันธ์สำหรับเพิ่มหมู่โครโมฟอร์ในโครงสร้างเพื่อเพิ่มความสามารถในการดูดกลืนแสงสำหรับเทคนิคโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง หรือการเตรียมอนุพันธ์ด้วย ethylchloroformate [12], *N*- methyl- *N*- ( *tert*. - butyldimethylsilyl) tri fluoroacetamide [13] และ *N,O*-bis(trimethylsilyl) trifluoroacetamide with trimethylchlorosilane [14] เพื่อลดสภาพขั้วและเพิ่มความสามารถในการระเหยกลายเป็นไอให้เหมาะสมกับเทคนิคแก๊สโครมาโทกราฟี ถึงแม้ว่าการเตรียมอนุพันธ์จะเพิ่มประสิทธิภาพการแยกและการตรวจวัด แต่เป็นการเพิ่มขั้นตอนการเตรียมตัวอย่าง
ซึ่งทำให้เวลาในการวิเคราะห์นานขึ้น

เทคนิคไฮโดรฟิลลิกอินเตอร์แอคชั่นลิควิดโครมาโทกราฟี (hydrophilic interaction liquid chromatography, HILIC) เป็นหนึ่งในเทคนิคโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง โดยอาศัยพื้นฐานของการใช้วัฏภาคนิ่งหรือคอลัมน์แบบมีขั้ว (เหมือนเทคนิคนอร์มอลเฟส) และวัฏภาคเคลื่อนที่ที่มีขั้ว (เหมือนเทคนิครีเวิร์สเฟส) ซึ่งประกอบด้วยน้ำและตัวทำละลายอินทรีย์ที่ละลายน้ำได้ดี เทคนิค HILIC จึงเหมาะกับการแยกโมเลกุลที่มีสภาพขั้วสูงหรือโมเลกุลที่แตกตัวเป็นไอออนและละลายน้ำได้ดี (เหมือนเทคนิคไอออนโครมาโทกราฟี) [15]

งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์ คือ เพื่อพัฒนาวิธีไฮโดรฟิลลิกอินเตอร์แอคชั่นลิควิดโครมาโทกราฟีที่มีการตรวจวัดแบบโฟโตไดโอดอาเรย์เพื่อหาปริมาณฟีนิลอะลานีนและไทโรซีนแบบพร้อมกันในผลิตภัณฑ์เสริมอาหารโดยไม่ผ่านการเตรียมอนุพันธ์ โดยศึกษาสภาวะต่าง ๆ ทั้งขั้นตอนการเตรียมตัวอย่างและสภาวะการตรวจวัด เพื่อให้ได้วิธีวิเคราะห์ที่มีความเที่ยงและความแม่นยำสูงที่สามารถนำไปประยุกต์ใช้ในงานประจำสำหรับการควบคุมคุณภาพสินค้าในอุตสาหกรรมยาหรือผลิตภัณฑ์เสริมอาหาร

## 2. อุปกรณ์และวิธีการ

### 2.1 สารเคมี

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

สารเคมีประกอบด้วยแอล-ฟีนิลอะลานีน (Sigma-Aldrich, USA) แอล-ไทโรซีน (Sigma-Aldrich, USA) อัลฟา-เมทิลฟีนิลอะลานีน (Sigma-Aldrich, USA) กรดไฮโดรคลอริค (RCI Labscan, Thailand) แอมโมเนียมฟอร์เมต (Sigma-Aldrich, USA) ฟอร์มิก (Fisher, United Kingdom) แอมโมเนีย (Carlo erba, France) ตัวทำละลายอินทรีย์ ได้แก่ อะซิโตไนไตรล์ (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) การ์ดคอลัมน์ชนิดไดไฮดรอกซีโพรพิว (Inertsil HILIC, 3 mm x 10 mm x 3 µm; GL Sciences, Japan) คอลัมน์วิเคราะห์ชนิดไดไฮดรอกซีโพรพิว (Inertsil HILIC, 3 mm x 150 mm x 3 µm; GL Sciences, Japan) ตัวตรวจวัดชนิดโฟโตไดโอดอาเรย์ (SPD-20A, Shimadzu, Japan) โปรแกรมควบคุมการทำงานและประมวลผล Lab Solution (version 5.93)

เครื่องโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูงตั้งอุณหภูมิตู้อบคอลัมน์ที่ 30 องศาเซลเซียส ปริมาตรการฉีดตัวอย่าง 4 ไมโครลิตร วัฏภาคเคลื่อนที่ประกอบด้วยอะซิโตไนไตรล์และสารละลายแอมโมเนียมฟอร์เมต เข้มข้น 50 mM อัตราส่วน 84 : 16 (v/v) ที่อัตราการไหล 0.8 มิลลิลิตรต่อนาที ตรวจวัดฟีนิลอะลานีนและอัลฟา-เมทิลฟีนิลอะลานีนที่ความยาวคลื่น 210 นาโนเมตร และไทโรซีนที่ความยาวคลื่น 225 นาโนเมตร

**2.3 ตัวอย่างผลิตภัณฑ์เสริมอาหาร**

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

นำตัวอย่างผลิตภัณฑ์เสริมอาหาร 20 แคปซูล มาชั่งน้ำหนักเพื่อหาน้ำหนักเฉลี่ยของผงของแต่ละแคปซูล จากนั้นนำผงผลิตภัณฑ์เสริมอาหารทั้งหมดผสมให้เป็นเนื้อเดียวกัน แล้วเก็บตัวอย่างผลิตภัณฑ์เสริมอาหารไว้ในขวดสีชา ปิดฝาให้มิดชิด เก็บไว้ในที่แห้ง ไม่โดนแสงแดด

**2.4 วิธีการทดลอง**

2.4.1 การสกัดฟีนิลอะลานีนและไทโรซีนจากผลิตภัณฑ์เสริมอาหาร

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

2.4.2 การสร้างกราฟมาตรฐานภายใน

กราฟมาตรฐานภายใน (internal calibration curve) เป็นกราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของฟีนิลอะลานีนหรือไทโรซีน (แกน x) กับอัตราส่วนของพื้นที่ใต้พีคระหว่างฟีนิลอะลานีนหรือไทโรซีนกับสารมาตรฐานภายใน (แกน y)

การเตรียมสารละลายมาตรฐานผสมฟีนิลอะลานีนและไทโรซีนสำหรับการสร้างกราฟมาตรฐานภายในใช้สารละลายกรดไฮโดรคลอริค เข้มข้น 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 เพื่อใช้สำหรับการแยกฟีนิลอะลานีนและไทโรซีน โดยมีอัลฟา-เมทิลฟีนิลอะลานีนเป็นสารมาตรฐานภายใน โดยเลือกใช้วัฏภาคนิ่งที่มีหมู่ไดไฮดรอกซีโพรพิวที่สร้างพันธะกับซิลิกาเจล ซึ่งคงค้าง (retain) สารมีขั้วสูงได้ดี โดยในการเลือกสภาวะที่เหมาะสมของแต่ละพารามิเตอร์จะพิจารณาจากความสามารถในการแยก (resolution) รูปร่างพีค (peak shape) สภาพไว (sensitivity) และเวลาในการวิเคราะห์ (analysis time)

3.1.1 ความยาวคลื่นที่ใช้ตรวจวัด

เนื่องจากฟีนิลอะลานีน ไทโรซีน และอัลฟา-เมทิลฟีนิลอะลานีนมีหมู่ฟังก์ชันที่สามารถดูดกลืนแสงอัลตราไวโอเลต แต่ความสามารถในการดูดกลืนแสงในแต่ละความยาวคลื่นไม่เท่ากัน ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงเลือกใช้เครื่องตรวจวัดค่าการดูดกลืนแสงชนิดโฟโตไดโอดอาเรย์ ซึ่งตรวจวัดค่าการดูดกลืนแสงได้หลายความยาวคลื่นพร้อมกัน ทำให้สามารถเลือกความยาวคลื่นที่ให้ค่าการดูดกลืนแสงสูงสุดของสารแต่ละตัว เพื่อให้ได้สภาพไวและความจำเพาะที่ดีที่สุด (รูปที่ 1)

ผลการทดลองพบว่าฟีนิลอะลานีนและอัลฟา-เมทิลฟีนิลอะลานีนมีค่าการดูดกลืนแสงสูงสุดที่ความยาวคลื่น 210 นาโนเมตร และไทโรซีนมีค่าการดูดกลืนแสงสูงสุดที่ความยาวคลื่น 225 นาโนเมตร ดังนั้น จึงเลือกตรวจวัดสารทั้งสามชนิดที่ความยาวคลื่นเหล่านี้ เพื่อให้ได้สภาพไวสูงสุด

3.1.2 วัฏภาคเคลื่อนที่

(1) องค์ประกอบของวัฏภาคเคลื่อนที่ วัฏภาคเคลื่อนที่โดยทั่วไปของเทคนิค HILIC ประกอบด้วยตัวทำละลายอินทรีย์สภาพมีขั้วสูงที่ละลายน้ำได้ดี เช่น อะซิโตไนไตรล์และเมทานอลกับน้ำหรือสารละลายบัฟเฟอร์ [15] เนื่องจากฟีนิลอะลานีนและอัลฟา-เมทิลฟีนิลอะลานีน มีค่าการดูดกลืนแสงสูงสุดที่

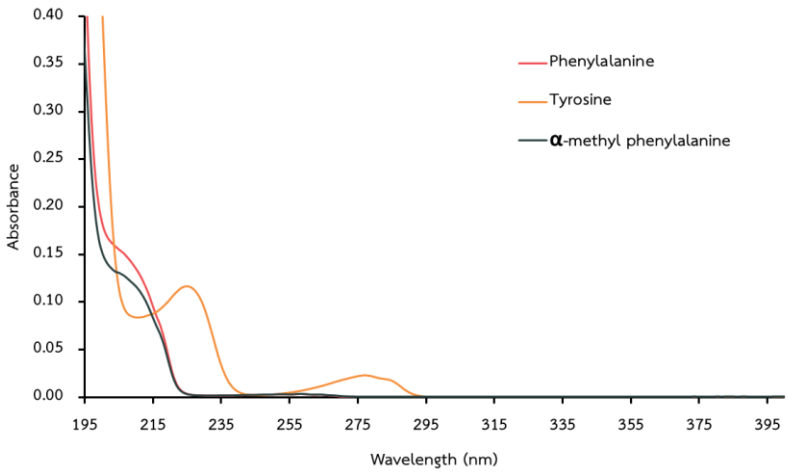


**Figure 1** UV absorption spectra of phenylalanine, tyrosine and α-methyl phenylalanine (internal standard) at 200, 200 and 150 mg/L, respectively

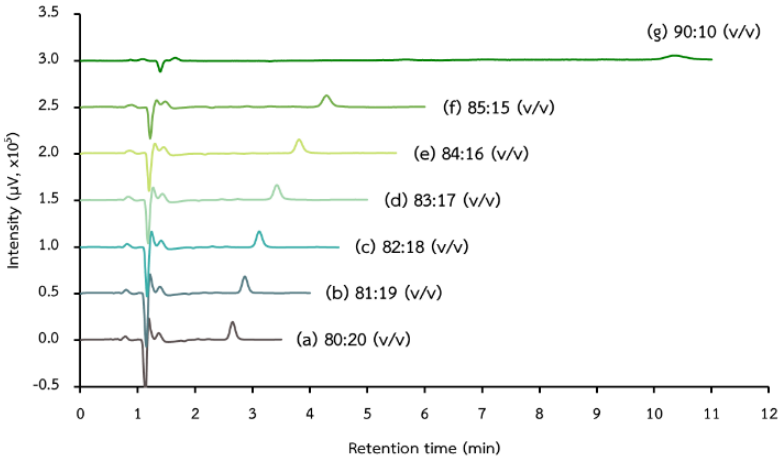


**Figure 2** HILIC chromatograms at 210 nm for the detections of phenylalanine (#) and α-methyl phenylalanine (*) using acetonitrile : 50 mM of ammonium formate pH 3 at (a) 80 : 20, (b) 81 : 19, (c) 82 : 18, (d) 83 : 17, (e) 84 : 16, (f) 85 : 15 and (g) 90 : 10 (v/v) as the mobile phase

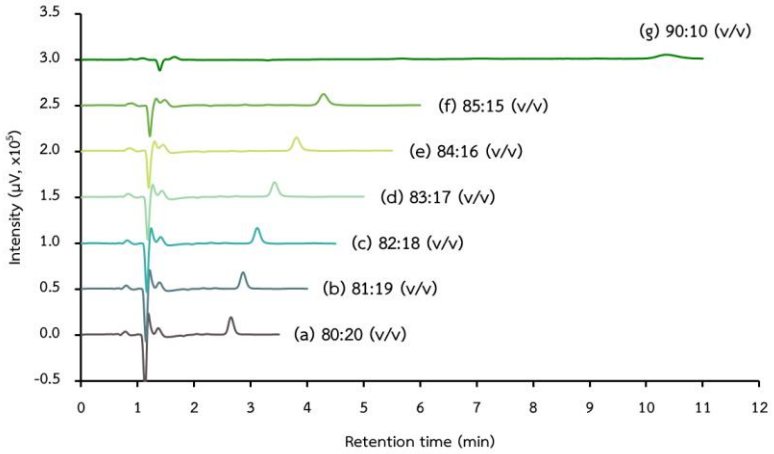


**Figure 3** HILIC chromatograms at 225 nm for the detections of tyrosine using acetonitrile : 50 mM of ammonium formate pH 3 at (a) 80 : 20, (b) 81 : 19, (c) 82 : 18, (d) 83 : 17, (e) 84 : 16, (f) 85 : 15 and (g) 90 : 10 (v/v) as the mobile phase

ความยาวคลื่น 210 นาโนเมตร งานวิจัยนี้จึงเลือกใช้อะซิโตไนไตรล์เป็นตัวทำละลายอินทรีย์ เนื่องจากมีค่า UV cut-off ที่ 190 นาโนเมตร คอลัมน์ที่เลือกใช้ในงานนี้มีความสามารถทน pH ได้ในช่วง 2-7.5 ซึ่งโดยปกติสารเติมแต่งไอออน (ionic additive) นิยมใช้แอมโมเนียมอะซิเตตหรือแอมโมเนียมฟอร์เมต เนื่องจากสามารถละลายในอะซิโตไนไตรล์ได้ดี [16] เพื่อควบคุม pH และ ionic strength ของวัฏภาคเคลื่อนที่ ซึ่งบัฟเฟอร์ชนิดนี้ส่งผลต่อสภาพขั้วของสาร ทำให้มีผลต่อพฤติกรรมการแยกในเทคนิค HILIC [15,16] งาน วิจัยนี้ศึกษา pH ของสารละลายบัฟเฟอร์ (pH 3-7) โดยนำมาผสมกับอะซิโตไนไตรล์ที่อัตราส่วน

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

ผลการทดลองพบว่าเมื่อใช้สารละลายแอมโมเนียมฟอร์เมต pH 3 เข้มข้น 50 mM เป็นวัฏภาคเคลื่อนที่ สารทั้งสามชนิดมีรูปร่างพีคดีที่สุด โดยเมื่อศึกษาอัตราส่วนของอะซิโตไนไตรล์ : สารละลายแอมโมเนียมฟอร์เมต pH 3 เข้มข้น 50 mM พบว่าเมื่อเพิ่มปริมาตรของอะซิโตไนไตรล์จะทำให้พีคของสารทั้งสามชนิดเคลื่อนที่ออกมาช้าลง เนื่องจากเป็นการลดความแรงของวัฏภาคเคลื่อนที่ โดยจากการศึกษาผลของ pH 3-7 ที่อัตราส่วนต่าง ๆ พบว่าอะซิโตไนไตรล์ : สารละลายแอมโมเนียมฟอร์เมต pH 3 เข้มข้น 50 mM อัตราส่วน 84 : 16 (v/v) ให้การแยกที่ดีที่สุด (ค่า resolution > 1.5) มีรูปร่างพีคที่ดี (ค่า tailing factor < 1.5) และใช้เวลาในการวิเคราะห์เป็นที่น่าพอใจ (4.5 นาที) ดังนั้นจึงเลือกสภาวะนี้สำหรับการวิเคราะห์ต่อไป

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

**3.2 การสกัดฟีนิลอะลานีนและไทโรซีน**

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) อะซิโตไนไตรล์ : สารละลายแอมโมเนียมฟอร์เมต pH 3 เข้มข้น 50 mM อัตราส่วน 84 : 16 (v/v) (วัฏภาคเคลื่อนที่) (b) สารละลายแอมโมเนียมฟอร์เมต pH 3 เข้มข้น 50 mM (c) น้ำ type I และ (d) สารละลายกรดไฮโดรคลอริค เข้มข้น 0.1 M ซึ่งตัวสกัดทั้ง 4 ชนิดพิจารณาเริ่มจากสารละลายที่เป็นวัฏภาคเคลื่อนที่ของวิธี HILIC เพื่อป้องกันการเกิดการหักเหของแสงในขั้นตอนการตรวจวัด ซึ่งอาจทำให้การวัดค่าการดูดกลืนแสงผิดพลาดได้ นอกจากนี้ได้เลือกศึกษาตัวสกัดอื่นที่มีสภาพขั้วและความสามารถในการละลายเหมาะกับสารที่สนใจ การทดลองใช้ปริมาตรของตัวสกัดเท่ากันและใช้วิธีการสกัดแบบการใช้คลื่นเสียงความถี่สูง (ultrasonication) เป็นเวลา 30 นาที ในรูปที่ 4 พบว่าปริมาณของฟีนิลอะลานีนที่ได้จากตัวสกัดทั้ง 4 ชนิด มีปริมาณใกล้เคียงกัน แต่ปริมาณไทโรซีนที่สกัดได้จากสารละลายกรดไฮโดรคลอริค เข้มข้น 0.1 M ได้ปริมาณสูงที่สุด และปริมาณที่สกัดได้จะลดลงเมื่อใช้ น้ำ type I สารละลายแอมโมเนียมฟอร์เมต pH 3 และวัฏภาคเคลื่อนที่ ตามลำดับ เนื่องจากสารละลายกรดไฮโดรคลอริค เข้มข้น 0.1 M มีสภาพขั้วและ pH เหมาะสมกับการละลายของไทโรซีนมากที่สุด ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงเลือกสารละลายกรดไฮโดรคลอริค เข้มข้น 0.1 M เป็นตัวสกัด เนื่องจากมีประสิทธิภาพดีที่สุด

3.2.2 วิธีสกัดและเวลาสกัด

เพื่อให้ได้ประสิทธิภาพการสกัดที่ดีที่สุด คือ 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 วิธี ให้ผลการทดลองไปในแนวทางเดียวกัน คือ เมื่อใช้เวลาในการสกัดนานขึ้นจะทำให้ได้ปริมาณที่สกัดมากขึ้น และจะคงที่เมื่อถึงสภาวะสมดุล โดยเมื่อสกัดด้วยวิธีการใช้คลื่นเสียงความถี่สูงเป็นเวลา 30 นาที วิธีเขย่าเป็นเวลา 15 นาที และวิธี Vortex เป็นเวลา 3 นาที ซึ่งเป็นเวลาสกัดที่ดีที่สุดของแต่ละวิธีสกัดนั้น สามารถ

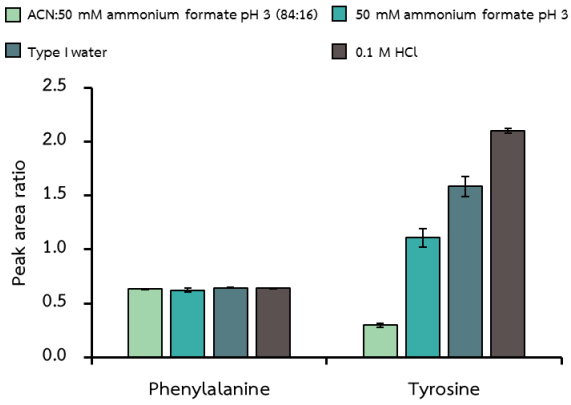


**Figure 4** Effect of extractant on the extraction efficiency

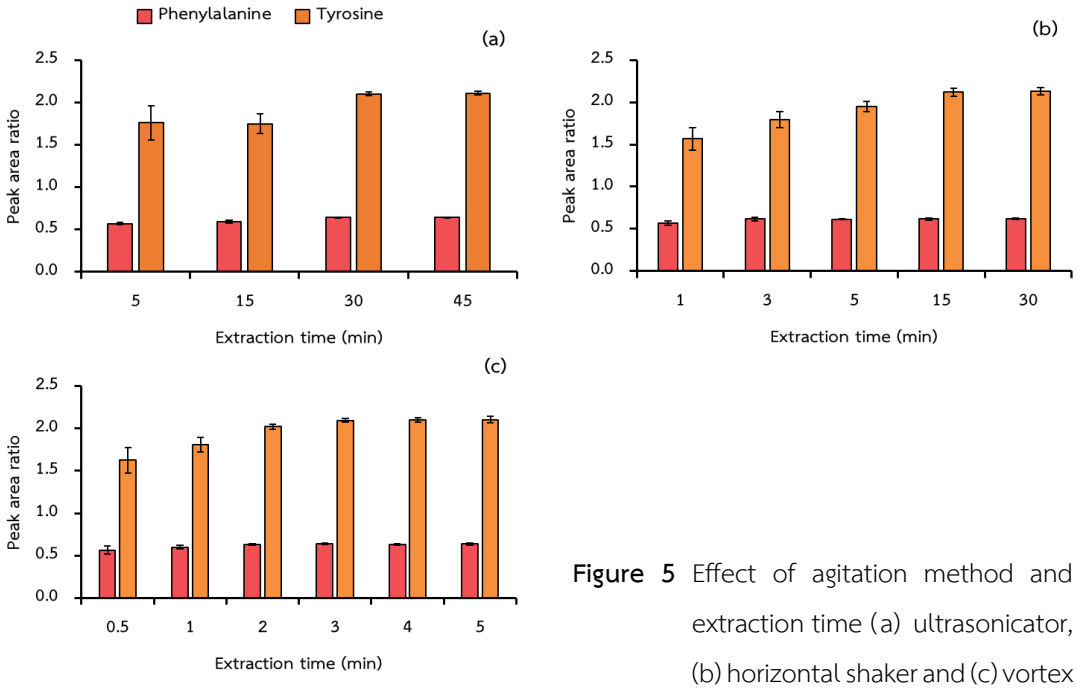


**Figure 5** Effect of agitation method and extraction time (a) ultrasonicator, (b) horizontal shaker and (c) vortex

สกัดฟีนิลอะลานีนและไทโรซีนได้ปริมาณใกล้เคียงกัน 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) และความแม่น (accuracy) แสดงในตารางที่ 1 พบว่าวิธีที่พัฒนาขึ้นมีความเป็นเส้นตรงอยู่ในช่วงความเข้มข้น 1-500 มิลลิกรัมต่อลิตร และมีค่า $r^2$ = 0.9999 แสดงให้เห็นว่าวิธีที่พัฒนาขึ้นมีช่วงความเป็นเส้นตรงที่กว้าง สามารถวิเคราะห์หาปริมาณฟีนิลอะลานีนและไทโรซีนในตัวอย่างที่มีความเข้มข้นที่ต่างกันได้ สามารถตรวจวัดฟีนิลอะลานีนและไทโรซีนต่ำถึง 0.7 และ 0.3 มิลลิกรัมต่อลิตร และหาปริมาณได้ต่ำถึง 1 และ 0.8 มิลลิกรัมต่อลิตร ตามลำดับ วิธีนี้มีความเที่ยงที่สูงมากเนื่องจากมีการใช้สารมาตรฐานภายใน โดยมีค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ 0.73-0.93 % และ 1.75-1.76 % ของการทำซ้ำภายในวันเดียวและการซ้ำระหว่างวัน ตามลำดับ ทำให้ค่า $HorRat_r$ อยู่นอกช่วงที่กำหนด โดยผลการตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีที่พัฒนาขึ้นนี้พบว่ายังอยู่ในช่วงการยอมรับได้ของ AOAC

**3.4 การวิเคราะห์หาปริมาณฟีนิลอะลานีนและไทโรซีนในผลิตภัณฑ์เสริมอาหาร**

ได้นำวิธีที่พัฒนาขึ้นไปประยุกต์ใช้ในการหาปริมาณฟีนิลอะลานีนและไทโรซีนในผลิตภัณฑ์เสริมอาหาร 8 ตัวอย่าง ทั้งแบบชนิดสารอาหารเดี่ยวและชนิดสารอาหารผสม ดังแสดงในตารางที่ 2 พบว่า

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

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

[a] 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]; [b] mg/L; [c] Ten replicates (n = 10)

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

| Samples | Phenylalanine | | | | Tyrosine | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | Labels | Contents | Recoveries (%)[a] | | Labels | Contents | Recoveries (%)[a] | |
| | (mg/capsule) | (mg/capsule)[a] | 10 mg/L[b] | 50 mg/L[b] | (mg/capsule) | (mg/capsule)[a] | 10 mg/L[b] | 50 mg/L[b] |
| A (lot No. I) * | 500 | 500.24±1.00 | 99.04±0.73 | 98.71±0.23 | -[c] | n.d.[d] | 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 |

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

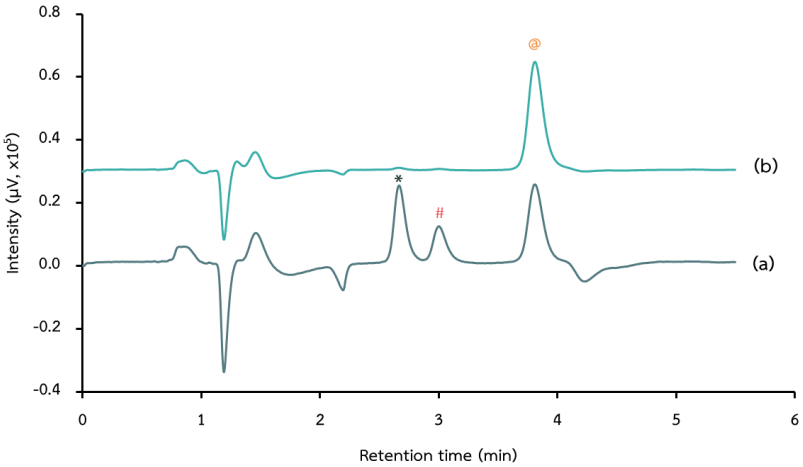


**Figure 6** The HILIC chromatograms of sample D (Lot No. I) (a) phenylalanine (#) and α-methyl phenylalanine (*) at 210 nm and (b) tyrosine (@) at 225 nm.

ปริมาณฟีนิลอะลานีนและไทโรซีนอยู่ในช่วง 149-577 และ 396-499 มิลลิกรัมต่อแคปซูล ซึ่งไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญกับฉลากที่ระบุที่ระดับความเชื่อมั่นที่ 95 % เมื่อทดสอบแบบ paired t-test นอกจากนี้ได้ศึกษาความแม่นของวิธี โดยอาศัยค่าร้อยละการกลับคืน (% recovery) ที่ความเข้มข้น 10 และ 50 มิลลิกรัมต่อลิตร พบว่าฟีนิลอะลานีนและไทโรซีนมีค่าร้อยละการกลับคืนในช่วง 95.48-101.84 และ 96.55-101.97 ซึ่งอยู่ในช่วงการยอมรับของ AOAC (ร้อยละ 90-108) แสดงให้เห็นว่าวิธีที่พัฒนาขึ้นมีความแม่นสูง โดยโครมาโทแกรมของผลิตภัณฑ์เสริมอาหาร ตัวอย่าง D (Lot No. I) แสดงดังรูปที่ 6 จะเห็นได้ว่าพีคของฟีนิลอะลานีนและไทโรซีนรวมถึงสารมาตรฐานภายในแยกออกจากเมทริกซ์ได้ดี

## 4. สรุป

งานวิจัยนี้ได้พัฒนาวิธีไฮโดรฟิลลิกอินเตอร์แอคชั่นลิควิดโครมาโทกราฟีที่มีการตรวจวัดชนิดโฟโตไดโอดอาเรย์สำหรับการหาปริมาณฟีนิลอะลานีนและไทโรซีนแบบพร้อมกันในผลิตภัณฑ์เสริมอาหาร โดยใช้เวลาในการตรวจวัดเพียง 4.5 นาที วิธีที่พัฒนาขึ้นนี้เป็นวิธีที่มีความเที่ยงและความแม่นสูงเนื่องจากมีการใช้สารละลายมาตรฐานภายในอัลฟา-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) สำนักงานวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีชั้นสูง มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์

## 6. References

[1] Foods Highest in Phenylalanine, Available Source: https://nutritiondata.self.com/foods-00008600000000000000-1.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., Zytkovicz, 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, Simulta neous 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 derivatiza tion 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 spectro metry 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 chromato graphy (HILIC) – a powerful separation technique, Anal. Bioanal. Chem. 402: 231-247.

[16] Heaton, J. and Smith, N., 2012, Advan tages 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.