

วิธีทดสอบหาปริมาณคอลลาเจนในผลิตภัณฑ์เครื่องดื่มที่มีส่วนผสมของคอลลาเจนไฮโดรไลเซส  
ด้วยเทคนิคโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูงร่วมกับตัวตรวจวัดชนิดฟลูออเรสเซนส์

METHODS FOR THE ANALYSIS OF COLLAGEN IN FORTIFIED BEVERAGES WITH  
COLLAGEN HYDROLYSATED USING HIGH-PERFORMANCE LIQUID  
CHROMATOGRAPHY WITH FLUORESCENCE DETECTOR

จรรยา แสงเขียว\*<sup>1</sup>

JANYA SANGKHIAW \*<sup>1</sup>

<sup>1</sup> สถาบันค้นคว้าและพัฒนาผลิตภัณฑ์อาหาร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

\*j.agroin@gmail.com

บทคัดย่อ

งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาวิธีการทดสอบหาปริมาณคอลลาเจนในผลิตภัณฑ์เครื่องดื่มที่มีส่วนผสมของคอลลาเจนไฮโดรไลเซส โดยใช้สารก่อนอนุพันธ์ชนิด FMOC-Cl และตรวจวิเคราะห์ด้วยเทคนิคโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูงร่วมกับตัวตรวจวัดชนิดฟลูออเรสเซนส์ และคูณด้วยปัจจัย (conversion factor) เท่ากับ 7.25 เพื่อให้ได้ค่าปริมาณคอลลาเจนในตัวอย่าง พบว่าผลิตภัณฑ์เครื่องดื่มที่มีวางขายในท้องตลาดมีปริมาณคอลลาเจนอยู่ในช่วงตั้งแต่ 0.1-25.0% ทำการตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีทดสอบปริมาณคอลลาเจนให้ครอบคลุมกับกลุ่มตัวอย่างดังกล่าว พบว่าสารมาตรฐานมีช่วงการใช้งานที่เป็นเส้นตรงความเข้มข้นตั้งแต่ 0.5-50 mg/L มีค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ เท่ากับ 0.996 ขีดจำกัดของการตรวจพบและขีดจำกัดของการวัดเชิงปริมาณได้ เท่ากับ 0.004% และ 0.013% ตามลำดับ และความเที่ยงของการทดสอบซ้ำในวันเดียวกันและต่างวัน โดยพิจารณาจากค่า %RPD มีค่าเท่ากับ 8.16% และ 7.48% ตามลำดับ ส่วนความแม่นยำของการทดสอบมีค่าการคืนกลับอยู่ในช่วง 80-110% ที่ระดับของสารที่สนใจไม่เกิน 10 mg/L และมีค่า Horwitz ratio น้อยกว่า 2 ซึ่งเป็นไปตามมาตรฐานห้องปฏิบัติการ แสดงให้เห็นว่าวิธีการทดสอบปริมาณคอลลาเจนในผลิตภัณฑ์เครื่องดื่มที่มีส่วนผสมของคอลลาเจนไฮโดรไลเซสดังกล่าว มีความถูกต้อง เหมาะสมที่จะนำมาใช้ในการปฏิบัติงานประจำต่อไป

**คำสำคัญ:** คอลลาเจนไฮโดรไลเซส, โครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง, การตรวจสอบความใช้ได้ของวิธี

วันที่รับบทความ 5 มีนาคม 2564

วันที่แก้ไขบทความ 15 มีนาคม 2564

วันที่รับบทความ 22 มีนาคม 2564

## ABSTRACT

This research aimed to study methods for determination of the collagen content of beverage products containing hydrolyzed collagen. The use of FMOC-Cl derivatives and high performance liquid chromatography was analyzed with a fluorescence detector and multiplied by a conversion factor of 7.25 to obtain the amount of collagen in the sample. It was found that beverage products commercially available had collagen content in the range from 0.1-25.0%. A method was validated for the collagen content had the calibration curve for 4-Hydroxy-L-proline was found to be linear in the concentrations ranging from 0.5-50 mg/L, with a correlation coefficient ( $R^2$ ) of 0.996. The value of LOD and LOQ were 0.004% and 0.013%, respectively. The repeatability (use as a precision) of the method was observed and the standard deviation of concentration (%RSD) for Intra-day and Inter-day was 8.16% and 7.48%, respectively. The accuracy determined from the percentage of return ranged from 80-110% at the level of the substance of interest not more than 10 mg/L and the Horwitz ratio of less than 2. It was shown that the method for determining of the collagen content in beverage products containing collagen hydrolyzes was accurate and they are appropriate to be used in routine operations and comply with laboratory standards.

**Keywords:** Collagen hydrolysates, High-Performance Liquid Chromatography, Method validation

## 1. บทนำ

จากกระแสผู้บริโภคที่รักสุขภาพและความงามที่กำลังได้รับความนิยมเพิ่มขึ้นเป็นอย่างมาก ทำให้มีผลิตภัณฑ์ที่เกี่ยวข้องกับความสวยความงามของผิวพรรณวางจำหน่ายหลากหลายรูปแบบ โดยเฉพาะอย่างยิ่งผลิตภัณฑ์อาหารเสริมที่มีส่วนผสมของคอลลาเจน ซึ่งมีผลช่วยบรรเทาอาการปวดในผู้ป่วยโรคข้อเข่าเสื่อม [1] หลายรูปแบบทั้งชนิดผงขี้ผึ้ง และเครื่องดื่มผสมคอลลาเจน เป็นต้น ส่งผลให้มีผลิตภัณฑ์ออกมาแข่งขันกันเพิ่มขึ้น และยังมีแนวโน้มเติบโตขึ้นอย่างรวดเร็ว โดยคอลลาเจนที่นำมาเป็นส่วนผสมในเครื่องดื่มจะอยู่ในรูปที่ผ่านกระบวนการสกัดและทำให้บริสุทธิ์แล้ว (collagen hydrolysate) มาใช้เป็นส่วนผสมในผลิตภัณฑ์ยา และอาหารเสริมต่าง ๆ เพิ่มมากขึ้นนี้เอง องค์กรที่มีส่วนเกี่ยวข้องกับการคุ้มครองผู้บริโภค จึงให้มีการตรวจสอบปริมาณคอลลาเจนที่เหมาะสมต่อผู้บริโภค รวมถึงข้อมูลวัตถุดิบที่นำมาสกัดเป็นคอลลาเจน เนื่องจากคอลลาเจนสกัดบางชนิดอาจทำให้เกิดอาการของโรคภูมิแพ้ได้ ฉะนั้นการตรวจวัดปริมาณคอลลาเจนที่เป็นส่วนผสมในอาหารและเครื่องดื่มชนิดต่าง ๆ มีความจำเป็นอย่างยิ่ง เนื่องจากการเติมสารดังกล่าวมีข้อจำกัดตามประกาศของสำนักงานคณะกรรมการอาหารและยา ดังนั้นเพื่อเป็นการเพิ่มความมั่นใจให้กับอุตสาหกรรมผู้ผลิต และที่สำคัญผู้บริโภคได้รับข้อมูลที่ถูกต้อง น่าเชื่อถือ และเป็นประโยชน์ต่อการพิจารณาเลือกซื้อ

ปัจจุบันวิธีที่ได้รับการยอมรับตามมาตรฐานสากลที่ใช้ในการทดสอบปริมาณคอลลาเจน คือการทดสอบด้วยเครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ หรือเทคนิคที่เรียกว่า colorimetric method [2] ซึ่งเป็นการทดสอบปริมาณไฮดรอกซีโพรลีนในเนื้อหยาและผลิตภัณฑ์ ซึ่งวิธีดังกล่าวอาจยังไม่ครอบคลุมตัวอย่างในกลุ่มเครื่องดื่มและผลิตภัณฑ์

ที่มีส่วนผสมของคอลลาเจนไฮโดรไลเซส นอกจากนี้พบการทดสอบหาปริมาณคอลลาเจนโดยใช้เทคนิคการย่อยโปรตีนด้วยเครื่องไมโครเวฟ (microwave digestion) และตรวจสอบด้วยกรดอะมิโน hydroxyproline ด้วยเทคนิคเทคนิคโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง ชนิดเฟสคงที่แบบ Anion Exchange [3] ซึ่งเป็นวิธีที่ง่าย แต่มีข้อจำกัดคือใช้เครื่องมือที่มีราคาแพงได้แก่เครื่องย่อยไมโครเวฟ และเฟสคงที่แบบ anion exchange แต่การใช้เทคนิคโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูงร่วมกับตัวตรวจวัดชนิดฟลูออเรสเซนซ์ (HPLC-FLD) นั้นเป็นเครื่องมือที่มีใช้งานในห้องปฏิบัติการทดสอบทั่วไป โดยพบว่าใช้ร่วมกับสารก่ออนุพันธ์ 9-Fluorenylmethyl chloroformate (FMOC-Cl) เพื่อติดฉลากกรดอะมิโน ทำให้การทดสอบด้วยวิธีการนี้มีความจำเพาะต่อ hydroxyproline ทำให้ผลการทดสอบแม่นยำมากขึ้น [4] เทคนิคดังกล่าวจึงถูกนำมาใช้ในการศึกษาวิธีทดสอบปริมาณคอลลาเจนในเครื่องต้มและผลิตภัณฑ์ที่มีส่วนผสมของคอลลาเจนไฮโดรไลเซส นอกจากนี้ทำการตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีที่พัฒนาขึ้นเพื่อให้ได้วิธีการทดสอบปริมาณคอลลาเจนที่ถูกต้อง แม่นยำ สอดคล้องกับมาตรฐานห้องปฏิบัติการ ISO/IEC 17025 : 2017 และเพื่อเพิ่มศักยภาพของห้องปฏิบัติการศูนย์บริการประกันคุณภาพอาหาร ให้เป็นที่ยอมรับต่อไป

## 2. เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

คอลลาเจน (collagen) เป็นโปรตีนชนิดหนึ่งที่เป็นองค์ประกอบของกระดูกและเนื้อเยื่อเกี่ยวพัน (connective tissue) พบในร่างกาย 20-30 % [5] มีโครงสร้างทั่วไปโดยภายในสายโพลีเปปไทด์แต่ละสายเกิดจากการเชื่อมต่อกันด้วยพันธะไฮโดรเจนของกรดอะมิโน (G-X-Y)<sub>n</sub> โดย G คือ ไกลซีน (Glycine : Gly) เป็นองค์ประกอบ 33%, X คือโพรลีน (Proline : Pro) ประมาณ 10% และ Y คือไฮดรอกซีโพรลีน (Hydroxyproline : Hyp) มีประมาณ 14% [6] คอลลาเจนสามารถจำแนกได้หลายชนิดชนิดที่พบมากคือ คอลลาเจนชนิดที่ 1 (Type I) พบในส่วนต่าง ๆ ของร่างกาย เช่น ผิวหนัง เส้นเอ็น กระดูก กระดูกอ่อน [7] และคอลลาเจนชนิดที่ 3 (Type III) พบได้กระดูก ผิวหนังชั้นนอกสุด เอ็นกล้ามเนื้อและผนังหลอดเลือด [8] ซึ่งคอลลาเจนเป็นโปรตีนชนิดเดียวที่อุดมไปด้วยไฮดรอกซีโพรลีนมีมากถึง 14% ของคอลลาเจนในสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม และไฮดรอกซีโพรลีนเองจะไม่พบในโปรตีนชนิดอื่น ๆ ดังนั้น ไฮดรอกซีโพรลีนจึงมักเป็นตัวบ่งชี้ปริมาณคอลลาเจนในตัวอย่างอาหาร

ปัจจุบันคอลลาเจนถูกนำมาใช้ประโยชน์อย่างแพร่หลาย เช่น ผสมในเครื่องดื่ม หรือผลิตภัณฑ์รูปแบบอื่น ๆ เพื่อเป็นอาหารเสริมผสมคอลลาเจน เนื่องจากต้องการสรรพคุณในการเสริมความงามของผิวพรรณ โดยคอลลาเจนถูกแปรรูปให้อยู่ในรูปคอลลาเจนไฮโดรไลเซส ที่สามารถละลายน้ำได้ง่าย และดูดซึมเข้าร่างกายได้รวดเร็ว เพื่อตอบสนองความต้องการของผู้บริโภค จากการนำคอลลาเจนไฮโดรไลเซสมาเป็นส่วนผสมในอาหารและเครื่องดื่มมากขึ้น ทำให้มีการตรวจสอบปริมาณคอลลาเจนที่เหมาะสมต่อผู้บริโภค รวมถึงข้อมูลวัตถุดิบที่นำมาสกัดเป็นคอลลาเจน ฉะนั้นการตรวจวัดปริมาณคอลลาเจนที่เป็นส่วนผสมในอาหารและเครื่องดื่มชนิดต่าง ๆ มีความจำเป็นอย่างยิ่ง เนื่องจากการเติมสารดังกล่าวมีข้อจำกัดตามประกาศของสำนักงานคณะกรรมการอาหารและยา ดังนั้นเพื่อเป็นการเพิ่มความมั่นใจให้กับอุตสาหกรรมผู้ผลิต และที่สำคัญผู้บริโภคได้รับข้อมูลที่ถูกต้อง น่าเชื่อถือ และเป็นประโยชน์ต่อการพิจารณาเลือกซื้อ

วิธีการตรวจวัดปริมาณคอลลาเจนสามารถทำได้หลายวิธี [9] ใช้เทคนิคสเปกโทรสโกปีอินฟราเรดย่านใกล้ (Near Infrared Spectroscopy : NIRS) ในการติดตามปริมาณไฮดรอกซีโพรลีนในไส้กรอกหมู และไส้กรอกวัว ซึ่งไฮดรอกซีโพรลีนถูกใช้เป็นเกณฑ์ในการประเมินปริมาณคอลลาเจน แต่การใช้เทคนิค NIRS นั้น ต้องใช้เครื่องมือ

ที่มีราคาแพง ผู้ใช้งานต้องมีความชำนาญในการตรวจสอบ [10] ใช้เทคนิคสเปกโทรสโกปีที่อาศัยการวัดปริมาณของไฮดรอกซีโพรลีน เนื่องจากคอลลาเจนมีองค์ประกอบของไฮดรอกซีโพรลีนในปริมาณสูง แตกต่างจากโปรตีนส่วนอื่น โดยการทำปฏิกิริยาออกซิเดชัน (oxidation) เปลี่ยนรูปไฮดรอกซีโพรลีนเป็น Pyrrole-2-carboxylic acid [11] และใช้ p-dimethylaminobenzaldehyde (DMBA) เป็นตัวติดฉลากเปปไทด์ที่ปลายสายกรดอะมิโนที่สนใจ ซึ่งจะสามารถตรวจวัดปริมาณของสีที่เกิดขึ้นได้ด้วยเครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ที่มีความยาวคลื่น 550 นาโนเมตร ซึ่งจะคล้ายกับการวิเคราะห์หาปริมาณไฮดรอกซีโพรลีนที่เป็นที่ยอมรับตามมาตรฐานสากลปัจจุบัน ซึ่งเป็นการวิเคราะห์ปริมาณคอลลาเจนเฉพาะในเนื้อสัตว์และผลิตภัณฑ์เนื้อสัตว์ ซึ่งจะต้องย่อยตัวอย่างให้อยู่ในรูปกรดอะมิโน คือสารไฮดรอกซีโพรลีนด้วยกรดไฮโดรคลอริกเข้มข้นหรือซัลฟูริกเข้มข้น ที่อุณหภูมิ 105 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 16 ชั่วโมง นำไปทำปฏิกิริยากับสารคลอรามินที (Chloramine-T) จะได้สารผลิตภัณฑ์ที่มีสีม่วงแดง จากนั้นวัดปริมาณสีที่เกิดขึ้นด้วยเครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ ที่ความยาวคลื่น 560 นาโนเมตร เพื่อวิเคราะห์หาปริมาณไฮดรอกซีโพรลีน ซึ่งเรียกเทคนิคนี้ว่า colorimetric method แต่วิธีการนี้ยังมีข้อจำกัดด้านเวลาในการเตรียมตัวอย่างต้องใช้เวลานานและการควบคุมสภาวะในการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันให้คงที่ได้ยาก โดยวิธีการตรวจวัดปริมาณคอลลาเจนมีการศึกษาอย่างต่อเนื่อง พบว่าการประยุกต์ใช้สารก่ออนุพันธ์ (derivative agent) เพื่อติดฉลากเปปไทด์ที่ปลายสายกรดอะมิโน หลังจากโปรตีนถูกย่อยด้วยกรดเข้มข้นนั้น มีผลต่อการแยกกรดอะมิโนที่สนใจโดยสารก่ออนุพันธ์แต่ละชนิดจะมีความจำเพาะแตกต่างกันออกไป ทำให้สามารถแยกกรดอะมิโนที่ต้องการตรวจสอบออกจากกรดอะมิโนตัวอื่นได้ [12] ได้วิเคราะห์ปริมาณคอลลาเจนโดยใช้เทคนิคโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูงร่วมกับตัวตรวจวัดชนิดอัลตราไวโอเล็ต (UV detector) ด้วยการย่อยตัวอย่างด้วยกรดและทำปฏิกิริยาอนุพันธ์ด้วย 4-Chloro-7-nitrobenzofurazan (NBD-Cl) ให้ผลการวิเคราะห์ที่ถูกต้องแม่นยำ อย่างไรก็ตามจากการศึกษา [13] พบว่าการใช้สารก่ออนุพันธ์ 9-Fluorenylmethyl chloroformate (FMOC-Cl) เพื่อติดฉลากกรดอะมิโน เนื่องจากมีความจำเพาะต่อไฮดรอกซีโพรลีน ซึ่งเป็น secondary amino acid ทำให้ไม่ถูกรบกวนจากกรดอะมิโนชนิดอื่น และทดสอบด้วยเทคนิคโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูงชนิดร่วมกับตัวตรวจวัดชนิดฟลูออเรสเซนส์ (fluorescence detector) ที่ให้ค่า sensitivity สูง สามารถทดสอบได้ในระดับความเข้มข้นต่ำสุด (detection limit) เท่ากับ 0.90 ug/ml

ในการศึกษาครั้งนี้จึงใช้สารก่ออนุพันธ์ชนิด FMOC-Cl เพื่อติดฉลากกรดอะมิโนชนิดไฮดรอกซีโพรลีน และตรวจวิเคราะห์ด้วยโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูงร่วมกับตัวตรวจวัดชนิดฟลูออเรสเซนส์ (HPLC-FLD) เพื่อทดสอบปริมาณคอลลาเจนในเครื่องดื่มที่มีส่วนผสมของคอลลาเจนไฮโดรไลเซส โดยเปรียบเทียบปริมาณไฮดรอกซีโพรลีนที่ได้จากการตรวจวิเคราะห์ด้วยเครื่อง HPLC-FLD จากนั้นนำมาคูณด้วยปัจจัย (conversion factor) เพื่อให้ได้เป็นค่าปริมาณคอลลาเจนในตัวอย่าง และทำการตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีทดสอบที่พัฒนาขึ้นเพื่อให้มั่นใจได้ว่าวิธีการทดสอบปริมาณคอลลาเจนดังกล่าวมีความถูกต้อง รวดเร็วและแม่นยำ สอดคล้องกับมาตรฐานห้องปฏิบัติการ ISO/IEC 17025 : 2017

### 3. วิธีการวิจัย

ตัวอย่างที่ใช้ในการทดสอบ

การวิจัยครั้งนี้ได้ทำการเก็บรวบรวมข้อมูลตัวอย่าง สามารถแบ่งตัวอย่างเป็น 4 กลุ่ม ได้แก่ กลุ่มวัตถุดิบ กลุ่มอาหารทั่วไปพร้อมบริโภค กลุ่มเครื่องดื่มในภาชนะปิดสนิท และกลุ่มอาหารเสริม เพื่อนำมาทดสอบหาปริมาณคอลลาเจน

วัสดุและอุปกรณ์

ทดสอบปริมาณคอลลาเจนด้วยเทคนิค pre-column reverse phase High Performance Liquid Chromatography (HPLC) ด้วยตัวตรวจวัดชนิดฟลูออเรสเซนซ์ (FLD) โดยเครื่อง HPLC รุ่น HP 1260 บริษัท Agilent Technologies, เครื่อง Block Heater ยี่ห้อ Stuart รุ่น SBH 200D, สารมาตรฐาน 4-Hydroxy-L-proline  $\geq 99\%$ , 9-Fluorenylmethyl chloroformate  $\geq 99\%$  (FMOC-Cl) จาก Sigma-Aldrich, Hydrochloric acid, Methanol และ Acetonitrile (HPLC grade) จาก Labscan

การเตรียมสารละลายมาตรฐานและตัวอย่าง

เตรียมสารละลายมาตรฐานประมาณ 0.1 g ละลายด้วย 0.1 N HCl ให้ได้ความเข้มข้น 1,000 mg/L และเตรียมสารมาตรฐานที่ความเข้มข้นต่าง ๆ อย่างน้อย 5 ระดับความเข้มข้น เพื่อทำการหาปริมาณสำหรับการเตรียมตัวอย่างเพื่อทดสอบปริมาณคอลลาเจน โดยชั่งตัวอย่างน้ำหนักที่แน่นอน ใส่ในหลอดสำหรับย่อยตัวอย่างที่มีฝาปิด เพื่อป้องกันการสัมผัสกับอากาศ จากนั้นเติม 6 M HCl 5 ml เขย่าเบา ๆ ให้เข้ากัน แล้วนำไปย่อยด้วยเครื่องย่อย (block digestion) ที่อุณหภูมิ 110 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง [4] นำสารละลายตัวอย่างที่ผ่านการย่อยมาเจือจางด้วยน้ำกลั่น (distilled water) ให้ได้ปริมาตรที่ต้องการ เก็บส่วนใสของตัวอย่างไว้ เพื่อใช้ในการวิเคราะห์ต่อไป โดยนำสารละลายส่วนใสจากข้างต้น 250  $\mu$ l เติมสารละลาย 0.4 M borate buffer pH 10.4 ปริมาณ 1 ml และทำอนุพันธ์ด้วยการเติมสาร 50% FMOC-Cl ปริมาตร 250  $\mu$ l ผสมให้เข้ากัน ตั้งทิ้งไว้ 1 นาที กรองสารละลายด้วย nylon syringe filter ใส่ขวด vial สีชาขนาด 1.5 ml นำไปวิเคราะห์ด้วยเครื่อง HPLC

การทดสอบปริมาณคอลลาเจนด้วยเทคนิค HPLC จะใช้คอลัมน์ C18 (4.6 x 150 mm, 5  $\mu$ m diameter) และใช้เฟสเคลื่อนที่แบบผสม (Gradient) โดยใช้เฟสเคลื่อนที่ A เป็น sodium dihydrogen phosphate pH 7.8 และเฟสเคลื่อนที่ B เป็น methanol : acetonitrile : DI water ในอัตราส่วน 45 : 40 : 15 (v/v/v) โดยมีสภาวะของอัตราการไหลของเฟสเคลื่อนที่ในช่วงเวลาต่าง ๆ (program gradient) ตามตารางที่ 1 อุณหภูมิคอลัมน์ 30 องศาเซลเซียส และอัตราการไหล 0.7 ml/min โดยมีความยาวคลื่นที่ให้พลังงานกับสาร (excitation wavelengths) ที่ 270 nm และความยาวคลื่นที่สารดูดกลืน (emission wavelengths) ที่ 316 nm ใช้เวลาในการวิเคราะห์ 45 นาทีต่อตัวอย่าง ตรวจสอบค่า retention time ของ 4-Hydroxy-L-proline และคำนวณปริมาณคอลลาเจนโดยคูณด้วยปัจจัย (conversion factor) 7.25 ตามวิธี [14] ดังสมการ

$$\text{Collagen content (\%)} = \frac{\text{Hydroxyproline, mg/L} \times \text{CF}}{\text{weight of test portion, g} \times 100} \quad (1)$$

ตารางที่ 1 สภาวะของอัตราการไหลของเฟสเคลื่อนที่ในช่วงเวลาต่าง ๆ (program gradient)

| เวลา (นาที) | เฟสเคลื่อนที่ A | เฟสเคลื่อนที่ B |
|-------------|-----------------|-----------------|
| 0           | 60              | 40              |
| 15          | 45              | 55              |
| 45          | 35              | 65              |

## การตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีทดสอบ (Method validation)

เพื่อให้มั่นใจได้ว่าวิธีการทดสอบที่เลือกใช้มีความถูกต้อง เหมาะสมที่จะนำไปใช้ในการทดสอบปริมาณคอลลาเจนต่อไป และเพื่อให้สอดคล้องตามระบบมาตรฐานห้องปฏิบัติการ ISO/IEC 17025 : 2017 ซึ่งประกอบด้วย การพิสูจน์ช่วงของการวัด (working rang) ความเป็นเส้นตรง (Linearity) ขีดจำกัดของการตรวจพบ (Limit of Detection : LOD) และขีดจำกัดของการวัดเชิงปริมาณได้ (Limit of Quantitation : LOQ) ความเที่ยง (precision) และความสามารถในการทดสอบซ้ำในช่วงเวลาต่างกัน (reproducibility) และความแม่นยำ (trueness) โดยมีขั้นตอนดังนี้

พิสูจน์ช่วงของการวัด และความเป็นเส้นตรง โดยเตรียมสารละลายมาตรฐาน 4-Hydroxy-L-proline ความเข้มข้นอย่างน้อย 5 ระดับ ๆ ละ 3 ซ้ำ ประเมินความเป็นเส้นตรงของกราฟมาตรฐานโดยหาความสัมพันธ์เชิงเส้นระหว่างความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐาน (แกน X) และพื้นที่ใต้กราฟ (แกน Y) พิจารณาค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ (correlation coefficient,  $R^2$ ) โดยค่าที่ได้ควรมีค่าเข้าใกล้หนึ่ง และมากกว่าหรือเท่ากับ 0.995 ถือว่ากราฟมาตรฐานดังกล่าว มีความถูกต้อง น่าเชื่อถือ

พิสูจน์ขีดจำกัดของการตรวจพบ และขีดจำกัดของการวัดเชิงปริมาณได้ โดยเลือกตัวอย่างในกลุ่มเครื่องดื่มในภาวะปิดสนิท และเติมสารละลายมาตรฐานที่ระดับความเข้มข้น 0.05 mg/L ลงในตัวอย่าง ทำการทดสอบ 10 ซ้ำ คำนวณค่าส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน (SD) โดยขีดจำกัดของการตรวจพบเท่ากับ 3SD และขีดจำกัดของการวัดเชิงปริมาณเท่ากับ 10SD

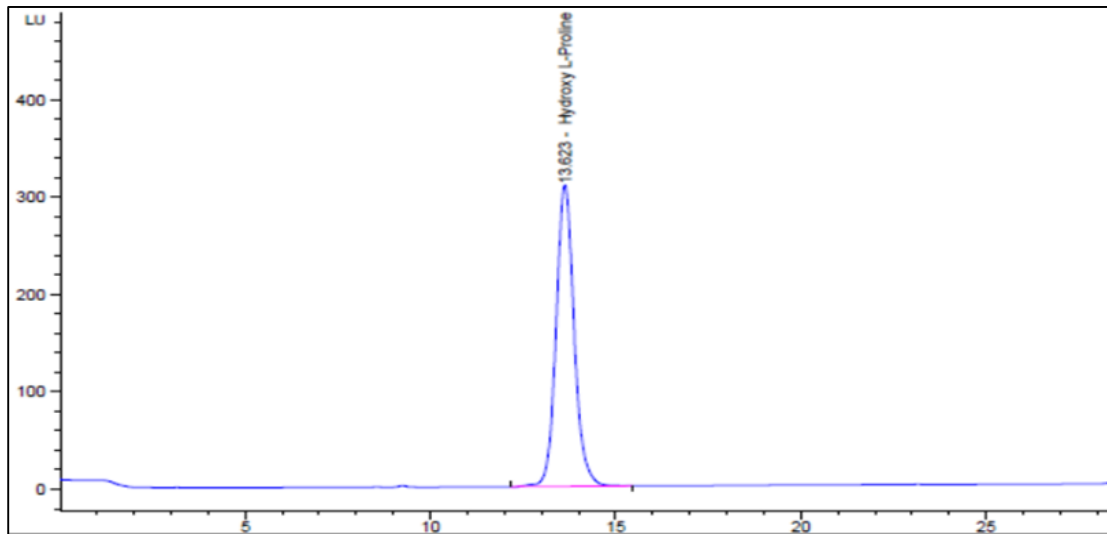
พิสูจน์ความเที่ยงและความแม่นยำของวิธี โดยเติมสารมาตรฐาน 4-Hydroxy-L-proline ลงในตัวอย่าง 3 ระดับความเข้มข้น ๆ ละ 10 ซ้ำ คำนวณค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ (% RSD) และความเที่ยงในการทำซ้ำจากค่า Horwitz ratio พิสูจน์ความแม่นยำของวิธี โดยคำนวณการคืนกลับของสารมาตรฐาน (% recovery) ตามเกณฑ์มาตรฐาน [15]

พิสูจน์ความสามารถในการทดสอบซ้ำในช่วงเวลาต่างกัน โดยทดสอบปริมาณคอลลาเจนในตัวอย่างจำนวน 10 ครั้ง ในช่วงเวลาที่แตกต่างกัน เปรียบเทียบความแตกต่างของผลการทดสอบทางสถิติ t-test ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 %

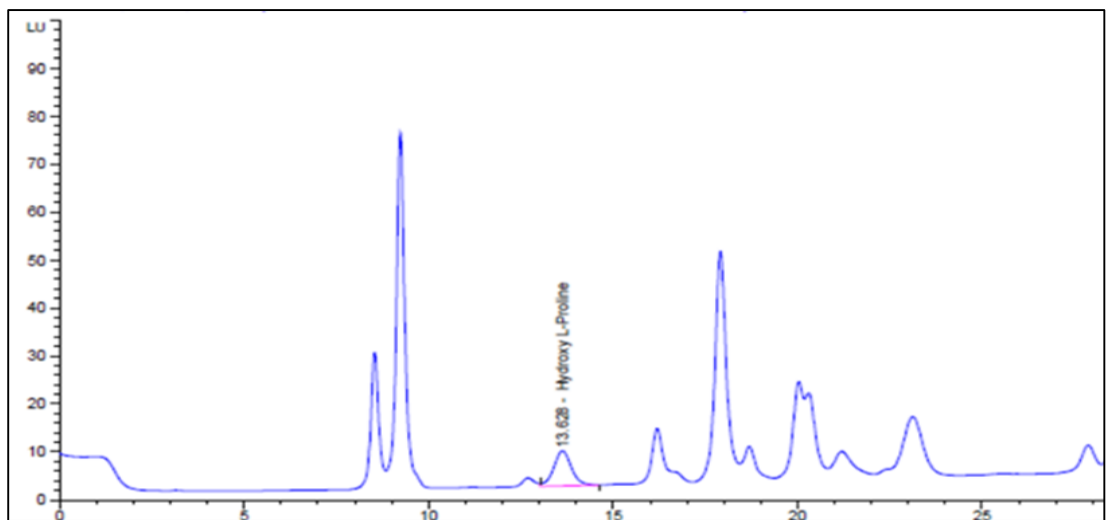
## 4. ผลการวิจัย

จากสภาวะในการทดสอบปริมาณ 4-Hydroxy-L-proline ด้วยเครื่องโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูงร่วมกับตัวตรวจวัดชนิดฟลูออเรสเซนส์ พบว่าเป็นวิธีที่มีความจำเพาะ สามารถแยกสารที่ต้องการได้

อย่างชัดเจน โดยสาร 4-Hydroxy-L-proline จะถูกชะออกจากคอลัมน์ประมาณเวลาที่ 13.62 (retention time) แสดงโครมาโทแกรมของสาร 4-Hydroxy-L-proline ของตัวอย่างเครื่องดื่ม ตามภาพที่ 2



ภาพที่ 1 โครมาโทแกรมของสารมาตรฐาน 4-Hydroxy-L-proline ความเข้มข้น 50 mg/L



ภาพที่ 2 โครมาโทแกรมของสาร 4-Hydroxy-L-proline ในตัวอย่างเครื่องดื่ม

จากเก็บรวบรวมข้อมูลตัวอย่างเพื่อนำมาทดสอบหาปริมาณคอลลาเจน จำนวน 113 ตัวอย่าง สามารถแบ่งตัวอย่างเป็น 4 กลุ่ม ได้แก่ กลุ่มวัตถุดิบ กลุ่มอาหารทั่วไปพร้อมบริโภค กลุ่มเครื่องดื่มในภาชนะปิดสนิท และกลุ่มอาหารเสริม โดยมีรายละเอียดดังนี้ กลุ่มวัตถุดิบ ได้แก่ เนื้อไก่ เนื้อกุ้ง เนื้อปลา เป็นต้น กลุ่มอาหารทั่วไปพร้อมบริโภค ได้แก่ หนัปลาทอดกรอบ กาแฟสำเร็จรูปชนิดผง แหนม เป็นต้น กลุ่มเครื่องดื่มในภาชนะปิดสนิทได้น้ำผลไม้ เครื่องดื่มรังก ขนมะยาลี่ เครื่องดื่มประเภทผลิตภัณฑ์จากนมต่าง ๆ ซึ่งมีการเติมคอลลาเจนในปริมาณที่มีการควบคุม และกลุ่มอาหารเสริม ได้แก่ ตัวอย่างผลิตภัณฑ์อาหารเสริมคอลลาเจนชนิดน้ำ ชนิดผง เป็นต้น โดยตัวอย่างแต่ละประเภทนำมาตรวจสอบปริมาณคอลลาเจนด้วยโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูงร่วมกับตัวตรวจวัดชนิดฟลูออเรสเซนส์

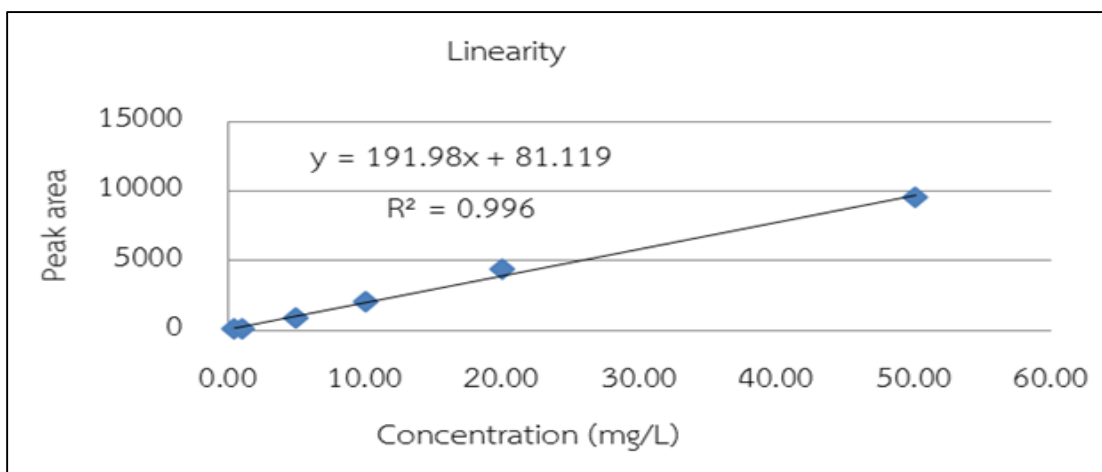
ตารางที่ 2 ปริมาณคอลลาเจนที่พบในตัวอย่าง

| ลำดับ | ชนิดกลุ่มตัวอย่าง                        | จำนวนตัวอย่าง | คิดเป็นสัดส่วนจากตัวอย่างทั้งหมด (%) | ปริมาณคอลลาเจน (%) |
|-------|------------------------------------------|---------------|--------------------------------------|--------------------|
| 1     | วัตถุดิบ                                 | 31            | 27                                   | 0.3 - 99.0         |
| 2     | อาหารทั่วไปพร้อมบริโภค                   | 11            | 10                                   | 0.2 - 30.0         |
| 3     | เครื่องดื่มในภาชนะปิดสนิท                | 54            | 48                                   | 0.1 - 25.0         |
| 4     | ผลิตภัณฑ์อาหารเสริม collagen hydrolysate | 17            | 15                                   | 1.0 - 20.0         |

จากตารางที่ 2 พบว่าตัวอย่างกลุ่มเครื่องดื่มในภาชนะปิดสนิท เป็นกลุ่มที่ได้รับความสนใจของผู้ผลิตที่นิยมนำคอลลาเจนมาเติมเป็นส่วนผสมของผลิตภัณฑ์ เมื่อนำมาทดสอบหาปริมาณคอลลาเจน พบว่ามีปริมาณคอลลาเจน ตั้งแต่ 0.1-25.0% คิดเป็น 48% จากตัวอย่างทั้งหมด รองมาคือกลุ่มวัตถุดิบ 27% ผลิตภัณฑ์อาหารเสริม 15% และอาหารทั่วไปพร้อมบริโภค 10% เป็นลำดับสุดท้าย โดยมีปริมาณคอลลาเจนอยู่ในช่วง 0.3-99.0% และในการศึกษาครั้งนี้จะทำการศึกษาวิธีการทดสอบและความใช้ได้ของวิธีการทดสอบหาปริมาณคอลลาเจนในตัวอย่างเครื่องดื่มในภาชนะปิดสนิทที่มีส่วนผสมของคอลลาเจนไฮโดรไลเซส

#### การตรวจสอบความใช้ได้ของวิธี (Method validation)

เพื่อเป็นการยืนยันว่าวิธีที่ใช้ในการทดสอบปริมาณคอลลาเจนนั้นเหมาะสม โดยการพิสูจน์ช่วงของการวัด และความเป็นเส้นตรง โดยสร้างกราฟมาตรฐานและหาความสัมพันธ์เชิงเส้นระหว่างความเข้มข้นสารละลายมาตรฐาน (แกน X) และพื้นที่ใต้กราฟ (แกน Y) พบว่ามีค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ (Correlation coefficient,  $R^2$ ) เท่ากับ 0.996 ดังภาพที่ 3 และมีช่วงการใช้งานที่เป็นเส้นตรงที่ความเข้มข้นตั้งแต่ 0.5-50 mg/L และเพื่อยืนยันว่าเป็นสารชนิดเดียวกัน ทำการทดสอบความเข้มข้นละ 3 ซ้ำ เปรียบเทียบพื้นที่ใต้กราฟในเวลาที่พบสาร (retention time) พบว่ามีค่าความเที่ยงของการทดสอบซ้ำของพื้นที่ใต้กราฟ (%RSD) มีค่าน้อยกว่า 10 ตามเกณฑ์ที่กำหนด [15] ดังกล่าวมีความถูกต้อง น่าเชื่อถือ แสดงดังตารางที่ 3



ภาพที่ 3 กราฟความสัมพันธ์เชิงเส้นตรงระหว่างความเข้มข้นสารมาตรฐาน 4-Hydroxy-L-proline กับพื้นที่ใต้กราฟ

ตารางที่ 3 พื้นที่ใต้กราฟของสารมาตรฐาน 4-Hydroxy-L-proline

| Concentration<br>(mg/L) | Peak area |           |           | Peak area<br>(mean) | %<br>RSD |
|-------------------------|-----------|-----------|-----------|---------------------|----------|
|                         | 1         | 2         | 3         |                     |          |
| 0.50                    | 91.45077  | 105.05761 | 96.06548  | 96.06548            | 7.20     |
| 1.00                    | 163.0345  | 169.25786 | 167.35297 | 167.35297           | 1.91     |
| 5.01                    | 922.92798 | 916.39423 | 927.02075 | 927.02075           | 0.58     |
| 10.03                   | 2126.1177 | 2100.1948 | 2031.2581 | 2031.25806          | 2.41     |
| 20.06                   | 4322.4395 | 4461.7881 | 4381.7383 | 4381.73828          | 1.60     |
| 50.14                   | 9691.3897 | 9507.1943 | 9537.5693 | 9537.56934          | 1.04     |

พิสูจน์ขีดจำกัดของการตรวจพบและขีดจำกัดของการวัดเชิงปริมาณได้ โดยทำการทดสอบ 10 ซ้ำ พบว่ามีค่าส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน (SD) เท่ากับ 0.0013 มีขีดจำกัดของการตรวจพบ (LOD) เท่ากับ 0.004% และขีดจำกัดของการวัดเชิงปริมาณ (LOQ) เท่ากับ 0.013%

ตารางที่ 4 ผลการพิสูจน์ความเที่ยง (precision) และความแม่นยำ (% recovery) n=10

| Concentration (mg/L) | % Recovery | % RSD | Horwitz | Horwitz ratio |
|----------------------|------------|-------|---------|---------------|
| 1.00                 | 93.27      | 6.43  | 3.25    | 1.98          |
| 5.01                 | 99.07      | 2.18  | 2.55    | 0.85          |
| 10.03                | 105.11     | 1.45  | 2.28    | 0.63          |

พิสูจน์ความเที่ยงของการทดสอบซ้ำ ที่ระดับความเข้มข้น 1.00, 5.01 และ 10.03 mg/L มีค่า Horwitz ratio เท่ากับ 1.98, 0.85 และ 0.63 ตามลำดับ ซึ่งเป็นไปตามเกณฑ์การยอมรับ คือมีค่าน้อยกว่า 2 และจากการพิสูจน์ความแม่นยำของวิธีโดยคำนวณการคืนกลับของสารมาตรฐาน 4-Hydroxy-L-proline พบว่ามีค่าการคืนกลับเฉลี่ยเท่ากับ 93.27%, 99.07% และ 105.11% ตามลำดับ ซึ่งอยู่ในช่วงเกณฑ์การยอมรับ คือ 80-110% ที่ระดับของสารที่สนใจไม่เกิน 10 mg/L [15]

ตารางที่ 5 ปริมาณคอลลาเจนในเครื่องต้มที่ทดสอบซ้ำในวันเดียวกันและในช่วงเวลาต่างวัน (reproducibility)

| Collagen content (%) |                 |       |
|----------------------|-----------------|-------|
|                      | Mean $\pm$ SD   | % RSD |
| Intra-day (n=10)     | 0.17 $\pm$ 0.01 | 8.16  |
| Inter-day (n=10)     | 0.18 $\pm$ 0.01 | 7.48  |

พิสูจน์ความสามารถในการทดสอบซ้ำในช่วงเวลาที่ต่างกันโดยพิจารณาค่า Relative Standard Deviation (%RSD<sub>R</sub>) พบว่ามีค่าเฉลี่ยของปริมาณคอลลาเจนและค่า %RSD<sub>R</sub> เท่ากับ 0.17  $\pm$  0.01% และ

$0.18 \pm 0.01\%$  ตามลำดับ เมื่อทดสอบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยด้วยสถิติ t-test พบว่าไม่มีความแตกต่างอย่าง มีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่น 95 %

## 5. อภิปรายผลและข้อเสนอแนะการวิจัย

จากการเก็บข้อมูลตัวอย่างที่นิยมใช้คอลลาเจนเป็นวัตถุเจือปนอาหาร (food additive) คือกลุ่มเครื่องดื่มในภาชนะปิดสนิท โดยมีปริมาณคอลลาเจนอยู่ในช่วงตั้งแต่ 0.1-25.0% ซึ่งแสดงให้เห็นว่าเป็นตัวอย่างที่ได้รับความนิยมของผู้ผลิตเป็นอย่างมาก ผู้วิจัยจึงเลือกทำการตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีทดสอบปริมาณคอลลาเจนให้ครอบคลุมกับกลุ่มตัวอย่างดังกล่าว เพื่อให้สอดคล้องกับความต้องการของทั้งผู้ผลิตและผู้บริโภคเพื่อให้มั่นใจในผลิตภัณฑ์ก่อนนำมาบริโภค โดยพบว่าในช่วงการใช้งานของสารมาตรฐานที่เป็นเส้นตรงที่ความเข้มข้นตั้งแต่ 0.5-50 mg/L มีค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์เท่ากับ 0.996 มีขีดจำกัดของการตรวจพบและขีดจำกัดของการวัดเชิงปริมาณได้ เท่ากับ 0.004% และ 0.013% ตามลำดับ มีความเที่ยงโดยพิจารณาค่า Horwitz ratio มีน้อยกว่า 2 และความแม่นยำจากการคืนกลับอยู่ในช่วง 80-110% ที่ระดับของสารที่สนใจไม่เกิน 10 mg/L และเมื่อทำการทดสอบในเวลาที่แตกต่างกันพบว่าปริมาณคอลลาเจนที่ได้ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ จากการทดสอบความใช้ได้ของวิธีทดสอบปริมาณคอลลาเจนในเครื่องดื่ม ซึ่งแสดงให้เห็นว่าวิธีการทดสอบปริมาณคอลลาเจนในผลิตภัณฑ์เครื่องดื่มที่มีส่วนผสมของคอลลาเจนไฮโดรไลเซส ดังกล่าวมีความถูกต้อง เหมาะสม ที่จะนำมาใช้ในการปฏิบัติงานประจำของห้องปฏิบัติการ โดยพบว่าวิธีการทดสอบปริมาณคอลลาเจนดังกล่าวยังไม่สามารถจำแนกประเภทของคอลลาเจนที่เติมลงในผลิตภัณฑ์ได้ ซึ่งการใช้ตัวคูณปัจจัย (conversion factor) เป็นการแสดงผลแห่งที่มาของโปรตีนที่เป็นวัตถุดิบในการผลิตคอลลาเจน โดยมีงานวิจัยที่เกี่ยวข้องกับการนำตัวคูณปัจจัยสำหรับการคำนวณปริมาณคอลลาเจนที่แท้จริง เช่น คอลลาเจนที่มาจากเนื้อสัตว์จะใช้ตัวคูณปัจจัย เท่ากับ 8 [2] ซึ่งในการศึกษาตัวเลขของตัวคูณปัจจัยนี้ ยังมีการศึกษาอย่างต่อเนื่องและยังไม่มีการระบุตัวเลขที่แน่นอน

ในปัจจุบันพบวิธีการทดสอบปริมาณคอลลาเจนในเนื้อสัตว์และผลิตภัณฑ์จากเนื้อสัตว์ [2] เท่านั้น ที่เป็นวิธีมาตรฐานสากล ซึ่งยังไม่ครอบคลุมกับตัวอย่างเครื่องดื่มที่มีส่วนผสมของคอลลาเจนไฮโดรไลเซสที่กำลังได้รับความนิยมในท้องตลาด และเพื่อสนองความต้องการของลูกค้าหรือผู้บริโภค ทางห้องปฏิบัติการจึงได้พัฒนาวิธีทดสอบและทำการยืนยันว่าวิธีการทดสอบปริมาณคอลลาเจนในเครื่องดื่มที่มีส่วนผสมของคอลลาเจนไฮโดรไลเซสดังกล่าว มีความเหมาะสม ให้ผลการทดสอบที่ถูกต้อง เพื่อให้ทันต่อสถานการณ์ปัจจุบัน และสามารถแข่งขันกับห้องปฏิบัติการอื่นได้ อย่างไรก็ตามในการทดสอบปริมาณคอลลาเจนด้วยวิธีการย่อยตัวอย่างด้วยกรดไฮโดรคลอริกเพื่อตัดสายพันธะเปปไทด์ของโปรตีนให้อยู่ในรูปกรดอะมิโนและใช้สารอนุพันธ์ FMOC-Cl เพื่อแสดงความจำเพาะเจาะจงของสาร hydroxyproline ทดสอบปริมาณด้วยเครื่อง HPLC ที่มีความไวสูง มีการแยกที่ดี เป็นวิธีการที่ได้รับความนิยม เนื่องจากเครื่อง HPLC เป็นเครื่องมือพื้นฐานที่ห้องปฏิบัติการทั่วไปมีใช้งาน นอกจากนี้ยังเป็นวิธีทดสอบที่ง่าย รวดเร็ว เหมาะสมกับการทดสอบในงานประจำ และสามารถนำไปยื่นขอการรับรองวิธีการทดสอบตามระบบมาตรฐาน ISO/IEC 17025 ต่อไปได้

### คำขอบคุณ

งานวิจัยนี้สำเร็จลงด้วยดี จากการอนุเคราะห์ของหัวหน้าศูนย์บริการประกันคุณภาพอาหาร สถาบันค้นคว้าและพัฒนาผลิตภัณฑ์อาหาร ที่สนับสนุนเครื่องมือและอุปกรณ์ต่าง ๆ อีกทั้งยังให้การสนับสนุนบุคลากรพัฒนาความรู้ต่อยอดจากงานประจำสู่งานวิจัย เพื่อตอบสนองความต้องการของผู้ใช้บริการของห้องปฏิบัติการศูนย์บริการประกันคุณภาพอาหาร ผู้วิจัยต้องขอขอบคุณมา ณ โอกาสนี้

### 6. เอกสารอ้างอิง

- [1] Moskowitz RW. **Role of collagen hydrolysate in bone and joint disease.** Seminars in Arthritis and Rheumatism, 2000, 30(2) p. 87-99.
- [2] AOAC Official method 990.26, **official methods of analysis**, 17<sup>th</sup> edition. Association of Official Analytical Chemists, Gaithersburg, MD, 2000.
- [3] Messia MC, Di Falco T, Panfili G, Marconi E. **Rapid determination of collagen in meat-based foods by microwave hydrolysis of proteins and HPAEC-PAD analysis of 4-hydroxyproline.** Meat Science, 2008, 80(2), p. 401-409.
- [4] Green, G.D., Reagan, K. **Determination of hydroxyproline by high pressure liquid chromatography.** Analytical Biochemistry, 1992, (201) P. 265-269.
- [5] Lareu, R.R., Zeugolis, D.I., Abu-Rub, M., Pandit, A., and Raghunath, M. **Essential modification of the Sircol Collagen Assay for the accurate quantification of collagen content in complex protein solutions.** Acta Biomaterialia, 2010, p. 3146–3151.
- [6] Lin, Y.K., and Kuan, C.Y. **Development of 4-hydroxyproline analysis kit and its application to collagen quantification.** Food Chemistry. 2010, p. 1271-1277.
- [7] Taskiran, D., Taskiran, E., Yercan, H., and Kutay, F.Z. **Quantification of total collagen in rabbit tendon by the Sirius Red Method.** Turkish Journal of Medical Sciences, 1997, p. 7-9.
- [8] Gelse, K., Poschl, E. and Aigner, T. **Collagens-structure, function and biosynthesis.** Advanced Drug Delivery Reviews, 2003, 55(12) p. 1531-1546.
- [9] González-Martín, M.I., Bermejo, C.F., Hierro, J.M.H. and Sánchez González, C.I. **Determination of hydroxyproline in cured pork sausages and dry cured beef products by NIRS technology employing a fibre-optic probe.** Food Control, 2009, (20) p. 752–755.
- [10] Colgrave, M.L., Allingham, P.G. and Jones, A. **Hydroxyproline quantification for the estimation of collagen in tissue using multiple reaction monitoring mass spectrometry.** Journal of Chromatography A. 2008, (1212) p.150–153.

- [11] Hofman, K., Hall, B., Cleaver, H. and Marshall, S. **High-throughput quantification of hydroxyproline for determination of collagen.** Analytical Biochemistry, 2011, (417) p. 289–291.
- [12] Dai, Z., Wu, Z., Jia, S. and Wu, G. **Analysis of amino acid composition in proteins of animal tissues and foods as pre-column o-phthaldialdehyde derivatives by HPLC with fluorescence detection.** Journal of Chromatography B, 2014, (964) p. 116-127.
- [13] Aditya A. **Isolation, Purification, and Collagen Characterization from Pig Skin, and Glisin, Prolin, and Hydroxyproline Analysis in Characterization of High Performance Liquid Chromatography-Fluorescence.** Depok, Thesis. Faculty of Pharmacy, Universitas Indonesia, 2017.
- [14] Paul R., Hutson Mark E. Crawford, Ronald L., Sorkness. **Liquid chromatographic determination of hydroxyproline in tissue samples.** Journal of Chromatography B, 2003, (791) P. 427-430.
- [15] AOAC Peer Verified methods Program. **Manual on policies and procrdures.** Arlington, VA, Nov.1993.