พัฒนาและตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์กรดอะมิโนที่จำเป็นต่อการเจริญเติบโตของพืช

Development and Validation Method for Analysing Essential Amino Acids for Plant Growth

สุพิศสา ทองเขียว *เพชรรัตน์ ศิริวิ* *สาธิดา โพธิ์น้อย*

Supissa Thongkheaw *Phetcharat Siriwi* *Sathida Phonoi*

กลุ่มวิจัยเกษตรเคมี กองวิจัยพัฒนาปัจจัยการผลิตทางการเกษตร

ABSTRACT

Analytical method of amino acids was developed for aspartic acid, glutamic acid, proline, phenylalanine and tryptophan using high performance liquid chromatography technique. The stationary phase ratio and concentrations of buffer conditions were optimized for amino acids separation including studing of derivatize time and stability after derivatize. Amino acids were separated by gradient profile between acetonitrile and 100 mM sodium acetate trihydrate with triethylamine at a concentration of 12 mM. The time of preparation of the derivatives was 10 min. The stability of amino acid after derivatives was 4 days.

The required validation parameter i.e., specificity, matrix effect, limit of detection, limit of quantitation, range, linearity, trueness, precision and ruggedness were studied for 5 types of amino acids. The method is characterized by high specificity and no matrix effect for clearless seaweed extract and powder extract sample. The limit of detection (LOD) for aspartic acid, glutamic acid, proline, phenylalanine and tryptophan were 0.78, 0.68, 0.69, 0.05 and 4.76 μg/L, respectively and the limit of quantitation (LOQ) were in the range 0.5-50 μg/L. Verification of accuracy and precision at all LOQ levels passed the criteria. The Linearity of the instrument were found between 5-100, 5-100, 5-100, 0.5-10 and 50-1000 μg/L, respectively, and the range were found at 5-60, 5-60, 5-60, 0.5-6 and 50-600 μg/L, respectively, which correlation coefficient (r) > 0.995 passed the acceptance criteria. The accuracy from %recovery and precision from HorRat values as intermediate precision were evaluated. Recovery studies using three spiking concentratons at varying levels showed recoveries of 94.3-103.2, 96.4-102.8 and 95.9-103.5, respectively. Precision studies using three spiking concentratons at varying levels showed HorRat values of 0.31-0.61, 0.51-0.93 and 0.30-0.65, respectively. Recovery with in the range of 80-110 and HorRat values not more than 1.3 according to AOAC,2016 criteria were accepted. Ruggedness verification with changes the test conditions and comparing amino acid concentrations by statistical t-test, it was found that all values t_{cal} less than $t_{critical}$.

From the results, it was found that the characteristics of the method the acceptance criteria.This developed method is suitable for the for determine aspartic acid glutamic acid proline content within 0.005-500 mg/L concentration range, phenylalanine content within 0.0005-100 mg/L concentration range, and tryptophan content within 0.05-1000 mg/L concentration range. The results given by the

method are accurate and precise. Therefore, this method can be used as standard method for analysis of amino acid products in the laboratory.

Keywords: Amino acid Plant growth Validation method

บทคัดย่อ

พัฒนาวิธีตรวจวิเคราะห์กรดอะมิโน Aspartic acid Glutamic acid Proline Phenylalanine และ Tryptophan ด้วยเทคนิค High Performance Liquid Chromatography โดยศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการแยกกรดอะมิโน ความเข้มข้นของสารละลายบัฟเฟอร์ ระยะเวลาในการเตรียมอนุพันธ์ ความคงสภาพหลังการเตรียมอนุพันธ์ พบว่าสภาวะที่เหมาะสมในการแยกกรดอะมิโนใช้การปรับเฟสเคลื่อนที่แบบ Gradient ด้วย Acetonitrile และสารละลายบัฟเฟอร์ผสมระหว่าง Sodium acetate trihydrate ความเข้มข้น 100 มิลลิโมลาร์และ Triethylamine ความเข้มข้น 12 มิลลิโมลาร์ ระยะเวลาของการเตรียมอนุพันธ์ 10 นาที ภายหลังจากการเตรียมอนุพันธ์กรดอะมิโนมีความคงสภาพได้ถึง 4 วัน

จากการตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์ กรดอะมิโนทั้ง 5 ชนิด ซึ่งจะตรวจสอบ Specificity Matrix effect LOD LOQ Range Linearity Trueness Precision และ Ruggedness พบว่าวิธีวิเคราะห์กรดอะมิโนนั้นมีความจำเพาะเจาะจงและไม่มีการรบกวนของสารอื่นสำหรับการวิเคราะห์กรดอะมิโนในสารสกัดจากสาหร่ายที่มีลักษณะใสและชนิดผง การวิเคราะห์กรดอะมิโน Aspartic acid Glutamic acid Proline Phenylalanine และ Tryptophan มีค่า LOD เท่ากับ 0.78 0.68 0.69 0.05 และ 4.76 ไมโครกรัมต่อลิตร ตามลำดับ และมีค่า LOQ อยู่ในช่วง 0.5-50 ไมโครกรัมต่อลิตร การพิสูจน์ความถูกต้องและความเที่ยงที่ระดับ LOQ พบว่าทุกค่าผ่านเกณฑ์ยอมรับ จากผลการตรวจสอบ Range และ Linearity พบว่ามี Linearity ของเครื่องมือวิเคราะห์อยู่ในช่วง 5-100 5-100 5-100 0.5-10 และ 50-1000 ไมโครกรัมต่อลิตร ตามลำดับ และประเมิน Range ในช่วง 5-60 5-60 5-60 0.5-6 และ 50-600 ไมโครกรัม ต่อลิตร ตามลำดับ ซึ่งผ่านเกณฑ์ยอมรับ Correlation coefficient (r) >0.995 การประเมินค่า Trueness จาก %Recovery และ Precision แบบ within laboratory precision จากค่า HorRat พบว่าการวิเคราะห์กรดอะมิโนที่ความเข้มข้นต่ำ กลางและสูง มี %Recovery อยู่ในช่วง 94.3-103.2 96.4-102.8 และ 95.9-103.5 ตามลำดับ มีค่า HorRat อยู่ในช่วง 0.31-0.61 0.51-0.93 และ 0.30-0.65 ตามลำดับ ซึ่งทั้งหมดมี %Recovery อยู่ในช่วงเกณฑ์การยอมรับและค่า 80-110 และมีค่า HorRat ไม่เกิน 1.3 ตามเกณฑ์กำหนดของ AOAC (2016) การตรวจสอบ Ruggedness โดยมีการเปลี่ยนแปลงสภาวะที่มีผลต่อการทดสอบและเปรียบเทียบความเข้มข้นของกรดอะมิโนด้วยวิธีทางสถิติ t-test พบว่าทุกค่า มีค่า t_{stat} น้อยกว่า $t_{critical}$

จากผลการทดสอบดังกล่าวข้างต้นพบว่าคุณลักษณะเฉพาะของวิธีเป็นไปตามเกณฑ์การยอมรับและวิธีที่พัฒนานี้มีความเหมาะสมที่จะนำไปใช้ในการวิเคราะห์หาความเข้มข้นของกรดอะมิโน Aspartic acid Glutamic acid Proline อยู่ในช่วง 0.005-500 มิลลิกรัมต่อลิตร Phenylalanine อยู่ในช่วง 0.0005-100 มิลลิกรัมต่อลิตร และ Tryptophan อยู่ในช่วง 0.05-1000 มิลลิกรัมต่อลิตร โดยให้ค่าที่มีความถูกต้องและแม่นยำจึงสามารถนำมาใช้เป็นวิธีมาตรฐานสำหรับการวิเคราะห์ผลิตภัณฑ์กรดอะมิโนในห้องปฏิบัติการได้

คำหลัก: กรดอะมิโน การเจริญเติบโตของพืช การตรวจสอบความใช้ได้ของวิธี

คำนำ

ปัจจุบันเกษตรกรให้ความสำคัญกับการผลิตพืชปลอดสารพิษมากขึ้น ลดการใช้สารเคมีหรือผลิตภัณฑ์ที่มีสารพิษตกค้างทางการเกษตรและหันกลับมาใช้ผลิตภัณฑ์ทางการเกษตรที่เป็นมิตรกับสุขภาพและสิ่งแวดล้อม อาทิเช่น การใช้สารสกัดอินทรีย์ น้ำหมักชีวภาพ สารเพิ่มประสิทธิภาพพืช และสารสกัดจากสาหร่าย เป็นต้น ทำให้หน่วยงานสารวัตรเกษตรได้มีการส่งตัวอย่างเพื่อให้ทำการตรวจสอบคุณภาพของผลิตภัณฑ์กันมากขึ้น เนื่องจากผลิตภัณฑ์บางตัวมีการอ้างว่าเป็นสารควบคุมการเจริญเติบโตพืช แต่ฉลากข้างขวดมีการเติมสารอาหารบำรุงพืชชนิดอื่นๆ ลงไปด้วย เช่น กรดอะมิโน (Amino acid) วิตามิน (Vitamin) กรดฮิวมิก (Humic acid) และสารอื่นๆจากข้อมูลการรับตัวอย่างของ

ห้องปฏิบัติการพบว่า ผลิตภัณฑ์ที่ส่งมาวิเคราะห์ส่วนใหญ่เป็นสารสกัดอินทรีย์และสารสกัดจากสาหร่ายที่ระบุว่ามีกรดอะมิโนมากถึงร้อยละ 50 ซึ่งเป็นสารที่มีความสำคัญต่อพืช ช่วยเสริมสร้างพืชให้แข็งแรง ต้านทานโรค และมีสารอาหารจำเป็นต่างๆ ที่พืชสามารถนำไปใช้ได้ง่าย Al-Said and Kamal (2008), Awad *et al.* (2007) กล่าวว่ากรดอะมิโนมีผลทั้งทางตรงและทางอ้อมต่อกิจกรรมทางสรีรวิทยาของพืชและช่วยเพิ่มคลอโรฟิลล์ในพืช กรดอะมิโนบางตัวยังเป็นสารตั้งต้นในการสร้างฮอร์โมนพืชอีกด้วย (Rivier and Crozier, 1987) และกรดอะมิโนที่พบในสารสกัดจากสาหร่ายมากที่สุด 4 อันดับแรก ได้แก่ กรดอะมิโน Aspartic acid Glutamic acid Proline และ Phenylalanine ซึ่งมีมากถึง 35-40% สำหรับการวิเคราะห์กรดอะมิโนได้มีการศึกษาและวิจัยเกี่ยวกับการพัฒนาวิธีวิเคราะห์และตรวจหาปริมาณกรดอะมิโนในผลิตภัณฑ์หรือในเมทริกซ์ต่างๆ เช่น จากการศึกษาของ Fang *et al.* (2015) ได้ทำการวิเคราะห์หาปริมาณกรดอะมิโนอิสระ 21 ชนิด ในน้ำผลไม้ ด้วยเทคนิค High Performance Liquid Chromatograpy (HPLC) ที่มีการเตรียมอนุพันธ์ด้วยการใช้สาร 6-Aminoquinolyl-N-hydroxysuccinimidyl Carbamate (AQC) ก่อนนำไปวิเคราะห์พบว่า ในน้ำผลไม้ 6 ชนิด มีปริมาณกรดอะมิโนอิสระอยู่ในช่วง 56.97-469.45 มิลลิกรัมต่อลิตร ผลการตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์กรดอะมิโน 17 ชนิดในอาหาร พบว่า มี% Recovery อยู่ในช่วง 87-104 ซึ่งอยู่ในเกณฑ์การยอมรับ (Katarzyna *et al*., 2017) จากข้อมูลข้างต้นจะพบว่ากรดอะมิโนนั้นมีความสำคัญต่อการเจริญเติบโตของพืช และการวิเคราะห์หาปริมาณกรดอะมิโนในผลิตภัณฑ์ทางการเกษตรสามารถวิเคราะห์ด้วยเทคนิค HPLC เช่นเดียวกันกับการวิเคราะห์สารควบคุมการเจริญเติบโตของพืชที่ห้องปฏิบัติการใช้เทคนิคนี้ในการตรวจวิเคราะห์ ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงมีวัตถุประสงค์ที่จะหาสภาวะที่เหมาะสมในการวิเคราะห์กรดอะมิโนที่มีในผลิตภัณฑ์สารสกัดอินทรีย์หรือสารสกัดจากสาหร่ายเพื่อให้ได้วิธีวิเคราะห์กรดอะมิโนที่เป็นมาตรฐานสำหรับใช้ในห้องปฏิบัติการ สามารถนำมาใช้ในการวิเคราะห์หาปริมาณกรดอะมิโนจากสารสกัดอินทรีย์หรือสารสกัดจากสาหร่ายที่มีจำหน่ายตามท้องตลาด เพื่อใช้เป็นข้อมูลเบื้องต้นในการให้ความรู้และแนะนำเกษตรกรในการใช้ประโยชน์จากสารสกัดอินทรีย์ได้

วิธีดำเนินการ

อุปกรณ์

1. เครื่องลิควิดโครมาโทรกราฟ (High performance liquid chromatograph (HPLC)) ยี่ห้อ Waters รุ่น Alliance ที่ติดตั้งตัวตรวจวัดชนิด Fluorescence
2. เครื่องมืออื่นๆ ได้แก่ เครื่องชั่งไฟฟ้าทศนิยม 5 ตำแหน่ง เครื่องอัลตราโซนิค ตู้บ่มเชื้อ (Incubator) เครื่องเขย่าสาร (Vortex mixer) และเครื่องปั่นเหวี่ยง (Centrifuge)
3. อุปกรณ์การกรอง ได้แก่ Pump เครื่องแก้วกรองสาร ขวดปริมาตร และกระดาษกรอง 0.22 ไมโครเมตร
4. ปิเปตอัตโนมัติ ขนาด 10-100 20-200 และ 1000 ไมโครลิตร
5. เครื่องแก้วต่าง ๆ เช่น Descicator Volumetric Flask Class A Beaker Syringe และ Recovery vial ขนาด 1 มิลลิลิตร เป็นต้น
6. วัสดุอื่นๆ ที่ใช้ในห้องปฏิบัติการ เช่น Column C18 Syringe filter และ Centrifuge tube เป็นต้น
7. สารมาตรฐานกรดอะมิโน ได้แก่ Aspartic acid 99.7% Glutamic acid 99.6% Proline 99.7% Phenylalanine 99.7% และ Tryptophan 99.5%
8. ชุดเตรียมอนุพันธ์กรดอะมิโน ประกอบด้วย 6-aminoquinolyl-N-hydroxysuccinimidyl carbamate (AQC) + Acetonitrile (Solvent 2A) และ Borate buffer
9. สารเคมี ได้แก่ Acetonitrile ชนิด HPLC grade สารละลายบัฟเฟอร์สำหรับเตรียม Mobile phase (Sodium acetate trihydrate+Triethylamine) และ สารละลาย 0.1 N Hydrochloric
10. ตัวอย่างผลิตภัณฑ์กรดอะมิโน

วิธีการ

1. การเตรียมสารละลายมาตรฐานและการเตรียมอนุพันธ์ (Derivatization) กรดอะมิโน
   1.1 เตรียมสารละลายมาตรฐานกรดอะมิโน Aspartic acid Glutamic acid Proline Phenylalanine และ Tryptophan ในสารละลาย 0.1 N HCl โดยเตรียม Stock standard ที่ความเข้มข้นประมาณ 500 มิลลิกรัมต่อลิตร และเตรียม Working standard ที่ความเข้มข้นต่างๆ สำหรับทำเป็น Standard calibration curve และ Spike ลงในตัวอย่าง
   1.2 เตรียมสารอนุพันธ์กรดอะมิโนโดยปิเปตสารละลายมาตรฐานหรือสารละลายตัวอย่างที่กรองผ่าน syringe filter ชนิด Polyvinylidene fluoride (PVDF) ขนาด 0.45 ไมโครเมตร ปริมาตร 10 ไมโครลิตร ใส่ใน Vial ขนาด 1 มิลลิลิตร (Recovery vial) เติมสารละลาย Borate buffer ปริมาตร 70 ไมโครลิตร และเติม Solvent 2A ปริมาตร 20 ไมโครลิตร เขย่าให้เข้ากัน จากนั้นนำไปให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที แล้วตั้งทิ้งไว้ให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง ก่อนนำไปวิเคราะห์ด้วยเทคนิค HPLC
   1.3 การเตรียมสภาวะของเครื่อง HPLC สำหรับวิเคราะห์กรดอะมิโน (ดัดแปลงจาก Fang *et al*., 2015) ดังนี้

Column	:	Athena C18 (5 µm, 4.6 mm x 150 mm)
Column Temp.	:	35 °C
Detector	:	Wavelength λex=250 นาโนเมตร, λem = 395 นาโนเมตร
Mobile phase	:	A = Eluent A (Sodium acetate trihydrate+Triethylamine)
		B = Acetonitrile
Elution	:	Gradient
Flow rate	:	1.0 ml/min.
Injection volume	:	5 µl
Run Time	:	30 min.

2. การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการวิเคราะห์กรดอะมิโน
   2.1 ศึกษาปรับอัตราส่วนการไหลของเฟสเคลื่อนที่ (Gradient profile) สำหรับการแยกกรดอะมิโน

ทำการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมของการแยกกรดอะมิโน 5 ชนิด ได้แก่ Aspartic acid Glutamic acid Proline Phenylalanine และ Tryptophan โดยมีวิธีการทดสอบ ดังนี้

เตรียมสารละลายมาตรฐานกรดอะมิโน 5 ชนิด โดยกรดอะมิโน Aspartic acid Glutamic acid และ Proline ที่ความเข้มข้น 60 ไมโครกรัมต่อลิตร Phenylalanine ที่ความเข้มข้น 6 ไมโครกรัมต่อลิตร และ Tryptophan ที่ความเข้มข้น 600 ไมโครกรัมต่อลิตร นำสารละลายที่ได้ไปเตรียมอนุพันธ์ แล้วนำไปฉีดเข้าเครื่อง HPLC โดยทดสอบการปรับอัตราส่วนของเฟสเคลื่อนที่ โดยอัตราส่วนสาร A : สาร B ตามอัตราส่วนดังนี้ 35:65 45:55 50:50 และ 70:30 ตามลำดับ ผลการทดสอบที่ได้นำมาพิจารณาค่าการแยก (Resolution) ของสารต้องมากกว่า 2

2.2 ศึกษาความเข้มข้นที่เหมาะสมของสารละลายบัฟเฟอร์ที่ใช้ในการวิเคราะห์กรดอะมิโน

เตรียมสารละลายมาตรฐานกรดอะมิโน 5 ชนิด โดยกรดอะมิโน Aspartic acid Glutamic acid และ Proline ที่ความเข้มข้น 60 ไมโครกรัมต่อลิตร Phenylalanine ที่ความเข้มข้น 6 ไมโครกรัมต่อลิตร และ Tryptophan ที่ความเข้มข้น 600 ไมโครกรัมต่อลิตร นำสารละลายที่ได้ไปเตรียมอนุพันธ์ และเตรียมสารละลายบัฟเฟอร์ความเข้มข้นต่างๆ ดังนี้

1) ความเข้มข้น 140 mM sodium acetate trihydrate + 17 mM triethylamine
2) ความเข้มข้น 100 mM sodium acetate trihydrate + 12 mM triethylamine
3) ความเข้มข้น 70 mM sodium acetate trihydrate + 8.5 mM triethylamine
4) ความเข้มข้น 50 mM sodium acetate trihydrate + 6 mM triethylamine

ฉีดเข้าเครื่อง HPLC ตามสภาวะที่เหมาะสมที่ได้จากข้อ 1.3 ที่มีการปรับความเข้มข้นของสารละลายบัฟเฟอร์ ผลทดสอบที่ได้นำมาพิจารณาค่าการแยก (Resolution) ของสารต้องมากกว่า 2

2.3 ศึกษาผลของระยะเวลาในการเตรียมอนุพันธ์กรดอะมิโน

เตรียมสารละลายมาตรฐานกรดอะมิโน 5 ชนิด โดยกรดอะมิโน Aspartic acid Glutamic acid และ Proline ที่ความเข้มข้น 60 ไมโครกรัมต่อลิตร Phenylalanine ที่ความเข้มข้น 6 ไมโครกรัมต่อลิตร และ Tryptophan ที่ความเข้มข้น 600 ไมโครกรัมต่อลิตร นำสารละลายที่ได้ไปเตรียมอนุพันธ์และทดสอบการให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 8 10 12 และ 15 นาที แล้วฉีดเข้าเครื่อง HPLC ตามสภาวะที่เหมาะสมที่ได้จากข้อ 1.3 ที่มีการปรับความเข้มข้นของสารละลายบัฟเฟอร์ตามข้อ 2.2 ผลทดสอบที่ได้นำมาคำนวณหาค่า % Recovery

2.4 ศึกษาความคงสภาพของกรดอะมิโนหลังการเตรียมอนุพันธ์

เตรียมสารละลายมาตรฐานกรดอะมิโน 5 ชนิด โดยกรดอะมิโน Aspartic acid Glutamic acid และ Proline ที่ความเข้มข้น 60 ไมโครกรัมต่อลิตร Phenylalanine ที่ความเข้มข้น 6 ไมโครกรัมต่อลิตร และ Tryptophan ที่ความเข้มข้น 600 ไมโครกรัมต่อลิตร นำสารละลายที่ได้ไปเตรียมอนุพันธ์ตามสภาวะที่เหมาะสมที่ได้จากข้อ 2.3 แล้วฉีดเข้าเครื่อง HPLC ตามสภาวะที่เหมาะสมที่ได้จากข้อ 1.3 และ 2.2 จากนั้นนำสารละลายไปเก็บในอุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส และนำมาทดสอบหาความเข้มข้นของกรดอะมิโนในวันที่ 2 4 และ 6 ซึ่งผลทดสอบที่ได้นำมาคำนวณหา % Recovery เปรียบเทียบกับความเข้มข้นเริ่มต้น

3. การตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์กรดอะมิโน

3.1 การหาความจำเพาะเจาะจง (Specificity) ของวิธีทดสอบ

เตรียมสารละลายมาตรฐานกรดอะมิโน 5 ชนิด โดยกรดอะมิโน Aspartic acid Glutamic acid และ Proline ที่ความเข้มข้น 60 ไมโครกรัมต่อลิตร Phenylalanine ที่ความเข้มข้น 6 ไมโครกรัมต่อลิตรและ Tryptophan ที่ความเข้มข้น 600 ไมโครกรัมต่อลิตร สารละลายแบลงค์ และสารละลายตัวอย่างกรดอะมิโน 3 ลักษณะ ได้แก่ ตัวอย่างกรดอะมิโนที่มีลักษณะใส ข้นหนืด และชนิดผง ที่ Spike สารละลายมาตรฐานกรดอะมิโนทั้ง 5 ชนิด นำสารละลายที่ได้ไปเตรียมอนุพันธ์ตามสภาวะที่เหมาะสมที่ได้จากข้อ 2.3 แล้วฉีดเข้าเครื่อง HPLC ตามสภาวะที่เหมาะสมที่ได้จากข้อ 1.3 และ 2.2 พิจารณาโครมาโทแกรม โดยดูว่ามีโครมาโทแกรมมีสารอื่นมาปลอมปนหรือรบกวนโครมาโทแกรมของสาร Aspartic acid Glutamic acid Proline Phenylalanine และ Tryptophan หรือไม่

3.2 การพิสูจน์ Matrix effect

เตรียมสารละลายมาตรฐานกรดอะมิโน Aspartic acid Glutamic acid Proline Phenylalanine และ Tryptophan อย่างละ 5 ความเข้มข้น จำนวน 2 ชุด โดยชุดที่ 1 ไม่เติมสารละลายตัวอย่าง ส่วนชุดที่ 2 เติมสารละลายตัวอย่าง นำไปเตรียมอนุพันธ์ตามสภาวะที่เหมาะสมที่ได้จากข้อ 2.3 แล้วฉีดเข้าเครื่อง HPLC ตามสภาวะที่เหมาะสมที่ได้จากข้อ 1.3 และ 2.2 แล้วนำผลความชันที่ได้มาคำนวณหาค่า %RPD ซึ่งมีเกณฑ์กำหนด < 10 ตามมาตรฐาน NATA (2018)

3.3 การหาค่าขีดจำกัดในการตรวจพบ (Limit of Detection; LOD) และขีดจำกัดในการวัดเชิงปริมาณ (Limit of Quantitation; LOQ)

เตรียมสารละลายมาตรฐานกรดอะมิโน Aspartic acid Glutamic acid Proline Phenylalanine และ Tryptophan ความเข้มข้นต่ำๆ ใส่ลงใน Sample blank จำนวน 10 ซ้ำ นำไปเตรียมอนุพันธ์ตามสภาวะที่เหมาะสมที่ได้จากข้อ 2.3 แล้วนำไปฉีดเข้าเครื่อง HPLC ตามสภาวะที่เหมาะสมที่ได้จากข้อ 1.3 และ 2.2 โดยวิเคราะห์แบบ Intermediate ไม่ต่ำกว่า 10 ซ้ำ ที่ทำต่างเวลากัน ผลทดสอบที่ได้นำมาคำนวณหาค่าเฉลี่ย ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน คำนวณค่า LOD และ LOQ ตามสูตร

$$LOD = 3\,S'_0$$

$$LOQ = 10\,S'_0$$, EURACHEM (2014)

3.4การพิสูจน์ความถูกต้อง (Trueness) และความเที่ยง (Precision) ที่ระดับ LOQ

เตรียมสารละลายมาตรฐานกรดอะมิโน Aspartic acid Glutamic acid Proline Phenylalanine และ Tryptophan ที่เติมใน Sample blank ที่มีความเข้มข้น ระดับ LOQ จำนวน 10 ซ้ำ นำสารละลายไปเตรียมอนุพันธ์ตามสภาวะที่เหมาะสม

ที่ได้จากข้อ 2.3 แล้วนำไปฉีดเข้าเครื่อง HPLC ตามสภาวะที่เหมาะสมที่ได้จากข้อ 1.3 และ 2.2 โดยวิเคราะห์แบบ Intermediate ไม่ต่ำกว่า 10 ซ้ำ ที่ทำต่างเวลากันคำนวณหาความเข้มข้นของกรดอะมิโนและประเมินความถูกต้องโดยพิจารณาค่า %Recovery อยู่ในช่วง 80-110 และประเมินความเที่ยง โดยพิจารณาจากค่า HorRat ≤ 1.3 AOAC (2016)

3.5 หาค่าช่วงความเป็นเส้นตรง (Linearity) และช่วงความเข้มข้นที่ใช้งาน (Range) ของวิธี

เตรียมสารละลายมาตรฐานกรดอะมิโน Aspartic acid Glutamic acid Proline Phenylalanine และ Tryptophan ใน Sample blank จำนวน 7 ความเข้มข้น ความเข้มข้นละ 3 ซ้ำ นำสารละลายไปเตรียมอนุพันธ์ตามสภาวะที่เหมาะสมที่ได้จากข้อ 2.3 แล้วนำไปฉีดเข้าเครื่อง HPLC ตามสภาวะที่เหมาะสมที่ได้จากข้อ 1.3 และ 2.2 จากนั้นสร้างกราฟระหว่างความเข้มข้นของสาร (x) กับ Response (y) พิจารณาช่วงที่เป็นเส้นตรงคำนวณค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ (Correlation coefficient: r) ซึ่งมีเกณฑ์การยอมรับที่ค่า r ≥ 0.995

3.6 การพิสูจน์ความถูกต้อง (Trueness) และความเที่ยง (Precision)

เตรียมสารละลายมาตรฐานกรดอะมิโน Aspartic acid Glutamic acid Proline Phenylalanine และ Tryptophan ใน Sample blank ที่ความเข้มข้นระดับต่ำ กลาง และสูง นำสารละลายไปเตรียมอนุพันธ์ตามสภาวะที่เหมาะสมที่ได้จากข้อ 2.3 แล้วนำไปฉีดเข้าเครื่อง HPLC ตามสภาวะที่เหมาะสมที่ได้จากข้อ 1.3 และ 2.2 โดยทำการทดสอบแบบ intermediate precision (ทำการทดสอบ 1 ชุดการทดสอบที่ระดับต่างๆ เป็นเวลา 10 วัน) คำนวณหาความเข้มข้นของกรดอะมิโนและประเมินความถูกต้องโดยพิจารณาค่า Recovery ต้องอยู่ในช่วง 80-110% และประเมินความเที่ยงโดยพิจารณาจากค่า HorRat ≤ 1.3

3.7 ทดสอบความคงทนของวิธี (Ruggedness)

ทำการทดสอบ Ruggedness ของวิธีวิเคราะห์กรดอะมิโนโดยปรับเปลี่ยนสภาวะที่มีผลกระทบต่อการวิเคราะห์กรดอะมิโน ได้แก่ ระยะเวลาในการ Incubate ตัวอย่าง ชนิดของตัวทำละลาย และชนิดของตัวกรองซึ่งมีวิธีการดังนี้

3.7.1 เตรียม Sample blank ที่มีการเติมสารละลายมาตรฐานกรดอะมิโน 5 ชนิด โดยเติมกรดอะมิโน Aspartic acid Glutamic acid และ Proline ที่ความเข้มข้น 30 ไมโครกรัมต่อลิตร Phenylalanine ที่ความเข้มข้น 3 ไมโครกรัมต่อลิตร และ Tryptophan ที่ความเข้มข้น 300 ไมโครกรัมต่อลิตร

3.7.2 นำสารละลายจากข้อ 3.7.1 ไปเตรียมอนุพันธ์ตามสภาวะที่เหมาะสมที่ได้จากข้อ 2.3

3.7.3 ฉีดเข้าเครื่อง HPLC ตามสภาวะที่เหมาะสมที่ได้จากข้อ 1.3 และ 2.2

3.7.4 คำนวณหาความเข้มข้น ค่าเฉลี่ย ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน และเปรียบเทียบค่าทางสถิติโดยใช้ t-test

4. การวิเคราะห์หาปริมาณกรดอะมิโนในตัวอย่าง

ตัวอย่างผลิตภัณฑ์วัตถุเคมีการเกษตรที่ส่งวิเคราะห์โดยส่วนใหญ่จะเป็นตัวอย่างสารสกัดอินทรีย์สารสกัดจากสาหร่าย และน้ำหมักชีวภาพที่หมักจากพืชหรือสัตว์ ที่มีองค์ประกอบหลากหลาย มีทั้งตัวอย่างที่เป็นสารละลายใสจนถึงตัวอย่างที่เป็นของเหลวข้นหนืด และสารสกัดจากสาหร่ายชนิดผง ดังนั้นจะต้องมีการเตรียมตัวอย่างให้เป็นสารละลายที่เหมาะสมก่อนฉีดเข้าเครื่อง HPLC เพื่อช่วยป้องกันการอุดตันของสิ่งสกปรกจากตัวอย่างในคอลัมน์และเพื่อเป็นการยืดระยะเวลาการใช้งานของคอลัมน์ด้วย โดยมีวิธีการเตรียมตัวอย่าง ดังนี้

4.1 ปิเปตตัวอย่างปริมาตร 1 มิลลิลิตร ใส่ใน Microcentrifuge tube ขนาด 1.5 มิลลิลิตร

4.2 นำไปปั่นเหวี่ยงด้วยเครื่อง Centrifuge ที่ความเร็วรอบ 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที

4.3 ปิเปตตัวอย่างปริมาตร 1 มิลลิลิตร ใส่ใน Volumetric flask ขนาด 10 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรด้วยสารละลาย 0.1 N HCl

4.4 เจือจางสารละลายให้อยู่ในช่วงกราฟมาตรฐานของกรดอะมิโนแต่ละชนิด

4.5 นำมากรองผ่าน Syringe filter ชนิด PVDF ขนาด 0.45 ไมโครเมตร

4.6 นำสารละลายที่ได้ไปเตรียมอนุพันธ์และฉีดเข้าเครื่อง HPLC

4.7 คำนวณหาปริมาณของกรดอะมิโนแต่ละชนิด

ระยะเวลา เริ่มต้น ตุลาคม 2562 สิ้นสุด กันยายน 2564

สถานที่ทำการทดลอง

1. สถานที่สำรวจและเก็บตัวอย่างผลิตภัณฑ์กรดอะมิโน จังหวัดราชบุรี ปทุมธานี นนทบุรี นครปฐม สุพรรณบุรี สมุทรสงคราม และสมุทรสาคร
2. ห้องปฏิบัติการกลุ่มงานวิเคราะห์วิจัยพืชวัตถุเคมีการเกษตรและนิวเคลียร์เทคนิคการเกษตร กลุ่มวิจัยเกษตรเคมี กองวิจัยพัฒนาปัจจัยการผลิตทางการเกษตร

ผลการทดลองและวิจารณ์

1. ผลการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการวิเคราะห์กรดอะมิโน

1.1 ผลการศึกษาปรับอัตราส่วนการไหลของเฟสเคลื่อนที่ (Gradient profile) สำหรับการแยกกรดอะมิโน

จากผลการศึกษา Gradient profile ที่เหมาะสมในการแยกพีกของกรดอะมิโนผสม 5 ชนิดออกจากสารชนิดอื่นๆ ได้มีการปรับสภาวะเริ่มต้นโดยใช้ Solvent A เป็น Eluent A (Sodium acetate trihydrate+Triethylamine) และ Solvent B เป็น Acetonitrile ตามเวลาและอัตราส่วน ดังนี้ นาทีที่ 0-10 : (95:5-90:10) นาทีที่ 10-19 : (90:10-80:20) นาทีที่ 19-23 : (80:20-40:60) นาทีที่ 23-25 : (40:60- 95:5) นาทีที่ 25-30 : (95:5-95:5) และทำการฉีดสารมาตรฐานของกรดอะมิโนผสม 5 ชนิดตามสภาวะข้างต้นพบว่า สภาวะดังกล่าวสามารถทำให้พีกของกรดอะมิโนที่สนใจศึกษาแยกออกมาดังนี้กรดอะมิโน Aspartic acid Glutamic acid Proline Phenylalanine และ Tryptophan ตามลำดับ ซึ่งพีกของ Aspartic acid และ Glutamic acid แยกออกจากพีกอื่นได้ดี แต่พีกกรดอะมิโน Proline, Phenylalanine และ Tryptophan ยังไม่สามารถแยกออกจากพีกอื่นได้จึงทำการปรับอัตราส่วนของเฟสเคลื่อนที่ในนาทีที่ 23 เพื่อให้พีกของ Proline Phenylalanine และ Tryptophan แยกออกจากพีกอื่นได้ดียิ่งขึ้นซึ่งทำให้ได้ค่าการแยก (Resolution, Rs) ดังแสดงในตารางที่ 1

Table 1 Resolution values of amino acids at various ratio of mobile phase

Amino acids	Resolution values of amino acids as various ratio				
	40:60	50:50	55:45	65:35	70:30
Aspartic acid	5.9	6.1	6.2	6.1	6.0
Glutamic acid	5.1	5.1	5.1	5.1	5.0
Proline	1.6	1.6	1.6	2.5	2.4
Phenylalanine	1.8	1.4	1.3	1.2	2.2
Tryptophan	0.0	1.6	1.3	1.6	2.0

จากตารางที่ 1 จะเห็นได้ว่าสภาวะที่ใช้ทดสอบโดยปรับอัตราส่วนของ Eluent A ต่อ Acetonitrile เป็น 70:30 สามารถแยกกรดอะมิโน Aspartic acid Glutamic acid Proline Phenylalanine และ Tryptophan ออกจากพีกอื่นได้ดี มีค่า Retention time ที่เวลา 7.60 8.63 15.59 25.11 และ 25.34 ตามลำดับ และมีค่าการแยกมากกว่า 2 ซึ่งผ่านเกณฑ์กำหนด แต่เมื่อมีการฉีดสารจำนวนหลายๆ ซ้ำ พบว่ายังมีสารอื่นเกิดขึ้นจากการ Derivatize คงค้างอยู่ในคอลัมน์ที่ใช้วิเคราะห์ทำให้เกิดการสะสม ส่งผลรบกวนพีกที่สนใจทำให้ไม่สามารถคำนวณผลการวิเคราะห์ได้ ดังนั้นจึงต้องมีการปรับ Gradient profile เพื่อลดการสะสมของสารอื่นในคอลัมน์โดยเพิ่มการล้างคอลัมน์ด้วย Solvent เพื่อไล่สิ่งสกปรกออกจากคอลัมน์ก่อนมีการฉีดสารต่อไป ซึ่งได้ผลการปรับ Gradient profile แสดงดังตารางที่ 2

Table 2 Gradient profile for separate 5 type amino acids after adjust mobile phase ratio

Time (min.)	Flow rate (ml/min.)	Solvent A (%)	Solvent B (%)	Curve
0	1.0	95	5	6
10	1.0	90	10	6
19	1.0	80	20	6
23	1.0	70	30	6
25	1.0	95	5	6
26	1.0	95	5	6
27	1.0	30	70	6
30	1.0	30	70	6
31	1.0	95	5	2
35	1.0	95	5	6

จากตารางที่ 2 เป็น Gradient profile ที่มีการปรับอัตราส่วนเพื่อทำความสะอาดคอลัมน์เพิ่มขึ้น จึงทำให้ระยะเวลาการวิเคราะห์เพิ่มขึ้น และจากการทดสอบฉีดสารมาตรฐานที่ความเข้มข้นต่างๆ หลายๆ ซ้ำ พบว่าพีกที่สนใจศึกษาสามารถแยกออกจากกันได้ดีขึ้น ไม่มีพีกอื่นๆ รบกวนพีกที่สนใจศึกษา ดังนั้นจึงได้นำสภาวะนี้ไปใช้ในการศึกษาความเข้มข้นที่เหมาะสมของสารละลายบัฟเฟอร์ในการวิเคราะห์กรดอะมิโนต่อไป

1.2 ผลการศึกษาความเข้มข้นที่เหมาะสมของสารละลายบัฟเฟอร์ในการวิเคราะห์กรดอะมิโน

จากการศึกษาความเข้มข้นที่เหมาะสมของสารละลายบัฟเฟอร์ในการวิเคราะห์กรดอะมิโนโดยปรับอัตราส่วนความเข้มข้นของสารละลายบัฟเฟอร์ผสมระหว่าง Sodium acetate trihydrate กับ Triethylamine ซึ่งเป็นการเลี่ยงการใช้บัฟเฟอร์ที่มีความเข้มข้นสูง หรือมีความเป็นกรดอ่อนๆ หากใช้ไปนานๆ อาจจะเกิดการสะสมจากเกลือของบัฟเฟอร์ตามอุปกรณ์ข้อต่อของเครื่อง HPLC ทำให้เกิดการอุดตันของท่อและข้อต่อได้ จึงมีการปรับความเข้มข้นของสารละลายบัฟเฟอร์ให้ลดลง ซึ่งผลการทดสอบได้พิจารณาจากค่าการแยกของกรดอะมิโน ดังแสดงในตารางที่ 3

Table 3 Resolution values for study of buffer concentration for 5 type amino acids analysis

Amino acids	Resolution			
	50 mM sodium acetate trihydrate + 6 mM triethylamine	70 mM sodium acetate trihydrate + 8.5 mM triethylamine	100 mM sodium acetate trihydrate + 12 mM triethylamine	140 mM sodium acetate trihydrate + 17 mM triethylamine
Aspartic acid	5.6	5.5	5.7	5.6
Glutamic acid	4.6	4.6	4.8	4.8
Proline	1.6	1.8	2.0	2.2
Phenylalanine	3.9	3.1	3.8	3.5
Tryptophan	1.9	2.0	2.0	2.0

จากตารางที่ 3 แสดงค่าการแยกซึ่งเป็นค่าที่บ่งบอกว่าพีกของสารทั้งสองพีกที่อยู่ติดกันแยกออกจากกันได้มากน้อยเพียงใด โดยมีเกณฑ์การยอมรับค่า Resolution มากกว่า 2 จากผลการทดสอบพบว่าเมื่อใช้สารละลายบัฟเฟอร์ที่ความเข้มข้น 140 mM Sodium acetate trihydrate + 17 mM Triethylamine และที่ความเข้มข้น 100 mM Sodium acetate trihydrate + 12 mM Triethylamine เป็นสารละลาย Mobile phase ทำให้พีกของกรดอะมิโนทุกตัวแยกออกจากกันได้ดี แต่เมื่อลดความเข้มข้นเป็น 70 mM Sodium acetate trihydrate + 8.5 mM Triethylamine ทำให้การแยก Proline เกิดขึ้นไม่ดี ส่วนการใช้ความเข้มข้น 50 mM Sodium acetate trihydrate + 6 mM Triethylamine

ทำให้ทั้งกรดอะมิโน Proline และ Tryptophan มีค่า Resolution ที่ต่ำกว่า 2 ดังนั้นจึงพิจารณาเลือกใช้ความเข้มข้นของสารละลายบัฟเฟอร์ที่ความเข้มข้น 100 mM Sodium acetate trihydrate + 12 mM Triethylamine ในการวิเคราะห์กรดอะมิโนทั้ง 5 ชนิด ซึ่งทำให้ค่า Resolution ของกรดอะมิโนทุกชนิดผ่านเกณฑ์ยอมรับ

1.3 ผลการศึกษาระยะเวลาที่เหมาะสมในการเตรียมสารอนุพันธ์

จากการศึกษาระยะเวลาที่เหมาะสมในการเตรียมสารอนุพันธ์ โดยนำไปให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 8 10 12 และ 15 นาที ตามลำดับ เพื่อเป็นการทดสอบระยะเวลาที่เหมาะสมในการเตรียมสารอนุพันธ์ ซึ่งจะทำให้ทราบถึงการทำปฏิกิริยาที่สมบูรณ์ของสารและทำให้ทราบว่ากรดอะมิโนจะมีการสลายตัวไปได้มากน้อยเพียงใด เมื่อใช้ระยะเวลาในการทำอนุพันธ์เพิ่มขึ้น ซึ่งพิจารณาจาก % Recovery ดังแสดงในตารางที่ 4

Table 4 The comparison of %recovery of amino acids at derivatize time

Amino acids	%Recovery			
	8 min	10 min	12 min	15 min
Aspartic acid	98.71	100.24	92.66	84.79
Glutamic acid	98.77	100.42	95.00	87.75
Proline	99.33	100.33	94.06	93.45
Phenylalanine	98.64	100.42	96.96	95.20
Tryptophan	100.01	99.86	97.69	96.41

จากตารางที่ 4 แสดงให้เห็นว่าระยะเวลาในการเตรียมอนุพันธ์กรดอะมิโนนั้นมีความสำคัญมาก การเกิดอนุพันธ์ที่สมบูรณ์จะเกิดได้ในระยะเวลา 10 นาที (Waters,1996) หากใช้ระยะเวลาที่ต่ำกว่า การเกิดอนุพันธ์อาจจะยังไม่สมบูรณ์ จากการทดลองพบว่า Aspartic acid Glutamic acid Proline และ Phenylalanine เกิดอนุพันธ์ได้ 98-99% ในระยะเวลา 8 นาที และเกิดได้ 100% เมื่อใช้ระยะเวลา 10 นาที ส่วน Tryptophan เกิดอนุพันธ์สมบูรณ์ได้ตั้งแต่นาทีที่ 8-10 สามารถเกิดอนุพันธ์ได้มากถึง 99-100% และกรดอะมิโนทุกชนิดมีแนวโน้มของการเกิดอนุพันธ์ลดลง ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากระยะเวลาที่บ่มนานเกิดไป ความร้อนที่สะสมอาจทำให้สารที่เกิดอนุพันธ์นั้นสลายตัวไปได้ ดังนั้นการทดลองนี้จึงต้องใช้ความระมัดระวังเรื่องระยะเวลาในการเตรียมอนุพันธ์กรดอะมิโนให้มาก

1.4 ผลการศึกษาความคงสภาพของกรดอะมิโนหลังการทำอนุพันธ์

กรดอะมิโนที่ได้ Derivatize แล้วไม่สามารถเก็บไว้ได้เป็นระยะเวลานาน ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับสารที่นำมาใช้ในการก่ออนุพันธ์ สารก่ออนุพันธ์บางตัวอาจจะทำให้มีความคงสภาพได้มากกว่าสัปดาห์ แต่สารบางตัวอาจจะทำให้มีความคงสภาพได้เพียงไม่กี่นาที ดังนั้นจึงต้องมีการศึกษาความคงสภาพของกรดอะมิโนที่ทำ Derivatize แล้ว เพื่อให้ทราบถึงระยะเวลาที่สามารถวิเคราะห์หรือเก็บรักษากรดอะมิโนที่จะนำมาวิเคราะห์หาปริมาณได้โดยทำการวิเคราะห์กรดอะมิโนแต่ละชนิดภายหลังจากการทำ Derivatize และเก็บตัวอย่างในอุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส จากนั้นนำมาวิเคราะห์ต่อในวันที่ 2, 4 และ 6 ซึ่งผลวิเคราะห์ที่ได้คิดเป็น %Recovery ของกรดอะมิโนแต่ละชนิดดังแสดงในตารางที่ 5

Table 5 %Recovery and difference results of amino acids analysis at various time

Amino acids	%Recovery			Difference of %Recovery		
	2 Days	4 Days	6 Days	D0-D2	D0-D4	D0-D6
Aspartic acid	99.51	97.32	96.69	0.49	2.68	3.31
Glutamic acid	99.46	98.93	97.01	0.54	1.07	2.99
Proline	99.20	97.87	94.98	0.80	2.13	5.02

Amino acids	%Recovery			Difference of %Recovery		
	2 Days	4 Days	6 Days	D0-D2	D0-D4	D0-D6
Phenylalanine	99.31	98.88	98.84	0.69	1.12	1.16
Tryptophan	99.47	98.45	96.47	0.53	1.55	3.53

จากตารางที่ 5 แสดง %Recovery ของกรดอะมิโนผสม 5 ชนิดที่ทำการวิเคราะห์ในวันที่ 2 4 และ 6 เทียบกับปริมาณกรดอะมิโนเริ่มต้น พบว่าปริมาณกรดอะมิโนที่วิเคราะห์หลังจาก Derivatize แล้วระยะเวลา 2 4 และ 6 วัน มีแนวโน้มลดลงเรื่อยๆ แต่จะเห็นได้ว่ากรดอะมิโน Phenylalanine ค่อนข้างมีความเสถียร มีปริมาณลดลงเพียงเล็กน้อยต่างจากปริมาณของกรดอะมิโน Aspartic acid, Glutamic acid และ Tryptophan ที่ลดลงอย่างช้าๆ ตามระยะเวลาที่เพิ่มขึ้น ส่วนปริมาณของกรดอะมิโน Proline มีแนวโน้มลดลงอย่างมากถึง 5 เปอร์เซ็นต์ เมื่อเก็บไว้ระยะเวลา 6 วัน ทั้งนี้อาจเกิดจากการสลายตัวของกรดอะมิโนตามระยะเวลาที่เก็บไว้ ดังนั้นหลังจากการ Derivatize กรดอะมิโนทั้ง 5 ชนิดแล้วควรนำมาวิเคราะห์ทันที และสามารถเก็บสารไว้วิเคราะห์ครั้งต่อไปได้ภายในระยะเวลา 4 วัน ซึ่งปริมาณของกรดอะมิโนจะยังคงสภาพอยู่ได้ถึง 97.32-98.93%

2. ผลการตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์กรดอะมิโน

2.1 ผลของทดสอบความจำเพาะเจาะจง (Specificity)

ผลการทดสอบ Specificity ของกรดอะมิโนผสม 5 ชนิด โดยพิจารณาจากโครมาโทแกรมของสารละลายแบล็งค์ สารละลายมาตรฐานกรดอะมิโน และตัวอย่างสารสกัด 3 ลักษณะ ที่มีการ Spike สารละลายมาตรฐานกรดอะมิโน 5 ชนิด ซึ่งมีผลการทดสอบดังแสดงในภาพที่ 1

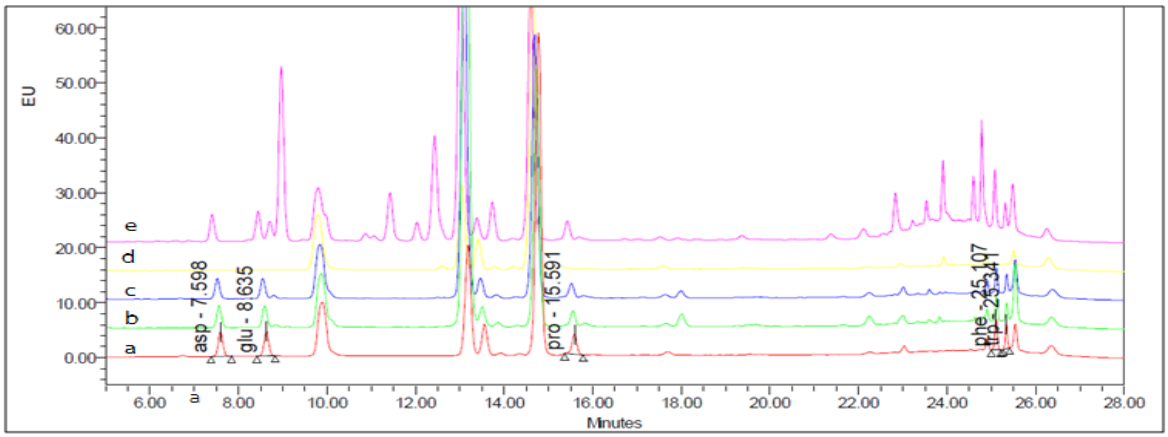

Figure 1 Chromatogram of a) Mix standard solution of 5 type amino acids b) Clear seaweed extract sample c) Seaweed extract powder sample d) Sample blank and e) Viscous seaweed extracts sample

จากภาพที่ 1 จะเห็นได้ว่าโครมาโทรแกรมของตัวอย่างเมื่อเปรียบเทียบกับโครมาโทแกรมของสารละลายมาตรฐานกรดอะมิโนผสม 5 ชนิดพบว่า ตัวอย่างสารสกัดจากสาหร่ายที่มีลักษณะใส และชนิดผง ไม่มีสารแปลกปลอมอื่นมารบกวนหรือซ้อนทับโครมาโทแกรมของกรดอะมิโนทั้ง 5 ชนิด ส่วนสารสกัดจากสาหร่ายที่มีลักษณะข้นหนืด พบว่ามีพีกอื่นมารบกวนพีกของกรดอะมิโน Glutamic acid และ Tryptophan ซึ่งพิจารณาจากค่าการแยกทั้ง 2 พีกมีค่าการแยกน้อยกว่า 2 ส่วนกรดอะมิโน Aspartic acid Proline และ Phenylalanine ไม่มีพีกของสารอื่นรบกวนหรือซ้อนทับ นั่นแสดงว่าวิธีนี้มีความจำเพาะเจาะจงสำหรับการวิเคราะห์กรดอะมิโนในสารสกัดจากสาหร่ายที่มีลักษณะใส และชนิดผง ส่วนในสารสกัดจากสาหร่ายที่มีลักษณะข้นหนืดจะมีความจำเพาะเจาะจงกับกรดอะมิโนบางตัวเท่านั้น

2.2 ผลการทดสอบ Matrix effect

จากการทดสอบ Matrix effect ของการวิเคราะห์กรดอะมิโนผสม 5 ชนิดในตัวอย่างสารสกัดจากสาหร่ายที่มีลักษณะใส ซึ่งผลจากการพล็อตกราฟสารมาตรฐาน 5 ระดับความเข้มข้น และพิจารณาความต่างสัมพัทธ์ (%RPD) ของ

ความชันของกราฟมาตรฐานกรดอะมิโนทั้ง 5 ชนิด พบว่า กรดอะมิโน Aspartic acid Glutamic acid Proline Phenylalanine และ Tryptophan มี %RPD เท่ากับ 9.64 9.62 4.25 6.18 และ 1.35 ตามลำดับ ซึ่ง %RPD อยู่ในเกณฑ์กำหนด (%RPD < 10) ตามมาตรฐาน NATA (2018) แสดงว่าการวิเคราะห์กรดอะมิโนในตัวอย่างที่เป็นสารสกัดจากสาหร่ายที่มีลักษณะใสไม่มี Matrix effect ซึ่งผลการทดสอบแสดงดังภาพที่ 2

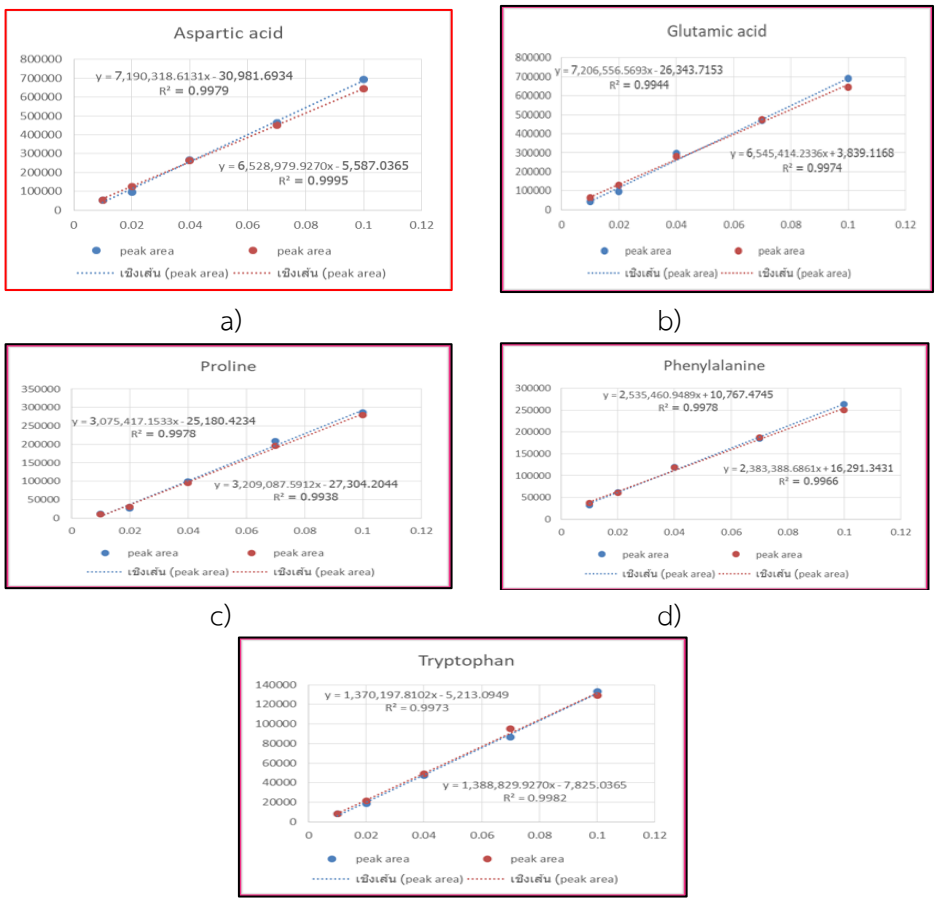

Figure 2 Results of the matrix effect for amino acid analysis of a) Aspartic acid b) Glutamic acid c) Proline d) Phenylalanine e) Tryptophan in clear seaweed extract sample

ในส่วนของการศึกษา Matrix effect ในสารสกัดจากสาหร่ายที่มีลักษณะข้นหนืด พบว่า กรดอะมิโน Aspartic acid Glutamic acid Proline Phenylalanine และ Tryptophan มี %RPD เท่ากับ 10.14 12.39 45.15 33.64 และ 0.36 ตามลำดับ ซึ่ง %RPD ของการวิเคราะห์กรดอะมิโน Aspartic acid Glutamic acid Proline Phenylalanine มีค่าเกินเกณฑ์กำหนด (%RPD < 10) แสดงว่าการวิเคราะห์กรดอะมิโนในตัวอย่างดังกล่าวมี Matrix effect มีเพียงกรดอะมิโน Tryptophan ที่ไม่มี Matrix effect

2.3 ขีดจำกัดในการตรวจพบ (Limit of Detection; LOD) และขีดจำกัดในการวัดเชิงปริมาณ (Limit of Quantitation; LOQ)

จากการหาค่าขีดจำกัดในการตรวจพบ (Limit of Detection; LOD) โดยการเติมสารมาตรฐานกรดอะมิโน Aspartiic acid Glutamic acid Proline Phenylalanine และ Tryptophan ที่มีความเข้มข้นต่ำๆ ลงในตัวอย่างที่ไม่มีสารที่ต้องการทดสอบ (Sample blank) แล้วนำมาดำเนินการวิเคราะห์ด้วยเครื่อง HPLC ผลที่ได้นำมาคำนวณส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน ค่า LOD และ LOQ พบว่ากรดอะมิโน 5 ชนิดมีค่า LOD เท่ากับ 0.78 0.68 0.69 0.05 และ 4.76 ไมโครกรัมต่อลิตร ตามลำดับ และค่า LOQ จากการคำนวณมีค่าเท่ากับ 2.6 2.3 2.3 0.2 และ 15.9 ไมโครกรัมต่อลิตร ตามลำดับ ซึ่งมีผลการทดสอบแสดงดังตารางที่ 6

Table 6 Limit of detection and limit of quantitation for 5 amino acids analysis

Rep.	Concentration of amino acids (µg/L)				
	Aspartic acid	Glutamic acid	Proline	Phenylalanine	Tryptophan
1	11.50	11.48	9.48	0.98	88.7
2	10.76	10.67	9.67	1.01	99.5
3	11.13	12.51	10.51	0.99	94.7
4	10.12	12.65	9.65	1.00	99.3
5	10.43	11.23	9.03	1.02	94.7
6	9.54	11.10	11.58	0.92	87.2
7	10.62	10.65	9.59	1.03	97.5
8	9.07	11.98	9.98	1.12	96.9
9	9.48	10.93	10.55	0.96	88.4
10	11.23	11.15	9.67	0.99	87.3
mean	10.39	11.44	9.97	1.00	93.42
SD	0.82	0.72	0.73	0.05	5.02
S'_0	0.26	0.23	0.23	0.02	1.59
LOD	0.78	0.68	0.69	0.05	4.76
Predict LOQ	2.6	2.3	2.3	0.2	15.9

2.4 พิสูจน์ความถูกต้อง (Trueness) และความเที่ยง (Precision) ที่ระดับ LOQ

จากค่า Predict LOQ ที่คำนวณได้ในตารางที่ 6 นำค่าที่ได้มาทำการพิสูจน์ความถูกต้องและความเที่ยงที่ระดับ LOQ โดยทำการ Spike สารมาตรฐานกรดอะมิโนความเข้มข้นที่ระดับ Predict LOQ ของกรดอะมิโนแต่ละตัวลงในสารละลายตัวอย่าง จากนั้นดำเนินการวิเคราะห์ด้วยเครื่อง HPLC พบว่า ผลการวิเคราะห์กรดอะมิโน Aspartiic acid Glutamic acid Proline Phenylalanine และ Tryptophan มีค่า %Recovery เท่ากับ 78.73 77.17 70.44 78.37 และ 75.45 ตามลำดับ ซึ่งทั้งหมดมีค่าต่ำกว่าเกณฑ์การยอมรับ ที่ 80-110% ตามมาตรฐาน AOAC (2016) ของสารที่มีความเข้มข้นต่ำกว่า 10 มิลลิกรัมต่อลิตร ทั้งนี้อาจเกิดขึ้นได้มีการเจือจางสารมาตรฐานหลายเท่า ส่งผลทำให้ผลการวิเคราะห์คลาดเคลื่อนได้สูง ดังนั้นจึงทำการทดสอบโดยการเติมสารมาตรฐานกรดอะมิโนที่ความเข้มข้นที่สูงขึ้น เพื่อพิสูจน์ความถูกต้องและความเที่ยงที่ระดับ LOQ โดยกรดอะมิโน Aspartic acid Glutamic acid และ Proline ทดสอบที่ความเข้มข้น 5 ไมโครกรัมต่อลิตร Phenylalanine ทดสอบที่ความเข้มข้น 0.5 ไมโครกรัมต่อลิตร และ Tryptophan ทดสอบที่ความเข้มข้น 50 ไมโครกรัมต่อลิตร พบว่า มี %Recovery เท่ากับ 103.65 100.90 96.29 94.94 และ 86.92 ตามลำดับ ค่าที่ได้อยู่ในช่วงเกณฑ์ยอมรับที่ 80-110 % มีค่า HorRat เท่ากับ 0.17 0.22 0.27 0.20 และ 0.32 ตามลำดับ ซึ่งผ่านเกณฑ์ยอมรับค่า HorRat ≤ 1.3 ตามมาตรฐาน AOAC (2016) ผลการทดสอบที่ได้แสดงดังตารางผนวก 1

2.5 ช่วงความเป็นเส้นตรง (Linearity) และ ช่วงความเข้มข้นที่ใช้งาน (Range) ของวิธี

2.5.1 จากการศึกษาช่วงความเป็นเส้นตรง (Linearity) โดยทำการเตรียมสารมาตรฐานกรดอะมิโนผสม จำนวน 7 ความเข้มข้น ซึ่งกรดอะมิโน Aspartic acid Glutamic acid และ Proline เตรียมที่ความเข้มข้น 5 10 20 40 60 80 และ 100 ไมโครกรัมต่อลิตร Phenylalanine เตรียมที่ความเข้มข้น 0.5 1 2 4 6 8 และ 10 ไมโครกรัมต่อลิตร และ Tryptophan เตรียมที่ความเข้มข้น 50 100 200 400 600 800 และ 1000 ไมโครกรัมต่อลิตร จากนั้นนำไปวิเคราะห์ด้วยเครื่อง HPLC ผลที่ได้นำมาสร้างกราฟระหว่างความเข้มข้นของกรดอะมิโน (µg/L) (แกน x) กับพื้นที่ใต้พีก (Peak area) (แกน y) พบว่ามีค่า r เท่ากับ 0.99931 0.99950 0.99934 0.99973 0.99927 ตามลำดับ ดังแสดงในตารางที่ 7 เมื่อพิจารณาค่า Correlation coefficient (r) ของกราฟความสัมพันธ์ มีค่า r > 0.995 ซึ่งทั้งหมดผ่านเกณฑ์การยอมรับ

Table 7 Linearity and correlation coefficient of 5 type amino acids analysis

Amino acids	Concentration range (µg/L)	Correlation coefficient (r)
Aspartic acid	5-100	0.99931
Glutamic acid	5-100	0.99950
Proline	5-100	0.99934
Phenylalanine	0.5-10	0.99973
Tryptophan	50-1000	0.99927

2.5.2 จากการศึกษาช่วงความเข้มข้นที่ใช้งาน (Range) โดยทำการเตรียมสารมาตรฐานกรดอะมิโนรวมจำนวน 7 ความเข้มข้น ซึ่งกรดอะมิโน Aspartic acid Glutamic acid และ Proline เตรียมความเข้มข้น 5 10 20 30 40 50 และ 60 ไมโครกรัมต่อลิตร Phenylalanine เตรียมความเข้มข้น 0.5 1 2 3 4 5 และ 6 ไมโครกรัมต่อลิตร และ Tryptophan เตรียมความเข้มข้น 50 100 200 300 400 500 และ 600 ไมโครกรัมต่อลิตร จากนั้นนำไปวิเคราะห์ด้วยเครื่อง HPLC ผลที่ได้นำมาสร้างกราฟระหว่างความเข้มข้นของกรดอะมิโน (mg/L) (แกน x) กับพื้นที่ใต้พีก (Peak area) (แกน y) พบว่า มีค่า r เท่ากับ 0.99960 0.99949 0.99926 0.99970 และ 0.99970 ตามลำดับ ดังแสดงในตารางที่ 8 เมื่อพิจารณาค่า Correlation coefficient (r) ของกราฟความสัมพันธ์ มีค่า r > 0.995 ซึ่งผ่านเกณฑ์การยอมรับ

Table 8 Range and correlation coefficient of 5 type amino acids analysis

Amino acids	Concentration range (µg/L)	Correlation coefficient (r)
Aspartic acid	5-60	0.99960
Glutamic acid	5-60	0.99949
Proline	5-60	0.99926
Phenylalanine	0.5-6	0.99970
Tryptophan	50-600	0.99970

2.6 ความถูกต้อง (Trueness) และความเที่ยง (Precision) ของวิธี

2.6.1 ความถูกต้อง (Trueness) และความเที่ยง (Precision) ที่ความเข้มข้นระดับต่ำ

จากการพิสูจน์ Trueness โดยการหาค่า %Recovery ในตัวอย่างสารสกัดจากสาหร่ายที่เติมสารละลายมาตรฐานแต่ละชนิดของกรดอะมิโนที่ความเข้มข้นระดับต่ำ จำนวน 10 ซ้ำ โดยกรดอะมิโน Aspartic acid Glutamic acid และ Proline ทดสอบที่ความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร Phenylalanine ทดสอบที่ความเข้มข้น 0.05 มิลลิกรัมต่อลิตร และ Tryptophan ทดสอบที่ความเข้มข้น 5 มิลลิกรัมต่อลิตร ผลการทดสอบพบว่า Aspartic acid Glutamic acid Proline Phenylalanine และ Tryptophan มีค่า %Recovery เท่ากับ 103.24 103.20 99.59 94.34 และ 95.39 ตามลำดับ ซึ่งค่าที่ได้ทั้งหมดอยู่ในช่วงเกณฑ์ยอมรับที่ 80-110 % มีค่า HorRat เท่ากับ 0.31 0.43 0.57 0.40 และ 0.61 ตามลำดับ ผ่านเกณฑ์ยอมรับค่า HorRat ≤ 1.3 AOAC (2016) ซึ่งมีผลการทดสอบเพื่อพิสูจน์ความถูกต้องและความเที่ยงดังแสดงในตารางผนวก 2

2.6.2 ความถูกต้อง (Trueness) และความเที่ยง (Precision) ที่ความเข้มข้นระดับกลาง

จากการพิสูจน์ Trueness โดยการหาค่า %Recovery ในตัวอย่างสารสกัดจากสาหร่ายที่เติมสารละลายมาตรฐานแต่ละชนิดของกรดอะมิโนที่ความเข้มข้นระดับกลาง จำนวน 10 ซ้ำ โดยกรดอะมิโน Aspartic acid, Glutamic acid และ Proline ทดสอบที่ความเข้มข้น 100 มิลลิกรัมต่อลิตร Phenylalanine ทดสอบที่ความเข้มข้น 20 มิลลิกรัมต่อลิตร และ Tryptophan ทดสอบที่ความเข้มข้น 200 มิลลิกรัมต่อลิตร ผลการทดสอบพบว่า มีค่า %Recovery เท่ากับ 96.40 102.82 101.79 98.68 และ 98.51 ตามลำดับ ค่าที่ได้อยู่ในช่วงเกณฑ์ยอมรับที่ 90-107% และมีค่า HorRat เท่ากับ 0.93 0.56 0.82 0.53 และ 0.51 ตามลำดับ ค่าที่ได้ผ่านเกณฑ์ยอมรับค่า HorRat ≤ 1.3 AOAC (2016) ซึ่งมีผลการทดสอบเพื่อพิสูจน์ความถูกต้องและความเที่ยงดังแสดงในตารางผนวก 3

2.6.3 ความถูกต้อง (Trueness) และความเที่ยง (Precision) ที่ความเข้มข้นระดับสูง

จากการพิสูจน์ Trueness โดยการหาค่า %Recovery ในตัวอย่างสารสกัดจากสาหร่ายที่เติมสารละลายมาตรฐานแต่ละชนิดของกรดอะมิโนที่ความเข้มข้นระดับสูง จำนวน 10 ซ้ำ โดยกรดอะมิโน Aspartic acid Glutamic acid และ Proline ทดสอบที่ความเข้มข้น 500 มิลลิกรัมต่อลิตร Phenylalanine ทดสอบที่ความเข้มข้น 100 มิลลิกรัมต่อลิตร และ Tryptophan ทดสอบที่ความเข้มข้น 1000 มิลลิกรัมต่อลิตร ผลการทดสอบพบว่ามีค่า %Recovery เท่ากับ 95.86 99.16 98.91 97.39 และ 103.55 ตามลำดับ ค่าที่ได้อยู่ในช่วงเกณฑ์ยอมรับที่ 95-105% และมีค่า HorRat เท่ากับ 0.30 0.60 0.57 0.65 และ 0.31 ตามลำดับ ค่าที่ได้ผ่านเกณฑ์ยอมรับค่า HorRat ≤1.3 AOAC (2016) ซึ่งมีผลการทดสอบเพื่อพิสูจน์ความถูกต้องและความเที่ยงดังแสดงในตารางผนวก 4

2.7 ความคงทนของวิธี (Ruggedness)

ทำการทดสอบความคงทนของวิธีวิเคราะห์กรดอะมิโนโดยทำการเปลี่ยนแปลงปัจจัยที่มีผลต่อการทดสอบดังนี้

2.7.1 การเปลี่ยนแปลงระยะเวลาในการ Incubate ตัวอย่าง

จากการเปลี่ยนแปลงสภาวะของการเตรียมตัวอย่างโดยมีการปรับระยะเวลาของการ Incubate ตัวอย่างจากวิธีการวิเคราะห์ในสภาวะปกติใช้เวลาในการ Incubate 10 นาที เปลี่ยนเป็น 11 นาที โดยทำการทดสอบจำนวน 7 ซ้ำ จากนั้นนำผลการทดสอบมาวิเคราะห์หาค่าทางสถิติ t-test พบว่าค่า t_{stat} น้อยกว่า $t_{critical}$ ทุกค่า ดังแสดงในตารางที่ 9 แสดงว่าทั้งสองสภาวะให้ผลทดสอบไม่แตกต่างกัน ดังนั้นการเปลี่ยนแปลงระยะเวลาในการ Incubate ตัวอย่างจึงไม่มีผลกับค่าวิเคราะห์กรดอะมิโน Aspartic acid Glutamic acid Proline Phenylalanine และ Tryptophan

Table 9 The comparison of incubation period for 5 amino acids analysis

Amino acids	t-test		comparison
	t_{stat}	$t_{critical}$	
Aspartic acid	1.412	2.179	ns
Glutamic acid	1.752	2.179	ns
Proline	0.313	2.228	ns
Phenylalanine	1.805	2.179	ns
Tryptophan	1.310	2.179	ns

ns = non-significant at 5% level; *S = Significant at 5% level

2.7.2 การเปลี่ยนแปลงชนิดของตัวทำละลาย

จากการเปลี่ยนแปลงชนิดของตัวทำละลายในการเตรียมตัวอย่างกรดอะมิโน โดยเปลี่ยนแปลงตัวทำละลายตัวอย่างที่ใช้ในสภาวะปกติคือละลายด้วย 0.1 N HCl เป็นการละลายด้วย H_2O โดยทำการทดสอบจำนวน 7 ซ้ำ จากนั้นนำผลการทดสอบที่ได้มาวิเคราะห์หาค่าทางสถิติ t-test พบว่าค่า t_{stat} น้อยกว่า $t_{critical}$ ทุกค่า ดังแสดงในตารางที่ 10 แสดงว่าทั้งสองสภาวะให้ผลทดสอบไม่แตกต่างกัน ดังนั้นการวิเคราะห์กรดอะมิโน Aspartic acid Glutamic acid Proline Phenylalanine และ Tryptophan สามารถใช้สารละลาย 0.1 N HCl และ H_2O เป็นตัวทำละลายในการเตรียมตัวอย่างกรดอะมิโนได้

Table 10 The comparison of solvent type for 5 amino acids analysis

Amino acids	t-test		comparison
	T_{stat}	$T_{critical}$	
Aspartic acid	0.636	2.201	ns
Glutamic acid	1.229	2.201	ns
Proline	0.343	2.201	ns
Phenylalanine	0.385	2.262	ns
Tryptophan	0.988	2.201	ns

ns = non-significant at 5% level; *S = Significant at 5% level

2.7.3 การเปลี่ยนแปลงชนิดตัวกรองสารละลาย

จากการเปลี่ยนแปลงชนิดของตัวกรองสารละลายที่ใช้ในการเตรียมสารละลายตัวอย่างกรดอะมิโน ก่อนฉีดเข้าเครื่อง HPLC โดยเปลี่ยนแปลงตัวกรองสารละลายที่ใช้ในสภาวะปกติคือ กรองด้วยตัวกรองชนิด Polyvinylidene fluoride (PVDF) เป็นชนิด Polyethersulfone (PES) โดยทำการทดสอบจำนวน 7 ซ้ำ จากนั้นนำผลการทดสอบที่ได้นำมาวิเคราะห์ค่าทางสถิติ t-test พบว่าค่า t_{stat} น้อยกว่า $t_{critical}$ ทุกค่า ดังแสดงในตารางที่ 11 แสดงว่าทั้งสองสภาวะให้ผลทดสอบไม่แตกต่างกัน ดังนั้นการวิเคราะห์กรดอะมิโน Aspartic acid Glutamic acid Proline Phenylalanine และ Tryptophan สามารถใช้ตัวกรองที่เป็นชนิด PVDF และ PES ในการกรองสารละลายเพื่อเตรียมตัวอย่างกรดอะมิโนได้

Table 11 The comparison of filter paper type for 5 amino acids analysis

Amino acids	t-test		comparison
	t_{stat}	$t_{critical}$	
Aspartic acid	0.436	2.262	ns
Glutamic acid	0.079	2.201	ns
Proline	0.813	2.179	ns
Phenylalanine	1.432	2.179	ns
Tryptophan	0.302	2.201	ns

ns = non-significant at 5% level; *S = Significant at 5% level

3. ผลการหาปริมาณกรดอะมิโนในผลิตภัณฑ์กรดอะมิโน

ผลการศึกษาปริมาณกรดอะมิโน 5 ชนิดตัวอย่างผลิตภัณฑ์กรดอะมิโนที่ได้สุ่มเก็บจากร้านค้าเคมีเกษตร แบ่งเป็น 2 กลุ่มดังนี้

1) ตัวอย่างผลิตภัณฑ์สารสกัดจากสาหร่ายที่ไม่ระบุความเข้มข้นที่มีลักษณะใส จำนวน 14 ตัวอย่าง พบว่ามีปริมาณกรดอะมิโน Aspartic acid Glutamic acid Proline Phenylalanine และ Tryptophan อยู่ในช่วง 0.39-135.50 1.07-326.33 1.11-91.25 0.09-4.34 และ 46.67-429.58 มิลลิกรัมต่อลิตร ตามลำดับ

2) ตัวอย่างผลิตภัณฑ์สารสกัดจากสาหร่ายที่มีลักษณะเป็นผง จำนวน 4 ตัวอย่าง พบว่ามีปริมาณกรดอะมิโน Aspartic acid Glutamic acid Proline และ Phenylalanine อยู่ในช่วง 4.25-24.70 0.98-11.13 0.18-6.20 และ 7.61-48.96 มิลลิกรัมต่อลิตร ตามลำดับ ส่วนกรดอะมิโน Tryptophan มีปริมาณต่ำกว่าค่า LOQ

สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ/คำแนะนำ

การพัฒนาและตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์กรดอะมิโน Aspartic acid Glutamic acid Proline Phenylalanine และ Tryptophan สรุปได้ดังนี้

1. การวิเคราะห์กรดอะมิโนผสมทั้ง 5 ชนิดสามารถตรวจวัดโดยใช้เทคนิคลิควิดโครมาโทกราฟี (High Performance Liquid Chromatography, HPLC) ที่ติดตั้งตัวตรวจวัดชนิด Fluorescence โดยใช้ความยาวคลื่น (Wavelength) λex เท่ากับ 250 นาโนเมตร, λem เท่ากับ 395 นาโนเมตร ใช้คอลัมน์ชนิด C18 ความยาว 150 มิลลิเมตร ที่มีเส้นผ่านศูนย์กลาง 4.6 มิลลิเมตร อนุภาค 5 ไมครอน เฟสเคลื่อนที่เป็นสารละลายบัฟเฟอร์ผสมระหว่าง Sodium acetate trihydrate+Triethylamine และ Acetonitrile โดยชะสารออกจากคอลัมน์แบบ Gradient อุณหภูมิของคอลัมน์ 35 องศาเซลเซียส ใช้เวลาในการวิเคราะห์ 35 นาที

2. จากการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมการแยกพีกของกรดอะมิโนให้ออกจากกัน โดยมีการปรับเฟสเคลื่อนที่แบบ Gradient ด้วย Acetonitrile และสารละลายบัฟเฟอร์ผสมระหว่าง Sodium acetate trihydrate ความเข้มข้น 100 มิลลิโมลาร์ และ Triethylamine ความเข้มข้น 12 มิลลิโมลาร์ ซึ่งทำให้พีกแยกจากกันได้ดี มีค่าการแยกมากกว่า 2 ระยะเวลาของการเตรียมอนุพันธ์ที่เหมาะสมใช้เวลา 10 นาที ภายหลังจากการเตรียมอนุพันธ์กรดอะมิโนมีความคงสภาพได้นานถึง 4 วัน อย่างไรก็ตามการวิเคราะห์กรดอะมิโนก็ยังมีข้อจำกัดในเรื่องของระยะเวลาในการทำอนุพันธ์ซึ่งจะไม่สามารถเก็บสารที่เปิดใช้แล้วไว้ได้นานและสารที่ใช้มีราคาสูงจึงต้องมีการวางแผนการทดสอบอย่างดี

3. จากการตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์กรดอะมิโนพบว่า วิธีวิเคราะห์กรดอะมิโนมีความจำเพาะเจาะจงสำหรับตัวอย่างสารสกัดจากสาหร่ายที่มีลักษณะใสและแบบผงเท่านั้น จากการทดสอบผลของเมทริกซ์ในตัวอย่างสารสกัดจากสาหร่ายที่มีลักษณะสารละลายใสพบว่า มี %RPD อยู่ในช่วง 1.35-9.64 ซึ่งอยู่ในเกณฑ์กำหนด (%RPD < 10) ตามมาตรฐาน NATA (2018) สำหรับการวิเคราะห์กรดอะมิโนในตัวอย่างสารสกัดจากสาหร่ายที่มีลักษณะขุ่นและข้นหนืด มี %RPD เกินเกณฑ์กำหนด ยกเว้นกรดอะมิโน Tryptophan ทั้งนี้อาจจะต้องวิเคราะห์โดยวิธีทำ Standard addition และจากการหาค่า LOD มีค่าอยู่ในช่วง 0.05-4.76 ไมโครกรัมต่อลิตร มีค่า LOQ อยู่ในช่วง 0.5-50 ไมโครกรัมต่อลิตร ซึ่งการพิสูจน์ความถูกต้อง (Trueness) และความเที่ยง (Precision) ที่ระดับ LOQ มีค่าที่อยู่ในช่วงแกณฑ์ยอมรับทั้งสิ้น การศึกษาค่าความเป็นเส้นตรง (Linearity) และช่วงของการวัด (Working range) กรดอะมิโนโดยพิจารณาค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ (Correlation coefficient, r) พบว่าทุกค่าผ่านเกณฑ์ยอมรับ มีค่า Correlation coefficient (r) ≥ 0.995 การพิสูจน์ความถูกต้องและความเที่ยงที่ระดับความเข้มข้น ต่ำ กลาง และสูง โดยประเมินจาก %Recovery ของกรดอะมิโนทั้ง 5 ชนิด พบว่า ที่ความเข้มข้นระดับต่ำ กลาง และสูง มี %Recovery อยู่ในช่วง 94.34-103.55 และการพิสูจน์ความเที่ยง (Precision) ได้ค่า HorRat อยู่ในช่วง 0.30-0.93 ซึ่งเป็นไปตามเกณฑ์ยอมรับของ AOAC (2016) สำหรับการตรวจสอบ Ruggedness โดยมีการเปลี่ยนแปลงสภาวะที่มีผลต่อการทดสอบ และคำนวณเปรียบเทียบความเข้มข้นของกรดอะมิโนด้วยวิธีทางสถิติ t-test พบว่าทุกค่า มีค่า t_{cal} น้อยกว่า $t_{critical}$ ทั้งสิ้น

4. วิธีวิเคราะห์กรดอะมิโนมีขอบข่ายการวิเคราะห์ Aspartic acid Glutamic acid และ Proline อยู่ในช่วง 0.005-500 มิลลิกรัมต่อลิตร Phenylalanine อยู่ในช่วง 0.0005-100 มิลลิกรัมต่อลิตร และ Tryptophan อยู่ในช่วง 0.05-1000 มิลลิกรัมต่อลิตร

จากการพัฒนาและตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์กรดอะมิโนพบว่าคุณสมบัติเฉพาะของวิธีเป็นไปตามเกณฑ์การยอมรับ ดังนั้นจึงสามารถนำวิธีวิเคราะห์นี้ไปใช้ในการวิเคราะห์กรดอะมิโนดังกล่าวได้อย่างถูกต้อง แม่นยำและเป็นที่น่าเชื่อถือได้

การนำผลงานวิจัยไปใช้ประโยชน์

1. สามารถนำมาวิเคราะห์หาปริมาณกรดอะมิโน Aspartic acid Glutamic acid Proline Phenylalanine และ Tryptophan ในผลิตภัณฑ์สารสกัดอินทรีย์และสารสกัดจากสาหร่ายที่มีจำหน่ายตามท้องตลาด เพื่อเป็นข้อมูลเบื้องต้นในการให้ความรู้และแนะนำเกษตรกรในการใช้ประโยชน์จากวัตถุเคมีการเกษตรได้
2. เป็นแนวทางในศึกษาวิธีการวิเคราะห์กรดอะมิโนชนิดอื่นๆ ในผลิตภัณฑ์สารสกัดอินทรีย์และสารสกัดจากสาหร่ายต่อไป

เอกสารอ้างอิง

AOAC. 2016. Appendix F. Guidelines for standard method performance requirements.

Al-said, M.A. and A.M. Kamal. 2008. Effect of foliar spray with folic acid and some amino acids on flowering, yield and quality of sweet pepper. ***J. Agric. Sci. Mansoura Univ.*** 33(10): 7403-7412.

Awad, El-M.M., A.M. Abd El-Hameed and Z.S. Shall. 2007. Effect of glycine and nitrogen fertilizer rates on growth, yield and chemical composition of potato. ***J. Agric. Sci. Mansoura Univ.*** 32:8541-8551.

EURACHEM. 2014. A Laboratory Guide to Method Validation and Related Topics, The Fitness for Purpose of Analytical Methods.

Fang, Z., J. Ou, Y. Huang, Q. Li ,G. Xu, Zhungzhen and L. S. Yang. 2015. Determination of 21 free amino acids in fruit juices by HPLC using a modification of the 6-aminoquinolyl-*N*-hydroxysuccinimidyl carbamate (AQC) method. ***Food Anal Methods*** 8: 428-437.

Katarzyna, S., S. Ilona, R. Jolanta, K.Waldemar, B. Grazyna. 2017.Method validation of determination of amino acids in feed by UHPLC. ***Accred Qual Assur*** 22: 247-252.

NATA. 2018. General Accreditation Guidance-Validation and Verification of Quantitative and Qualitative Test Methods.

Rivier, L. and A. Crozier. 1987. Principles and practice of plant hormone analysis. Vol. II. London: academic press Inc. (London) Ltd.

Waters . 1996. Analyzing feed hydroolysate samples using the AccQ Tag method. Waters corporation U.S.A.

Appendix Table 1 Accuracy and precision at the LOQ level of 5 amino acids

Rep.	Aspartic acid		Glutamic acid		Proline		Phenylalanine		Tryptophan	
	Conc. (µg/L)	%Re	Conc. (µg/L	%Re	Conc. (µg/L)	%Re	Conc. (µg/L	%Re	Conc. (µg/L)	%Re
1	5.59	107.62	5.50	99.62	5.48	98.15	0.57	102.58	52.24	90.85
2	5.61	108.10	5.74	105.22	5.46	97.66	0.50	85.88	51.82	89.82
3	5.63	108.59	5.70	104.28	5.57	100.36	0.49	83.49	48.52	81.77
4	5.59	107.62	4.81	83.52	5.38	95.70	0.50	85.88	48.88	82.65
5	5.08	95.20	5.57	101.25	4.78	80.98	0.54	95.42	47.82	80.06
6	5.39	102.75	5.48	99.15	5.22	91.77	0.56	100.19	53.24	93.29
7	5.06	94.71	5.87	108.25	5.49	98.40	0.58	104.96	56.70	89.46
8	5.47	104.69	5.67	103.58	5.78	105.52	0.59	107.35	49.87	85.07
9	5.29	100.31	5.58	101.48	4.99	86.13	0.52	90.65	49.47	84.09
10	5.55	106.89	5.63	102.65	5.89	108.22	0.53	93.03	52.77	92.14
mean	5.43	103.65	5.56	100.90	5.40	96.29	0.54	94.94	51.13	86.92
SD	0.216		0.286		0.336		0.036		2.729	4.730
%RSD	3.928		5.154		6.219		6.662		5.338	5.442
HorRat	0.17		0.22		0.27		0.20		0.32	

Appendix Table 2 Accuracy and precision at the low concentration level of 5 amino acids

Rep.	Aspartic acid		Glutamic acid		Proline		Phenylalanine		Tryptophan	
	Conc. (mg/L)	%Re	Conc. (mg/L)	%Re	Conc. (mg/L)	%Re	Conc. (mg/L)	%Re	Conc. (mg/L)	%Re
1	0.525	102.47	0.494	98.08	0.461	91.52	0.046	84.827	5.066	98.28
2	0.535	104.30	0.518	102.78	0.490	97.40	0.049	90.793	5.041	97.81
3	0.535	104.32	0.527	104.57	0.483	95.89	0.050	93.403	5.128	99.50
4	0.515	100.50	0.484	95.96	0.441	87.65	0.048	89.488	4.726	91.69
5	0.515	100.46	0.529	104.97	0.507	100.70	0.053	98.623	4.998	96.98
6	0.501	97.71	0.547	108.58	0.513	101.95	0.052	96.572	4.897	95.01
7	0.562	109.57	0.480	95.14	0.514	102.01	0.051	95.640	4.707	91.32
8	0.512	99.83	0.531	105.42	0.538	106.89	0.051	94.521	4.408	85.53
9	0.546	106.55	0.537	106.55	0.549	109.04	0.058	108.131	5.267	102.19
10	0.547	106.74	0.554	109.93	0.518	102.88	0.049	91.352	4.927	95.59
mean	0.529	103.24	0.520	103.20	0.501	99.59	0.051	94.34	4.916	95.39
SD	0.019		0.026		0.033		0.003		0.247	
%RSD	3.590		4.994		6.629		6.626		5.033	
HorRat	0.31		0.43		0.57		0.40		0.61	

Appendix Table 3 Accuracy and precision at the medium concentration level of 5 amino acids

Rep.	Aspartic acid		Glutamic acid		Proline		Phenylalanine		Tryptophan	
	Conc. (mg/L)	%Re	Conc. (mg/L)	%Re	Conc. (mg/L)	%Re	Conc. (mg/L)	%Re	Conc. (mg/L)	%Re
1	92.70	90.45	99.92	99.13	96.24	95.57	20.68	96.39	193.14	96.00
2	102.16	99.68	103.74	102.92	105.50	104.77	22.08	102.91	198.66	98.74
3	101.98	99.50	108.08	107.23	103.10	102.39	22.32	104.03	201.23	100.02
4	94.16	91.87	100.02	99.23	98.98	98.29	21.84	101.79	191.78	95.32
5	102.28	99.79	106.38	105.54	106.26	105.52	20.76	96.76	197.64	98.23
6	96.90	94.54	104.02	103.20	108.08	107.33	21.08	98.25	196.32	97.58
7	104.58	102.04	104.04	103.22	103.00	102.29	21.44	99.93	204.62	101.71
8	95.24	92.92	106.54	105.70	102.30	101.59	20.56	95.83	203.34	101.07
9	93.10	90.84	99.16	98.38	95.16	94.50	19.92	92.84	191.98	95.42
10	104.90	102.35	104.44	103.62	106.34	105.60	21.04	98.06	203.18	100.99
mean	98.80	96.40	103.63	102.82	102.49	101.79	21.17	98.68	198.18	98.51
SD	4.849		3.048		4.411		0.748		4.844	
%RSD	4.908		2.941		4.304		3.535		2.444	
HorRat	0.93		0.56		0.82		0.53		0.51	

Appendix Table 4 Accuracy and precision at the high concentration level of 5 amino acids

Rep.	Aspartic acid		Glutamic acid		Proline		Phenylalanine		Tryptophan	
	Conc. (mg/L)	%Re	Conc. (mg/L)	%Re	Conc. (mg/L)	%Re	Conc. (mg/L)	%Re	Conc. (mg/L)	%Re
1	494.00	96.40	510.10	101.21	506.30	100.56	105.60	98.43	1029.12	102.30
2	485.10	94.66	506.70	100.54	493.70	98.06	102.20	95.26	1047.14	104.09
3	495.30	96.65	502.70	99.75	507.10	100.72	108.60	101.23	1036.94	103.08
4	484.20	94.49	510.90	101.37	489.40	97.20	99.60	92.84	1013.34	100.73
5	499.00	97.37	507.40	100.68	514.40	102.17	102.40	95.45	1039.36	103.32
6	484.70	94.58	488.60	96.95	491.80	97.68	104.80	97.69	1050.86	104.46
7	492.50	96.11	487.40	96.71	506.10	100.52	108.80	101.42	1053.86	104.76
8	489.50	95.52	512.50	101.69	488.60	97.04	103.20	96.20	1048.00	104.18
9	494.70	96.53	495.20	98.26	475.90	94.52	100.20	93.40	1043.80	104.76
10	493.60	96.32	475.90	94.43	506.60	100.62	109.40	101.98	1044.00	103.78
mean	491.26	95.86	499.74	99.16	497.99	98.91	104.48	97.39	1040.64	103.55
SD	5.126		12.364		11.869		3.567		11.973	
%RSD	1.043		2.474		2.383		3.414		1.151	
HorRat	0.30		0.60		0.57		0.65		0.31	