



รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการ “การพัฒนาวิธีวิเคราะห์เพื่อหาปริมาณฟิวรีนและกรดยูริกในผักพื้นบ้านไทย”

โดย ผศ.ดร. ชุติมา เพชรกระจ่าง และคณะ

กุมภาพันธ์ 2558

สัญญาเลขที่ RDG5620011

รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการ “การพัฒนาวิธีวิเคราะห์เพื่อหาปริมาณฟิวรีนและกรดยูริกในผักพื้นบ้านไทย”

คณะผู้วิจัย

สังกัด

ผศ.ดร. ชุติมา เพชรกระจำ
[หัวหน้า โครงการวิจัยผู้รับทุน]

คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล

ดร. ปิยพช โรจน์สง่า
[นักวิจัยผู้ร่วมโครงการ]

คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล

สนับสนุนโดยสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย (สกว.)
(ความเห็นในรายงานนี้เป็นของผู้วิจัย สกว.ไม่จำเป็นต้องเห็นด้วยเสมอไป)

Development of liquid chromatography mass spectroscopy for determination of purine s and uric acid in Thai vegetables

Narira Rukdee, Piyanuch Rojsanga and Chutima Phechkrajang

Abstract

Accumulation of purines and uric acid in bone joints are causative of gout disease. Gout patients should avoid high purines and uric acid containing foods. Thai vegetables are widely consumed but information of purines and uric acid in such vegetables is limited. Objective of this research is developing a liquid chromatography mass spectroscopy method for determination of purines and uric acid in Thai vegetables. In our study, a successive liquid chromatography mass spectroscopy method was developed and validated according to a standard guideline, USFDA. An electrospray ionization triple-quadrupole liquid chromatography mass spectroscopy was utilized. Three purines, adenosine guanosine, xanthine, and uric acid were well determined by using caffeine as internal standard. Then, the method was used to determine purines and uric acid in sixteen Thai vegetables. The determination results showed that most vegetable samples contained low level of purines and uric acid. These results implied that Thai vegetables were suitable to consume by patients who have to control purines and uric acid such as gout patients.

Key words: Gout disease, Purines, Uric acid

การพัฒนาวีธีวิเคราะห์เพื่อหาปริมาณพิวรีนและกรดยูริกในผักพื้นบ้านไทย

นริสา รักดี, ปิยนุช โรจน์สง่า และ ชุตินา เพชรกระจำว

บทคัดย่อ

การสะสมของพิวรีนและกรดยูริกที่ข้อกระดูกเป็นสาเหตุของโรคเก๊าท์ ผู้ป่วยโรคเก๊าท์จึงควรหลีกเลี่ยงอาหารที่มีพิวรีนและกรดยูริกสูง ผักพื้นบ้านไทยเป็นอาหารที่นิยมรับประทานทั่วไปแต่ปัจจุบันไม่มีข้อมูลที่แน่ชัดเกี่ยวกับปริมาณของพิวรีนและกรดยูริกในผักพื้นบ้านชนิดต่างๆ งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อพัฒนาวีธีลิกวิดโครมาโตกราฟี แมสสเปคโตรสโคปี เพื่อหาปริมาณพิวรีนและกรดยูริกในผักพื้นบ้านไทย ในการศึกษาวิธีลิกวิดโครมาโตกราฟี แมสสเปคโตรสโคปี ได้พัฒนาขึ้นสำเร็จ และทำการตรวจสอบเพื่อยืนยันความใช้ได้ของวิธีตามเกณฑ์มาตรฐานของสำนักงานคณะกรรมการอาหารและยาประเทศสหรัฐอเมริกา วิธีวิเคราะห์พัฒนาขึ้นโดยใช้เครื่องลิกวิดโครมาโตกราฟี แมสสเปคโตรสโคปี ชนิดทริปเปิ้ลควอดรูโพล และใช้อิเล็กโตรสเปรย์ไอออไนเซชัน พิวรีน 3 ชนิดคือ อะดีโนซีน กัวโนซีน แซนทีน และกรดยูริก สามารถถูกตรวจวิเคราะห์ได้เป็นอย่างดีโดยใช้คาเฟอีน เป็นสารมาตรฐานภายใน จากนั้นนำวิธีดังกล่าวไปตรวจสอบปริมาณพิวรีนและกรดยูริกในผักพื้นบ้านไทยทั้งหมด 16 ชนิด ผลการตรวจสอบพบว่า ในผักทุกชนิดที่ใช้ในการศึกษามีปริมาณพิวรีนและกรดยูริกในระดับต่ำ จากผลดังกล่าวแสดงว่าผักพื้นบ้านไทยเหมาะสมที่จะบริโภคสำหรับผู้ป่วยที่จำเป็นต้องควบคุมพิวรีนและกรดยูริกเช่นผู้ป่วยเก๊าท์

คำสำคัญ โรคเก๊าท์ พิวรีน กรดยูริก

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	iii
บทคัดย่อภาษาไทย	iv
สารบัญ	v
บทที่ 1 บทนำ	1
บทที่ 2 ทบทวนวรรณกรรม	2
บทที่ 3 วัตถุประสงค์	8
บทที่ 4 สารเคมีและวิธีดำเนินการวิจัย	9
4.1 สารเคมี เครื่องมือและอุปกรณ์	9
4.2 การพัฒนาวิธีไฮเพอร์ฟอร์มานิลควิดโครมาโตกราฟีเพื่อหาปริมาณพิวรีนและกรดยูริก	10
4.3 การพัฒนาวิธีลิกควิดโครมาโตกราฟีแมสสเปคโตรเมตรีชนิด ion-trap เพื่อหาปริมาณพิวรีนและกรดยูริก	11
4.4 การพัฒนาวิธีลิกควิดโครมาโตกราฟีแมสสเปคโตรเมตรีชนิด triple-quadrupole เพื่อหาปริมาณพิวรีนและกรดยูริก	12
4.5 การตรวจสอบเพื่อยืนยันความใช้ได้ของวิธี (method validation)	14
4.6 การตรวจวิเคราะห์ปริมาณพิวรีนและกรดยูริกในตัวอย่างผักพื้นบ้าน	20
บทที่ 5 ผลการวิจัยและอภิปราย	21
5.1 การพัฒนาวิธีไฮเพอร์ฟอร์มานิลควิดโครมาโตกราฟีเพื่อหาปริมาณพิวรีนและกรดยูริก	21
5.2 การพัฒนาวิธีลิกควิดโครมาโตกราฟีแมสสเปคโตรเมตรีชนิด ion-trap เพื่อหาปริมาณพิวรีนและกรดยูริก	36
5.3 การพัฒนาวิธีลิกควิดโครมาโตกราฟีแมสสเปคโตรเมตรีชนิด triple-quadrupole เพื่อหาปริมาณพิวรีนและกรดยูริก	40
5.4 การตรวจสอบเพื่อยืนยันความใช้ได้ของวิธี (method validation)	42
5.5 การตรวจวิเคราะห์ปริมาณพิวรีนและกรดยูริกในตัวอย่างผักพื้นบ้าน	59
5.6 ข้อดีและข้อเสียของวิธี LC-MS/MS triple quadrupole ที่พัฒนาขึ้น	59
บทที่ 6 สรุปผล	61
เอกสารอ้างอิง	62
ภาคผนวก 1: ตารางเปรียบเทียบกิจกรรมที่วางแผน กิจกรรมที่ดำเนินจริง และผลที่ได้รับ	64
ภาคผนวก 2: บทความที่เผยแพร่	66

แบบสรุปโครงการวิจัย

สัญญาเลขที่ RDG5620011 ชื่อโครงการ การพัฒนาวิธีวิเคราะห์เพื่อหาปริมาณพิวรีน และการดียวริกในผักพื้นบ้านไทย
หัวหน้าโครงการ ผศ.ดร. ชุตติมา เพชรกระจำจ่าง หน่วยงาน คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล
โทรศัพท์ 02-6448695 โทรสาร 02-6448695 อีเมลล์ chutima.mat@mahidol.ac.th

1. ความเป็นมา

ชนิดของอาหารที่บริโภคประจำวันเป็นสิ่งสำคัญที่จะทำให้สุขภาพร่างกายแข็งแรง โดยเฉพาะอย่างยิ่งผู้ที่อยู่ในสภาวะโรคบางอย่างก็ต้องมีการควบคุมการบริโภคอาหารที่อาจส่งผลไม่ดีต่อโรคหรืออาการที่เป็นอยู่ เช่นผู้ป่วยโรคเกาต์ (Gout) ที่ไม่ควรบริโภคอาหารที่มีกรดยูริกมากเกินไป โรคเกาต์มีสาเหตุที่สำคัญจากขบวนการเมตาบอลิซึมที่ผิดปกติของสารพิวรีน (Purines) ทำให้การสังเคราะห์กรดยูริก (Uric acid) มากเกินสมควรเกิดการมีกรดยูริกสูงในร่างกายและตกตะกอนของยูริกตามข้อต่างๆ ทำให้เกิดอาการข้ออักเสบ ปวดบวมแดง ผู้ป่วยโรคเกาต์นอกจากการรับประทานยาต้านการอักเสบและยาลดกรดยูริกแล้ว จำเป็นต้องควบคุมชนิดของอาหารที่บริโภคประจำวันด้วย คือไม่ควรรับประทานอาหารที่มีกรดยูริกสูง เช่น เครื่องในสัตว์ เนื้อสัตว์บางชนิด เช่น เป็ด ไก่ เป็นต้น

ผักพื้นบ้านชนิดต่างๆ เป็นอาหารที่คนไทยนิยมรับประทาน โดยเฉพาะส่วนที่เป็นยอดอ่อนที่มีรายงานว่ามีสารพิวรีนมากและมีข้อแนะนำให้งดการบริโภคในผู้ป่วยโรคเกาต์ ปัจจุบันยังไม่มีการศึกษาที่เด่นชัดเกี่ยวกับปริมาณของกรดยูริกในผักพื้นบ้านชนิดต่างๆของไทย ทำให้ผู้ป่วยไม่สามารถควบคุมการบริโภคที่เหมาะสมได้ งานวิจัยนี้จึงได้จัดทำขึ้นโดยมีวัตถุประสงค์เพื่อพัฒนาวิธีวิเคราะห์เพื่อหาปริมาณกรดยูริกและพิวรีนซึ่งเป็นสารตั้งต้นของการสังเคราะห์กรดยูริก ในผักพื้นบ้านของไทย เพื่อใช้เป็นข้อมูลในการแนะนำผู้ป่วยโรคเกาต์

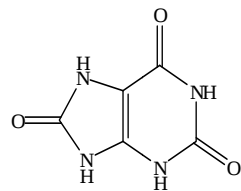
2. วัตถุประสงค์

1. เพื่อพัฒนาวิธีการวิเคราะห์ LC-MS ที่มีประสิทธิภาพสำหรับการหาปริมาณพิวรีน และกรดยูริกในพืชผักพื้นบ้าน
2. เพื่อหาปริมาณของพิวรีนและกรดยูริกในพืชผักพื้นบ้านอย่างน้อย 15 ชนิด เพื่อใช้เป็นข้อมูลการบริโภคสำหรับผู้ป่วยโรคเกาต์

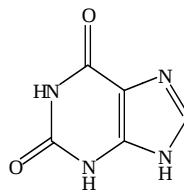
3. ผลการวิจัย

3.1 การพัฒนาวิธี LC-MS/MS สำหรับแยกสารมาตรฐานพิวรีน และกรดยูริก

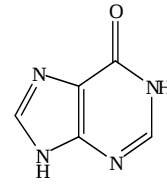
โครงสร้างของพิวรีน 4 ชนิด คือ adenosine guanosine hypoxanthine xanthine และ uric acid แสดงดังรูปด้านล่าง



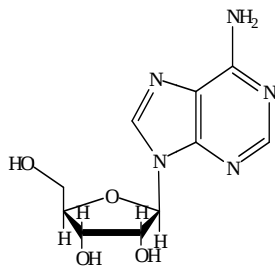
Uric acid



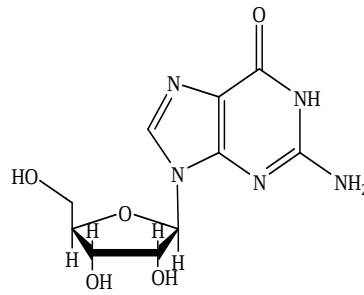
Xanthine



Hypoxanthine

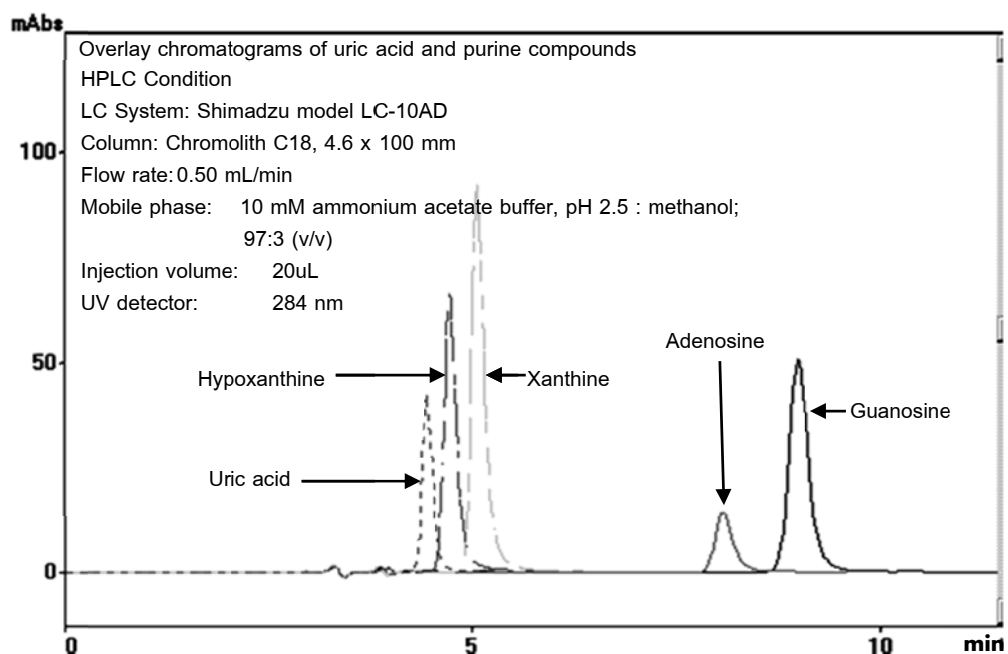


Adenosine



Guanosine

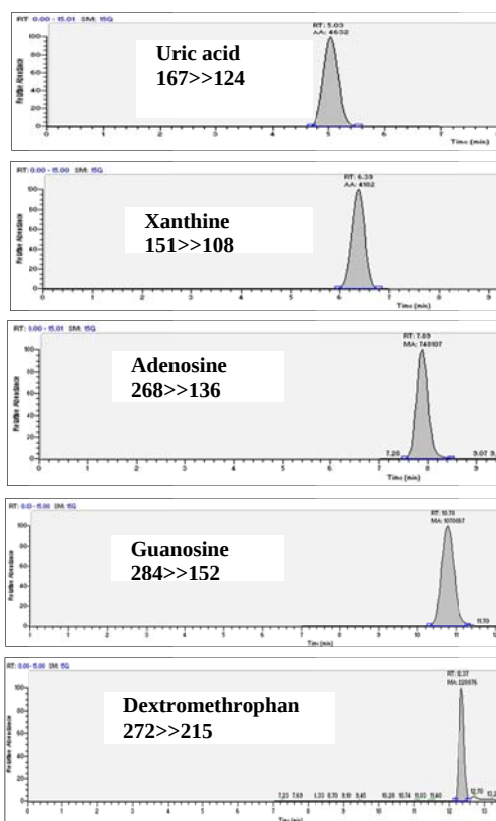
การพัฒนาวิธีวิเคราะห์ LC-MS/MS เริ่มจากการหา mobile phase ที่เหมาะสมโดยใช้ระบบ high-performance liquid chromatography ที่ต่อกับ UV detector (HPLC-UV) สุดท้ายพบว่า mobile phase ที่สามารถแยกสารพิวรีน 4 ชนิดและกรดยูริก ได้คือส่วนผสมของ 10 mM ammonium acetate, pH 2.5 และ เมทานอล (97 ต่อ 3 อัตราส่วนโดยปริมาตร) อัตราการไหล 0.3 มิลลิลิตรต่อนาที โดยใช้คอลัมน์ Chromolith C18 ตรวจวัดสารที่ 284 นาโนเมตร ผลการแยกแสดงดังรูปโครมาโตแกรมด้านล่าง



เมื่อนำระบบ mobile phase จาก HPLC-UV มาใช้ในการพัฒนาระบบ LC-MS/MS ชนิด ion-trap พบว่ามีสัญญาณรบกวนมาก จึงเปลี่ยนจากการใช้ ammonium acetate มาเป็น 0.2% formic acid ซึ่งมีค่า pH ใกล้เคียงกับ ammonium acetate pH 2.5 เป้าหมายในการพัฒนาคือหาพลังงานที่เหมาะสมเพื่อแตกโครงสร้างสารแต่ละชนิดให้ได้ daughter ions ลำดับที่ 1 และลำดับที่ 2

โดยปริมาณของ daughter ions ลำดับที่ 1 จะใช้สำหรับการหาปริมาณ และ daughter ions ลำดับที่ 2 ใช้เพื่อตรวจยืนยันชนิดของสาร ผลการพัฒนาพบว่า ไม่สามารถหา daughter ions ลำดับที่ 2 hypoxanthine ได้ จึงตัด hypoxanthine ออกจากการศึกษา

ระบบ LC-MS/MS ชนิด ion-trap LC-MS/MS ชนิด ion-trap สามารถตรวจวัด daughter ions ลำดับที่ 1 และลำดับที่ 2 ของพิวรีน 3 ชนิดคือ adenosine, guanosine, xanthine และ uric acid ได้ดังรูป



แต่เมื่อทำการตรวจสอบความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์ (method validation) พบว่าค่าความแม่นยำ (precision) ของวิธีวิเคราะห์สูงเกินมาตรฐาน จึงไม่เหมาะกับการหาปริมาณ จึงทำการเปลี่ยนเครื่องมือจาก LC-MS/MS ชนิด ion-trap เป็น LC-MS/MS triple quadrupoles และเปลี่ยน internal standard จาก dextromethorphan เป็น caffeine เนื่องจากโครงสร้างใกล้เคียงกับกลุ่มสารที่ศึกษา มากกว่า dextromethorphan สภาวะของเครื่องที่เหมาะสมคือ

ระบบ LC-MS: UPLCL 30 AD with Shimadzu 8030 Mass spectrophotometer

Ionization source : Electrospray ionization (ESI)

Nebulizing gas flow : 3.0 L/min

Drying gas flow : 12.0 L/min

Column: Ascentis® Express C18 (10 cm × 2.1 mm, 2.7 µm) with guard column

Ascentis® Express C18 (0.5 cm × 2.1 mm, 2.7 µm)

Mobile phase: (A)= 0.2% formic acid in deionized water

(B) = 0.1% formic acid in methanol

Gradient program:

Time (min)	%A	%B
0.50	98	2
1.50	98	2
3.10	10	90
4.00	10	90
5.50	98	2
8.50	98	2

Column temperature: 40°C

Mobile phase flow rate: 0.2 mL/min

พลังงานที่ใช้ในการแตกมวลและ transition ions ของสารที่ศึกษาแสดงดังตารางด้านล่าง

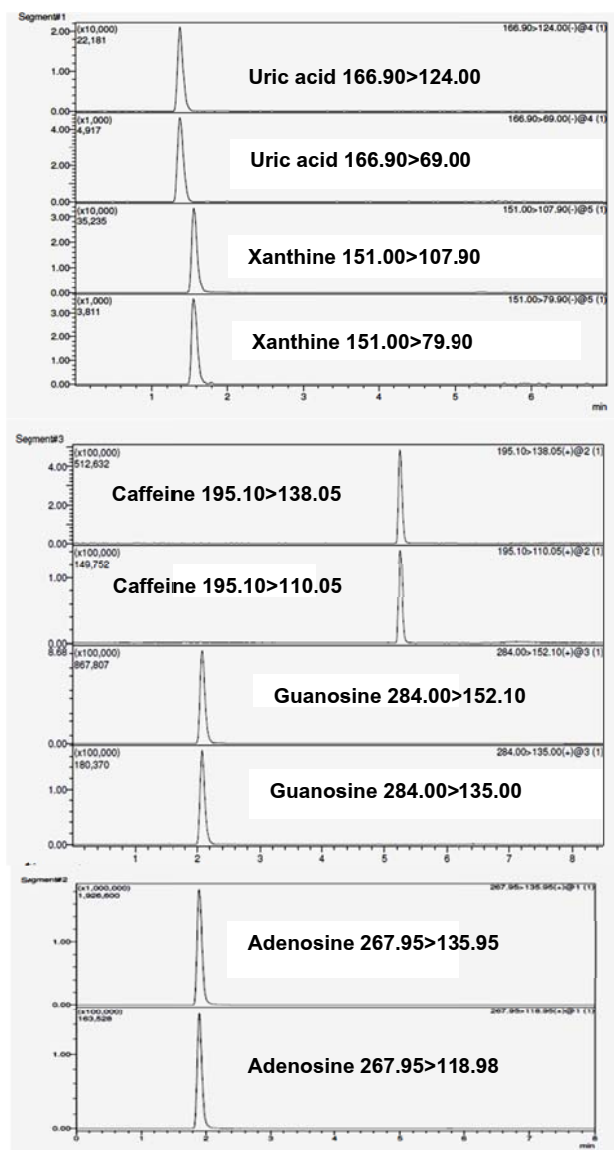
Substances	Precursor ions	Transition ions	Collision energy CE (V)
Uric acid	166.90	124.00	19.2
		69.00	19.0
Xanthine	151.00	107.90	9.0
		79.90	25.5
Adenosine	267.95	135.95	-14.7
		118.98	-43.1
Guanosine	284.00	152.10	-12.1
		135.00	-32.1
Caffeine	195.10	138.05	-18.2
		110.05	-22.1

3.2 การตรวจสอบความถูกต้องของวิธี LC-MS/MS

การตรวจสอบความถูกต้องของวิธี LC-MS/MS ที่พัฒนาขึ้น ใช้มาตรฐานการยอมรับของ US FDA โดยทำการศึกษา linearity, accuracy, precision, recovery, specificity, matrix effect และ stability ผลการศึกษาเป็นดังนี้

1. Specificity ระบบการวิเคราะห์ที่พัฒนาขึ้นมีความจำเพาะกับสารแต่ละชนิดที่ต้องการ จะเห็นได้จากผลโครมาโตแกรมที่แสดง พบว่าสารแต่ละชนิดมีค่า retention time ต่างกัน และแต่ละ

retention time จะตรวจวัดเฉพาะสารที่ต้องการเท่านั้นไม่มีสารอื่นเจือปน ยืนยันได้จากการตรวจวัด fragmentation ion ของสารแต่ละชนิดได้ที่เวลาเดียวกันกับ parent ion



- Linearity แสดงในรูป correlation coefficient (r) พบว่าการตรวจวิเคราะห์สารทั้ง 4 ชนิด มีค่าความเป็นเส้นตรงอยู่ในเกณฑ์ที่ยอมรับได้

Substance	Equations	r
Uric acid	$Y = 0.0031x + 0.3348$	0.9878
Xanthine	$Y = 0.0032x - 0.1038$	0.9974
Adenosine	$Y = 0.8471x + 37.18$	0.9974
Guanosine	$Y = 0.302x + 1.4408$	0.9991

3. Recovery ของการเตรียมตัวอย่าง อยู่ในช่วง 88.3-115.6%

Substance	Equation	Recovery (%)
Uric acid	$Y = 0.8828X + 0.0004$	88.3
Xanthine	$Y = 1.1561X + 5E-05$	115.6
Adenosine	$Y = 0.8968X - 0.0358$	89.7
Guanosine	$Y = 0.8769X - 0.0055$	87.7

4. Matrix effect

Substance	Equation	Matrix Effect	Percent matrix effect
Uric acid	$Y = 1.3821X - 0.1471$	Ion Enhancement	38.2
Xanthine	$Y = 1.0832X - 0.0683$	Ion Enhancement	8.3
Adenosine	$Y = 1.5825X + 27.266$	Ion Enhancement	58.2
Guanosine	$Y = 1.5646X + 5.4401$	Ion Enhancement	56.5

5. Accuracy และ precision (repeatability)

Accuracy และ precision ของ uric acid

Uric acid Nominal conc. (ng/mL)	% Recovery #1	% Recovery #2	% Recovery #3	Average (n=3)	% RSD (n=3)
100	103.6	84.6	83.4	90.5	12.5
200	99.8	95.8	89.5	95.1	5.4
500	100.7	97.5	102.7	100.3	2.6
2000	107.0	98.9	106.6	104.2	4.4

Accuracy และ precision ของ xanthine

Xanthine Nominal conc. (ng/mL)	% Recovery #1	% Recovery #2	% Recovery #3	Average (n=3)	% RSD (n=3)
100	106.1	101.7	102.3	103.4	2.3
200	109.0	100.9	102.6	104.2	4.1
500	107.3	112.0	109.3	109.5	2.1
2000	101.6	111.0	105.9	106.2	4.4

Accuracy และ precision ของ adenosine

Adenosine Nominal conc. (ng/mL)	% Recovery #1	% Recovery #2	% Recovery #3	Average (n=3)	% RSD (n=3)
10	116.2	113.1	81.0	103.4	18.9
50	106.1	89.4	92.3	95.9	9.3
300	100.5	104.7	104.6	103.3	2.3
1000	91.9	99.5	100.5	97.3	4.8

Accuracy และ precision ของ guanosine

Guanosine Nominal conc. (ng/mL)	% Recovery #1	% Recovery #2	% Recovery #3	Average (n=3)	% RSD (n=3)
10	108.2	83.1	114.7	102.0	16.4
50	94.4	93.5	96.6	94.8	1.7
300	93.5	104.8	97.4	98.6	5.9
1000	85.5	112.5	99.0	99.0	13.6

Intermediate precision

Intermediate precision ພຶ້ນ ວຸລິກ ອາຊິດ

Uric acid Nominal conc. (ng/mL)	% Recovery day 1	% Recovery day 2	% Recovery day 3	Average (n=3)	% RSD (n=3)
100	97.1	99.3	103.6	100.0	3.3
200	104.6	99.9	99.8	101.4	2.7
500	101.9	97.4	100.7	100.0	2.3
2000	99.6	98.0	107.0	101.5	4.7

Intermediate precision ພຶ້ນ ຂາງິນ

Xanthine Nominal conc. (ng/mL)	% Recovery day 1	% Recovery day 2	% Recovery day 3	Average (n=3)	% RSD (n=3)
100	83.5	82.7	102.3	89.5	12.4
200	90.5	88.7	102.6	93.9	8.1
500	107.8	101.5	109.3	106.2	3.9
2000	95.0	97.8	105.9	99.6	5.7

Intermediate precision ພຶ້ນ ອາດອິນ

Adenosine Nominal conc. (ng/mL)	% Recovery day 1	% Recovery day 2	% Recovery day 3	Average (n=3)	% RSD (n=3)
10	98.2	91.7	113.1	101.0	10.8
50	103.9	109.9	89.4	101.1	10.4
300	100.7	113.9	104.7	107.1	7.3
1000	93.4	91.9	99.5	94.9	4.3

Intermediate precision ของ guanosine

Guanosine Nominal conc. (ng/mL)	% Recovery day 1	% Recovery day 2	% Recovery day 3	Average (n=3)	% RSD (n=3)
10	95.2	86.3	83.1	88.2	7.1
50	105.9	101.8	93.5	100.4	6.3
300	102.3	103.6	104.8	103.6	1.2
1000	103.1	103.4	112.5	106.3	5.0

จากผลการศึกษา method validation ของวิธี LC-MS/MS ที่พัฒนาขึ้นเพื่อใช้ในการปริมาณของสารพิวรีนและ uric acid ในตัวอย่างผักพบว่าค่าพารามิเตอร์ต่าง ๆ อยู่ในเกณฑ์ที่ยอมรับได้ และค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถวัดปริมาณได้ (LLOQ) คือ 100 ng/mL สำหรับ uric acid และ xanthine และ 10 ng/mL สำหรับ adenosine และ guanosine ซึ่งความเข้มข้นดังกล่าวเป็นจุดที่มีค่าความถูกต้องและความแม่นยำอยู่ในเกณฑ์ที่ยอมรับได้ คือค่าความถูกต้องรายงานในรูปแบบของ % Recovery อยู่ในช่วง 80-120% และ ความแม่นยำรายงานในรูปแบบของ %RSD ของผลวิเคราะห์ที่ทำซ้ำใน 1 วัน (Repeatability) และผลวิเคราะห์ที่ทำซ้ำต่างวัน (Intermediate precision) อยู่ในเกณฑ์ที่ยอมรับได้คือ ไม่เกิน 20%

6. Stability จากการศึกษาความคงตัวของ adenosine และ guanosine มีความคงตัวดีกว่า uric acid และ xanthine โดยที่ adenosine และ guanosine คงตัวที่อุณหภูมิห้องอย่างน้อย 72 ชั่วโมง ส่วนความคงตัวของสารละลายมาตรฐานทั้ง 2 ชนิดรวมทั้ง ความคงตัวของสารทั้งสองใน matrix ของตัวอย่าง ที่ -20°C พบว่าความเข้มข้นค่อนข้างคงที่เป็นเวลาอย่างน้อย 2 สัปดาห์ ในขณะที่ uric acid และ xanthine ไม่ค่อยคงตัวโดยพบว่า ความเข้มข้นลดลงมากกว่า 10% ภายใน 24 ชั่วโมงเมื่อตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง นอกจากนั้นยังพบว่าสารทั้งสองทั้งในรูปแบบของสารละลายมาตรฐานและในสารละลายของ matrix ของตัวอย่าง มีการสลายตัวมากกว่า 10% ที่อุณหภูมิ -20°C ดังนั้นการเตรียมสารละลายมาตรฐานของ uric acid และ xanthine จึงต้องเตรียมแล้วใช้ทันที (freshly prepared) ส่วนสารละลายมาตรฐานของ adenosine และ guanosine สามารถเตรียมและใช้ภายใน 2 สัปดาห์

3.3 การหาปริมาณพิวรีนและกรดยูริกในผักพื้นบ้าน

การตรวจสอบปริมาณสารพิวรีนและ uric acid ในตัวอย่างผักแต่ละชนิด จะใช้การเทียบปริมาณกับกราฟของสารมาตรฐานที่เตรียมโดยการเติมสารมาตรฐานลงในตัวอย่างผักนั้นๆ (matrix match calibration) เนื่องจาก matrix effect ของผักแต่ละชนิดแตกต่างกัน โดยตัวอย่างผักแต่ละชนิดที่นำมาเตรียมกราฟของสารมาตรฐาน จะใช้ตัวอย่างผักจากร้านค้า 3 ร้านเท่าๆกัน นำมารวมกัน การรายงานผลจะรายงานในหน่วย ng/g ของตัวอย่าง หากปริมาณที่ตรวจพบน้อยกว่าระดับ LLOQ จะรายงานว่า “พบน้อยกว่า LLOQ” ผักที่ทำการตรวจวิเคราะห์ในงานวิจัยนี้มีทั้งสิ้น 16 ชนิด ดังต่อไปนี้

ตัวอย่างผัก	ชื่อภาษาอังกฤษ	ชื่อวิทยาศาสตร์
1. ถั่วฝักยาว	Yardlong bean	<i>Vigna unguiculate subsp. Sesquipedalis</i>
2. แตงกวา	Cucumber	<i>Cucumis sativus</i> Linn.
3. ผักกาดขาว	Chinese cabbage	<i>Brassica pekinensis</i>
4. ถั่วงอก	Bean Sprouts	<i>Vigna radiate</i> (L.)
5. ผักบุ้งจีน	Morning glory	<i>Lpomcea aquatic</i> Forsk. Var. <i>reptan</i>
6. ถั่วพู	Winged bean	<i>Psophocarpus tetragonolobus</i>
7. ผักหวานป่า	Melientha suavis	<i>Melientha suavis</i> Pierre
8. ผักกะเฉด	Water minosa	<i>Neptunia oleracea</i> Lour.
9. ยอดกระถิน	White Popinac, Lead Tree	<i>Leucaena leucocephala</i> (Lam.)de Wit
10. ชะอม	Acacia pennata	<i>Acacia Insuavis</i> Lace
11. ตำลึง	Ivy Gourd	<i>Coccinia grandis</i> (L.) Voigt
12. ใบบัวบก	Asiatic Pennywort, Tiger Herbal	<i>Centella asiatica</i> Urban
13. ผักปลั่ง(ขาว)	Malabar Nightshade, Vinespinach	<i>Basella alba</i> Linn.
14. ผักพวย (ผักก้านจอง)	Yellow Velvet Leaf, Tummy-wood	<i>Limnocharis flava</i> Buch.
15. ผักแพว (ผักไผ่)	Vietnamese Coriander	<i>Polygonum odoratum</i>
16. มะเขือเปราะ	Thai Eggplant, Yellow berried nightshade	<i>Solanum xanthocarpum</i> Schrad. & Wendl.

สรุปปริมาณพิวรีนและ uric acid ในหน่วย มิลลิกรัมต่อน้ำหนักผัก 100 กรัม ได้ดังตารางต่อไปนี้

ตัวอย่างผัก	ปริมาณพิวรีนและ uric acid (มิลลิกรัมต่อ 100 กรัม)			
	Uric acid	Xanthine	Adenosine	Guanosine
ถั้วผักยาว	0.1-0.2	3.4-4.9	1.1-1.2	0.4-0.6
แตงกวา	ไม่พบ	ไม่พบ	0.1	0.1
ผักกาดขาว	ไม่พบ	< LLOQ	0.2-0.7	0.1-0.2
ถั้วอก	ไม่พบ	< LLOQ	0.8-2.7	0.4-0.9
ผักบุ้งจีน	0.2-0.5	ไม่พบ	3.3-5.0	0.2
ถั้วพู	< LLOQ	0.2	1.4-2.9	0.2-0.4
ผักหวานป่า	0.6-1.3	< LLOQ -0.2	1.1-2.6	0.8-1.8
ผักกะเจต	ไม่พบ	ไม่พบ	0.4-0.7	1.3-1.5
ยอดกระถิน	0.2-0.5	< LLOQ -0.1	0.1-0.3	1.6-6.2
ชะอม	ไม่พบ	0.0-0.8	0.1-0.2	1.8-3.5
ตำลึง	ไม่พบ	ไม่พบ-0.1	0.9-4.7	0.6-1.5
โบบัวบก	ไม่พบ	ไม่พบ	1.2-2.1	0.2-0.3
ผักปลัง(ขาว)	7.8-10.1	ไม่พบ-< LLOQ	0.6-1.2	0.2-0.4
ผักพาย (ผักก้านจอง)	7.8-10.1	ไม่พบ-0.2	1.2-2.0	0.6-0.7
ผักแพว (ผักไผ่)	ไม่พบ-< LLOQ	< LLOQ	0.1	0.1-0.2
มะเขือเปราะ	0.0-0.1	ไม่พบ	< LLOQ	0.4-0.5

ผลจากตารางจะเห็นว่าผักที่นำมาวิเคราะห์ทั้งหมดจัดเป็นประเภทอาหารที่พิวรีนต่ำ โดยที่อาหารที่มีพิวรีนสูง หมายถึงอาหารที่มีปริมาณพิวรีนมากกว่าหรือเท่ากับ 400 มิลลิกรัมต่อ 100 กรัม อาหารที่มีพิวรีนปานกลาง หมายถึงอาหารที่มีปริมาณพิวรีน 100 - 400 มิลลิกรัมต่อ 100 กรัม) และอาหารที่มีพิวรีนต่ำ หมายถึงอาหารที่มีปริมาณพิวรีนน้อยกว่าหรือเท่ากับ 100 มิลลิกรัมต่อ 100 กรัม

4 การนำผลงานวิจัยไปใช้ประโยชน์

4.1 ได้วิธีวิเคราะห์ปริมาณสารพิวรีนและกรดยูริกในผักพื้นบ้านที่มีความถูกต้อง แม่นยำ และมีความไวสูง

4.2 ทราบปริมาณพิวรีนและกรดยูริก ในผักพื้นบ้านที่คนไทยนิยมรับประทาน จำนวน 16 ชนิด ซึ่งเป็นข้อมูลที่จะนำไปเผยแพร่ และใช้แนะนำให้ผู้ป่วยโรคเกาต์ได้

5 การเผยแพร่ผลงานวิจัย

ชื่อเรื่อง : DEVELOPMENT OF HIGH-PERFORMANCE LIQUID CHROMATOGRAPHY MASS
SPECTROMETRY FOR DETERMINATION OF PURINES AND URIC ACID IN THAI
VEGETABLES

เผยแพร่ : งานประชุมวิชาการ Pure and Applied Chemistry International Conference 2015

วันที่ : 21-23 มกราคม 2558

บทที่ 1 บทนำ

ชนิดของอาหารที่บริโภคในแต่ละวันเป็นสิ่งสำคัญที่ส่งผลถึงสุขภาพ โดยเฉพาะอย่างยิ่งผู้ที่อยู่ในสภาวะโรคบางชนิดต้องมีการควบคุมการบริโภคอาหารที่อาจส่งผลไม่ดีต่อโรคหรืออาการที่เป็นอยู่ เช่นผู้ป่วยโรคเกาต์ (Gout) ที่ไม่ควรบริโภคอาหารที่มีกรดยูริกมากเกินไป เป็นต้น โรคเกาต์มีสาเหตุที่สำคัญจากขบวนการเมตาโบลิซึมที่ผิดปกติของสารพิวรีน (purines) ทำให้การสังเคราะห์กรดยูริก (Uric acid) มากส่งผลให้มีปริมาณกรดยูริกสูงในร่างกายและตกตะกอนตามข้อต่างๆ ทำให้เกิดอาการข้ออักเสบ ปวดบวมแดง ผู้ป่วยโรคเกาต์นอกจากการรับประทานยาต้านการอักเสบและยาลดกรดยูริกแล้ว จำเป็นต้องควบคุมชนิดของอาหารที่บริโภคประจำวันด้วย โดยไม่ควรรับประทานอาหารที่มีกรดยูริกสูง เช่น เครื่องใน เนื้อสัตว์บางชนิดเช่น เป็ด ไก่ เป็นต้น

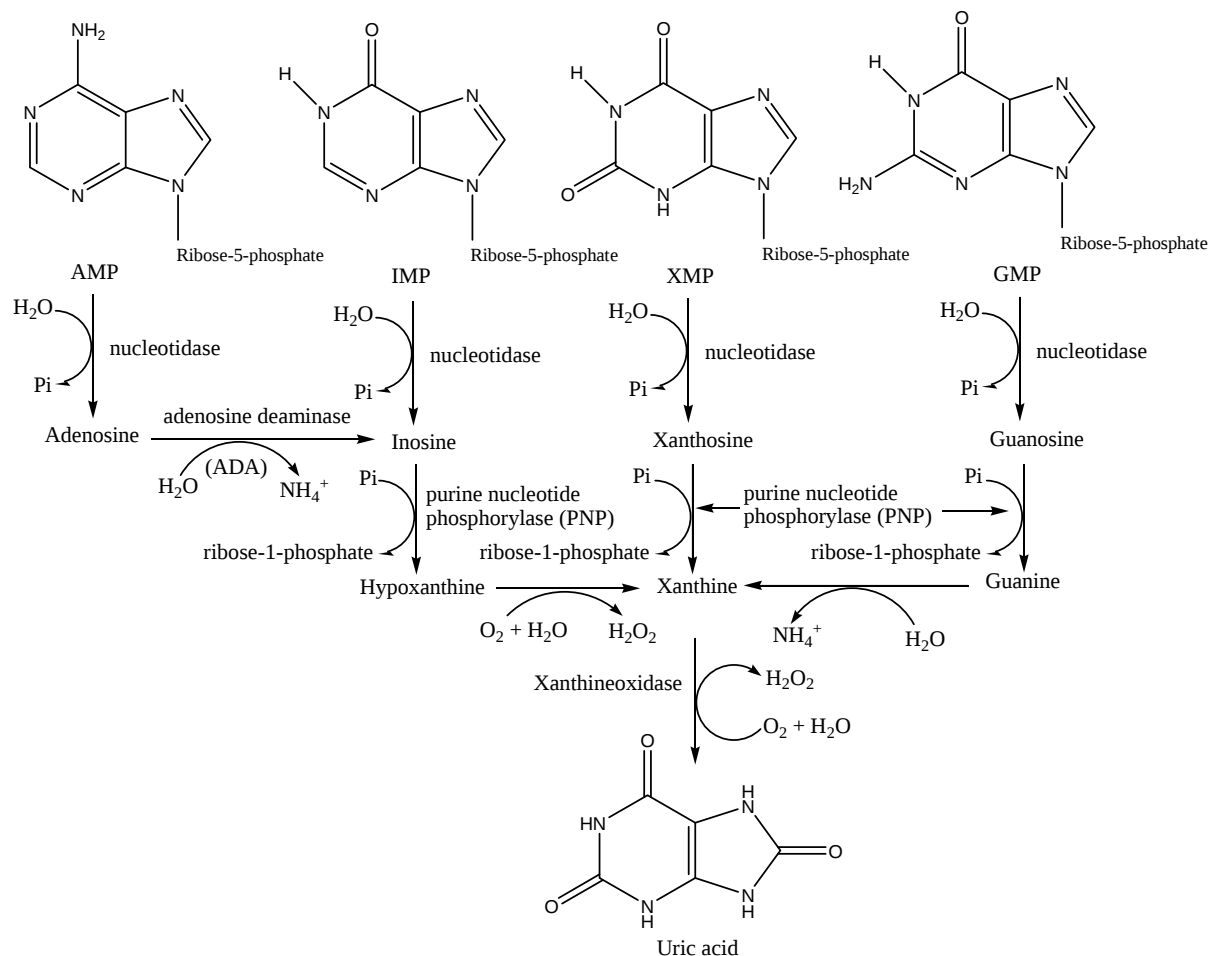
ผักพื้นบ้านชนิดต่างๆจัดเป็นอาหารที่คนไทยนิยม โดยเฉพาะส่วนที่เป็นยอดอ่อน ที่มีรายงานว่ามีสารพิวรีนมากและมีข้อเสนอให้จำกัดการบริโภคในผู้ป่วยโรคเกาต์ อย่างไรก็ตาม ปัจจุบันยังไม่มีการศึกษาที่ระบุปริมาณของกรดยูริกในผักพื้นบ้านชนิดต่างๆของไทยที่ชัดเจน ทำให้ผู้ป่วยไม่สามารถควบคุมการบริโภคที่เหมาะสมได้ งานวิจัยนี้จึงได้จัดทำขึ้นโดยมีวัตถุประสงค์เพื่อพัฒนาวิธีวิเคราะห์หาปริมาณกรดยูริกและพิวรีนซึ่งเป็นสารตั้งต้นของการสังเคราะห์กรดยูริก ในผักพื้นบ้านของไทย เพื่อใช้เป็นข้อมูลในการแนะนำผู้ป่วยโรคเกาต์

สารพิวรีนเป็นชื่อเรียกโดยรวมของ เบสพิวรีน นิวคลีโอไทด์ และนิวคลีโอไซด์ ทั้งนี้พิวรีนจะสามารถเปลี่ยนไปเป็นกรดยูริกได้โดยใช้เอนไซม์แซนทีน ออกซิเดส (xanthine oxidase) สารพิวรีนมีอยู่ในพืชผักหลายชนิด โดยเฉพาะอย่างยิ่งในส่วนที่เติบโตเร็วของพืช เช่น ส่วนยอดและเมล็ด ปัจจุบันมีรายงานและการทำวิจัยเรื่องการหาปริมาณของกรดยูริก และสารพิวรีนในพืชผักบางชนิด เช่น ผักกวางตุ้ง บรอกโคลี เห็ดญี่ปุ่น เป็นต้น แต่ยังไม่มียานงานที่ชัดเจนเกี่ยวกับปริมาณของสารพิวรีนและกรดยูริกในพืชผักพื้นบ้านชนิดต่างๆของไทย

บทที่ 2 ทบทวนวรรณกรรม

1. โรคเก๊าท์ (Gout disease)

โรคเก๊าท์เป็นโรคที่ไม่ติดต่อ มีสาเหตุจากการที่กรดยูริกไปตกผลึกในรูปของ monosodium urate แล้วไปสะสมที่เนื้อเยื่อในข้อกระดูก หรือเนื้อเยื่อรอบๆกระดูกทำให้เกิดการอักเสบ ปวด บวมแดงของข้อ หากมีอาการเรื้อรังเป็นเวลานาน จะทำให้รูปร่างกระดูกผิดปกติ^{1,2} กรดยูริก (uric acid) เป็นผลผลิตในขบวนการเมตาโบลิซึมของพิวรีนของเนื้อเยื่อในร่างกาย³ (รูปที่ 1)



รูปที่ 1 การสร้างกรดยูริกจากพิวรีน

หากมีความผิดปกติของขบวนการเมตาโบลิซึมของพิวรีน ที่ส่งผลให้ปริมาณของกรดยูริกสูงขึ้น จะทำให้เกิดภาวะ hyperuricemia ถ้าไม่สามารถลดระดับ hyperuricemia ลงได้จะทำให้เกิดอาการของเก๊าท์ชนิดเฉียบพลัน และในระยะเวลาที่นานขึ้นก็จะกลายเป็นเก๊าท์ชนิดเรื้อรัง^{1,4}

ภาวะ hyperuricemia หมายถึงการมีระดับกรดยูริกในรูปของ serum urate มากกว่า 0.45 mmol/L หรือ 7.0 mg/dL ในผู้ชาย และ 0.36 mmol/L หรือ 6.0 mg/L ในผู้หญิง ผู้ที่มีภาวะ hyperuricemia ทุกคนอาจ不会有อาการของโรคเก๊าท์ แต่ภาวะ hyperuricemia เป็นปัจจัยเสี่ยงสำคัญของการเกิดโรคเก๊าท์ ระดับของกรดยูริก และพิวรีนที่เป็นสารตั้งต้นของการสร้างกรดยูริกในร่างกายในผู้ป่วยเก๊าท์ และผู้ที่มีภาวะ hyperuricemia จะมีระดับสูงกว่าคนปกติอย่างมีนัยสำคัญ⁵

มีการศึกษาที่พบว่าโรคเก๊าท์มีความสัมพันธ์ต่อความผิดปกติของระบบอื่นๆในร่างกายด้วย เช่นระบบหัวใจและหลอดเลือด ระบบการทำงานของไต เป็นต้น และพบว่าผู้ป่วยเก๊าท์จำนวนมากที่เสียชีวิตจากอาการของหลอดเลือดหัวใจ¹

นอกจากนี้ยังมีการศึกษาที่ระบุว่าภาวะโภชนาการเช่นการบริโภคอาหารที่มีพิวรีนมาก เช่น เนื้อวัว อาหารทะเล การดื่มแอลกอฮอล์ หรือโรคความผิดปกติของเลือดบางอย่าง เป็นสาเหตุทำให้มีการสร้างกรดยูริกมากขึ้น^{4,6}

2. วิธีวิเคราะห์ปริมาณพิวรีนและกรดยูริก

รายงานการศึกษาเกี่ยวกับการหาปริมาณพิวรีนและกรดยูริกในตัวอย่างชนิดต่างๆมีดังต่อไปนี้

Kaneko และคณะ (2009)⁷ ทำการหาปริมาณ adenosine, guanosine, hypoxanthine และ xanthine ในตัวอย่างประเภทเครื่องดื่มแอลกอฮอล์ เพื่อเป็นข้อมูลสำหรับผู้ป่วยเก๊าท์ในประเทศญี่ปุ่น วิธีตรวจวิเคราะห์ที่ใช้คือ high-performance liquid chromatography (HPLC) ใช้เครื่องตรวจวัดชนิด UV ความยาวคลื่น 260 nm ใช้คอลัมน์ชนิด size exclusion ควบคุมอุณหภูมิที่ 35°C และใช้ 150 mM sodium phosphate buffer, pH 2.5 เป็น mobile phase

Kim และคณะ (2009)⁸ ทำการตรวจวัดปริมาณ uric acid ในตัวอย่าง human umbilical vein endothelial cells, plasma และ urine วิธีตรวจวิเคราะห์ที่ใช้คือ LC-MS/MS ชนิด triple-quadrupole และ electrospray ionization

Zhang และคณะ (2012)⁹ ทำการตรวจวัดปริมาณ hypoxanthine, xanthine และ uric acid ในตัวอย่าง urine โดยวิธี electrochemical ระบบ 3 ขั้วไฟฟ้า โดยใช้ reference electrode คือ saturated calomel, counter electrode เป็นลวด platinum และ working electrode ที่พัฒนาขึ้นใหม่คือ poly(L-arginine)/grapheme composite film modified electrode

Wang (2011)¹⁰ ทำการตรวจวัดปริมาณ hypoxanthine, xanthine และ uric acid ในตัวอย่าง urine โดยวิธี electrochemical ระบบ 3 ขั้วไฟฟ้า โดยใช้ reference electrode คือ saturated calomel, counter electrode เป็นแผ่น platinum และ working electrode ที่พัฒนาขึ้นใหม่คือ poly(pyrocatechol violet)/functionalized multi-walled carbon nanotubes composite film modified electrode

Revin และ John (2012)¹¹ ทำการตรวจวัดปริมาณ Inosine ที่มี hypoxanthine และ uric acid ในตัวอย่าง human blood และ urine โดยวิธี electrochemical ระบบ 3 ขั้วไฟฟ้า โดยใช้ reference

electrode คือ Ag/AgCl, counter electrode เป็นลวด platinum และ working electrode ที่พัฒนาขึ้นใหม่คือ 3-amino-5-mercapto-1,2,4-triazole modified glassy carbon electrode

Wang และ Tong (2010)¹² ทำการตรวจวัดปริมาณ xanthine, hypoxanthine และ uric acid ในตัวอย่าง human serum โดยวิธี electrochemical ระบบ 3 ขั้วไฟฟ้า โดยใช้ reference electrode คือ saturated calomel, counter electrode เป็นแผ่น platinum และ working electrode ที่พัฒนาขึ้นใหม่คือ poly(bromocresol purple) modified glassy carbon electrode

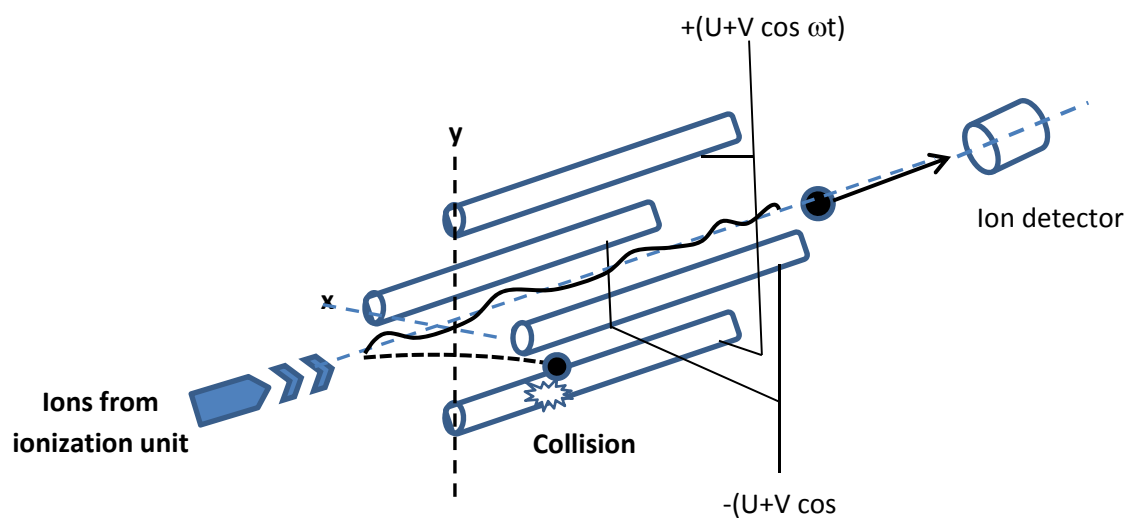
Yang และคณะ (2012)¹³ ทำการหาปริมาณ adenine, guanine, hypoxanthine, xanthine และ uric acid ในเนื้อวัว วิธีตรวจวิเคราะห์ที่ใช้คือ high-performance liquid chromatography (HPLC) ใช้เครื่องตรวจวัดชนิด UV ความยาวคลื่น 254 nm ใช้คอลัมน์ชนิด reversed-phase C18 ควบคุมอุณหภูมิที่ 25°C และใช้ potassium phosphate buffer, pH 4.0 เป็น mobile phase

3. เทคนิคการวิเคราะห์แบบลิควิดโครมาโตกราฟีแมสสเปกโตรเมตรี (LC-MS)

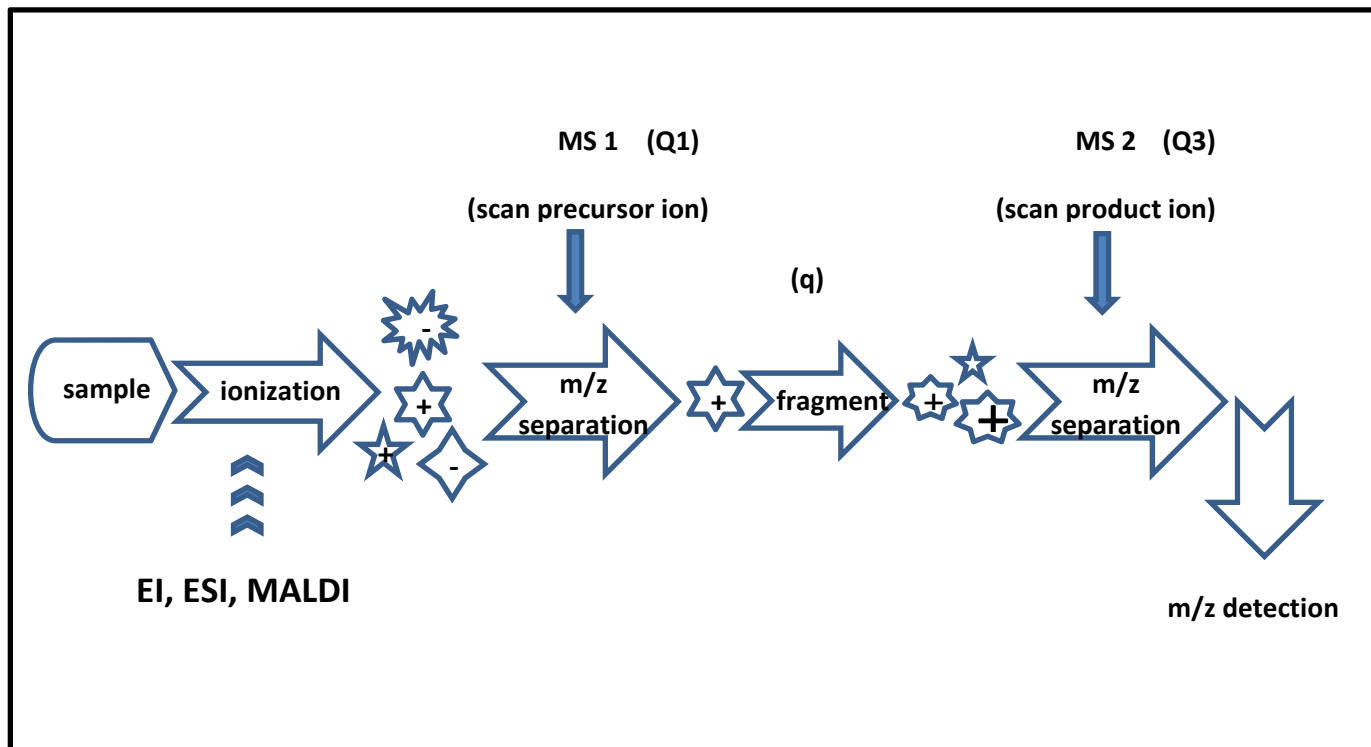
LC-MS เป็นวิธีการโครมาโตกราฟีของเหลวที่อาศัยการแยกของสารผสมในคอลัมน์ที่บรรจุด้วยวัฏภาคหนึ่ง (stationary phase) ที่เป็นของแข็งและผ่านวัฏภาคเคลื่อนที่ (mobile phase) ที่เป็นของเหลวเข้าไปภายในอย่างต่อเนื่อง สารต่างๆที่อยู่ในสารผสมจะแยกออกจากกันโดยอาศัยความแตกต่างในการชอบจับระหว่างสารแต่ละชนิดกับวัฏภาคหนึ่ง สารชนิดใดจับกับวัฏภาคหนึ่งได้ดี นั่นคือสารที่มีสภาพขั้ว (polarity) คล้ายกับวัฏภาคหนึ่ง จะเคลื่อนที่ผ่านออกมาจากคอลัมน์ช้ากว่าสารที่จับกับวัฏภาคหนึ่งได้น้อยหรือสารที่มีสภาพขั้วต่างจากวัฏภาคหนึ่ง สารแต่ละชนิดที่ถูกแยกออกมาจะถูกเปลี่ยนให้กลายเป็นไอออนที่บริเวณเชื่อมต่อ (Interface) ระหว่างเครื่อง LC และเครื่องตรวจวัดมวล (Mass spectrometer, mass detector, MS) สารแต่ละชนิดในรูปไอออนจะถูกวัดค่ามวลต่อประจุ (m/z) ภายในเครื่อง MS

สำหรับ Mass detector ที่นิยมใช้ปัจจุบันมีหลายชนิดเช่น quadrupole mass analyzer, ion-trap mass analyzer, time-of-flight mass analyzer¹⁴ แต่ที่ใช้ในการศึกษานี้มี 2 ชนิดคือ quadrupole และ ion-trap

Quadrupole 1 ชุดประกอบด้วยแท่ง (rod) 4 แท่ง มีการให้ไฟฟ้ากระแสตรง (DC) และกระแสสลับ (RF) เข้าไป การวิเคราะห์มวลของไอออนที่จำเพาะค่าใดค่าหนึ่งทำได้โดยการปรับกระแสไฟฟ้าให้เหมาะสม ทำให้เฉพาะไอออนที่มีมวลต่อประจุค่าใดค่าหนึ่งเท่านั้นที่จะผ่านออกมาถึง ion detector ได้ ส่วนไอออนอื่นๆไม่สามารถผ่านออกมาได้

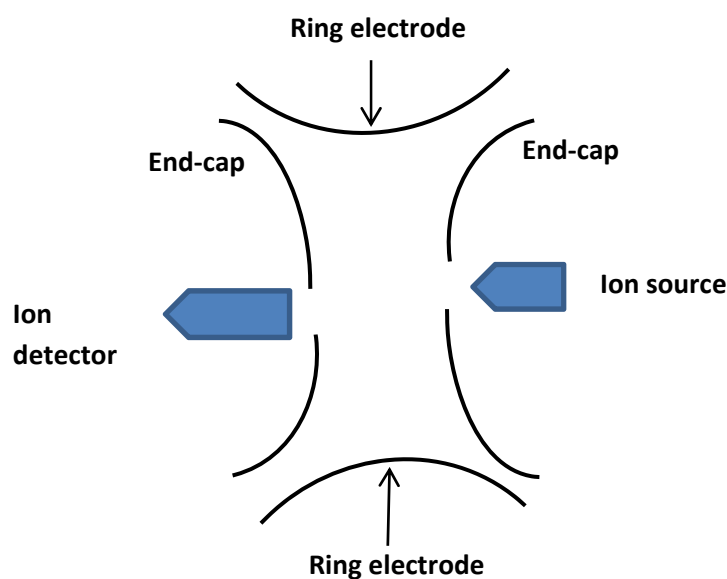


รูปที่ 2 Single quadrupole mass analyzer



รูปที่ 3 triple-quadrupoles mass analyzer

Ion trap mass filter ประกอบด้วย 3 อิเล็กโทรดคือ ring electrode 1 ชั้นและ endcap electrodes 2 ชั้น มีการให้ศักย์ไฟฟ้าเข้าไปที่อิเล็กโทรด ทำให้เกิดเป็นสนามไฟฟ้าขึ้นภายใน แบบ 3 มิติ ในการเลือก mass หรือ molecular weight ที่ต้องการทำได้โดยการปรับสนามไฟฟ้าให้เหมาะสมที่ทำให้ ion mass ที่ต้องการมีการเคลื่อนที่อย่าง stable ภายในโดยไม่ชนกับ electrodes หรือกล่าวได้ว่าเฉพาะ ion ที่ต้องการจะถูกจับหรือถูก trap ไว้ภายใน ก่อนที่จะถูกปล่อยไปที่ ion detector



รูปที่ 4 Ion-trap mass analyzer

ข้อมูลที่ได้จากเครื่อง LC-MS/MS มีหลายประเภทขึ้นกับ mode การวิเคราะห์ที่เลือกดังนี้

Full scan analysis ข้อมูลที่ได้จะเป็น Total ion current plot (TIC) ลักษณะกราฟ TIC จะคล้ายกับกราฟหรือ chromatogram ที่ได้จากเครื่อง HPLC-UV โดย chromatogram TIC จะพลอตระหว่าง intensity (แกน y) และเวลา (แกน x) โดยทั่วไป full scan analysis มักจะถูกกำหนดให้ทำการ scan อีออนในช่วงมวลต่อประจุช่วงใดช่วงหนึ่งเช่น m/z 100- m/z 500 chromatogram ที่ปรากฏแต่ละจุดเวลาเป็นผลรวมของมวลของทุกอีออนที่ออกมาที่เวลาเดียวกัน จึงมีประโยชน์น้อยในการแยกสารที่มีมวลเท่ากัน หรืออีออนที่มีมวลค่าใดค่าหนึ่งที่สนใจ ค่ามวลของทุกๆสารต่อ 1 ครั้งการ scan

Selected ion monitoring (SIM) กราฟ SIM จะพลอตระหว่าง intensity (แกน y) และเวลา (แกน x) เช่นกันแต่จะกำหนดช่วงมวลให้แคบลงหรือเจาะจงเฉพาะมวลของอีออนที่ต้องการวิเคราะห์

เพียง 1 ค่า ดังนั้นกราฟที่ได้อาจจะแปรผลได้ง่ายขึ้นแต่กรณีที่มีไอออนที่มีมวลเท่ากันและมีค่า retention time เดียวกันก็ไม่สามารถแยกความแตกต่างได้

Selected reaction monitoring (SRM) หรือ multiple reaction monitoring (MRM) เป็น mode ที่ใช้ตรวจสอบมวลของไอออนที่แตกออกมา (fragment ion, transition ion) จากไอออนตั้งต้น (parent ion) ตัวใดตัวหนึ่ง SRM จะสามารถแยกความแตกต่างของสารที่มีมวลหรือ parent ion เท่ากันได้เนื่องจาก fragment ion ที่แตกออกมาจะเป็นชิ้นส่วนที่จำเพาะของไอออนแต่ละชนิด mode SRM อาจปรากฏพีคเพียงแคพีคเดียวที่เกิดจากมวลของ fragment ion ที่เลือก จึงมีประโยชน์มากในการวิเคราะห์ปริมาณ

บทที่ 3

วัตถุประสงค์

โครงการวิจัยการพัฒนาวิธีวิเคราะห์เพื่อหาปริมาณพิวรีนและกรดยูริกในผักพื้นบ้านไทย มีวัตถุประสงค์การวิจัยดังนี้

1. เพื่อพัฒนาวิธีการวิเคราะห์ LC/MS ที่มีประสิทธิภาพสำหรับการหาปริมาณพิวรีนและกรดยูริกในพืชผักพื้นบ้าน
2. เพื่อหาปริมาณของพิวรีนและกรดยูริกในพืชผักพื้นบ้านอย่างน้อย 15 ชนิด เพื่อใช้เป็นข้อมูลการบริโภคสำหรับผู้ป่วยโรคเกาต์

บทที่ 4

สารเคมีและวิธีดำเนินการวิจัย

วิธีดำเนินการวิจัยแบ่งเป็น 6 ส่วนคือ

4.1 สารเคมีและอุปกรณ์

4.2 การพัฒนาวิธีไฮเพอร์ฟอร์มานลิควิดโครมาโตกราฟีเพื่อหาปริมาณพิวรีนและกรดยูริก

4.3 การพัฒนาวิธีลิควิดโครมาโตกราฟีแมสสเปคโตรเมตรีชนิด ion-trap เพื่อหาปริมาณพิวรีนและกรดยูริก

4.4 การพัฒนาวิธีลิควิดโครมาโตกราฟีแมสสเปคโตรเมตรีชนิด triple-quadrupole เพื่อหาปริมาณพิวรีนและกรดยูริก

4.5 การตรวจสอบเพื่อยืนยันความใช้ได้ของวิธี (method validation)

4.6 การตรวจวิเคราะห์ปริมาณพิวรีนและกรดยูริกในตัวอย่างผักพื้นบ้าน

รายละเอียดของแต่ละส่วนมีดังต่อไปนี้

4.1 สารเคมี เครื่องมือและอุปกรณ์

4.1.1 สารเคมี

Name	Grade	Source/Supplier
Acetonitrile	HPLC	Burdick and Jackson Korea
Ammonium hydroxide	Analytical	Sigma-Aldrich, USA
Ammonium acetate	Analytical	Sigma-Aldrich, USA
Adenosine	Analytical	Sigma-Aldrich, USA
Caffeine	Analytical	Sigma-Aldrich, USA
Deionized water	Sterile water for injection	V&V Bangkok, Co. Ltd., Thailand
Dextrometorphane HBr	Analytical	Sigma-Aldrich, USA
Formic acid	Analytical	Sigma-Aldrich, Germany
Guanosine	Analytical	Sigma-Aldrich, Slovakia
Hypoxanthine	Analytical	Sigma-Aldrich, China
Methanol	HPLC	Burdick and Jackson Korea
Uric acid	Analytical	Sigma-Aldrich, Hungary

4.1.2 เครื่องมือและอุปกรณ์

Name	Source/Supplier
Analytical balance	Shimadzu, Japan
High performance liquid chromatography (LC-10AD)	Shimadzu, Japan
HPLC column (Chromolith [®] C18, 4.6×100 mm)	Merck, Germany
HPLC column (Symmetry [®] C18, 4.6×150 mm, 5µm)	Sigma-Aldrich, USA
(Ascentis [®] Express C18, 2.1×100 mm, i.d. 2.7 µm) HPLC guard column	Sigma-Aldrich, USA
LCQ Fleet	Thermo
Mass spectrometry (LC-MS 8030)	Shimadzu, Japan
Micropipette	Trefflab, Germany
Nylon membrane filter (47 mm, 0.2 µm)	Filtrex, Thailand
Nylon syringe filter (13 mm, 0.22 µm)	National scientific, USA
Sorvall RC5 plus super speed centrifuge	N.Y.R. Co., Ltd., USA
Ultra high performance liquid chromatography (LC-30AD)	Shimadzu, Japan
Ultrasonic bath	D.S.C. group, Thailand
Vortex mixer (VTX-3000L)	Uzusio, Japan

4.2 การพัฒนาวิธีไฮเพอร์ฟอร์แมนลิดิตโครมาโตกราฟีเพื่อหาปริมาณพิวรีนและกรดยูริก

เครื่องมือวิธีไฮเพอร์ฟอร์แมนลิดิตโครมาโตกราฟี (HPLC) ที่ใช้คือ Shimadzu รุ่น LC-10AD ต่อกับเครื่องตรวจวัดชนิด UV รุ่น SPD-10A ทำการพัฒนาวิธีวิเคราะห์โดยศึกษาผลของชนิดและความเข้มข้นของตัวทำละลายอินทรีย์ที่เป็นส่วนประกอบใน mobile phase ศึกษาชนิดของ mobile phase buffer และ pH ที่เหมาะสม ค่าความยาวคลื่นของเครื่องตรวจวัดใช้ที่ 284nm ตลอดการศึกษา

4.2.1 การเตรียมสารละลายมาตรฐานความเข้มข้น 100 µg/mL

สารละลายมาตรฐานความเข้มข้น 100 µg/mL ของ adenine, guanosine, xanthine, hypoxanthine และ uric acid เตรียมแยกกันโดยการชั่งสารมาตรฐานอย่างถูกต้อง ละลายด้วย 10 mM ammonium hydroxide ให้ได้ความเข้มข้นที่ต้องการ

4.2.2 การเตรียม 10 mM ammonium acetate buffer

10 mM ammonium acetate buffer เตรียมโดยการชั่งผง ammonium acetate 770.8 mg ละลายใน deionized water 1000 mL ปรับ pH ที่ต้องการด้วย glacial acetic acid

4.2.3 การพัฒนาวิธีวิเคราะห์

การพัฒนาวิธีวิเคราะห์ใช้ column ชนิด chromolith C18 (4.6 × 100 mm) และ mobile phase ที่ใช้เป็นส่วนผสมของ 10 mM ammonium acetate buffer โดยศึกษาระหว่าง pH 4.5 และ 2.5 และตัวทำละลายอินทรีย์โดยศึกษาระหว่าง acetonitrile และ methanol ความเข้มข้นของตัวทำละลายอินทรีย์ที่ศึกษาคือ 3-40% โดยปริมาตร

4.3 การพัฒนาวิธีลิกนิตโครมาโตกราฟีแมสสเปกโตรเมตรีชนิด ion-trap เพื่อหาปริมาณพิวรีนและกรดยูริก

เครื่องมือที่ใช้ในการศึกษาคือ ion-trap mass spectrometry รุ่น Thermo LCQ Fleet ระบบ ionization แบบ electrospray ทำการปรับเครื่องมือและพลังงานที่ใช้ในการแตกมวลที่เหมาะสมสำหรับสารแต่ละชนิดที่ใช้ในการศึกษา เพื่อให้สารแต่ละชนิดแตกตัวให้ transition ions ที่เสถียร

4.3.1 การพัฒนาวิธีวิเคราะห์

การพัฒนาวิธีในเบื้องต้นได้ใช้สภาวะ mobile phase ที่เหมาะสมสำหรับวิธี HPLC-UV ในช่วงแรกมาปรับใช้ และปรับสภาวะของเครื่อง mass analyzer โดยใช้สารมาตรฐานแต่ละชนิดที่ความเข้มข้น 1000 µg/mL ตรวจสอบสภาวะ ionization ที่เหมาะสมกับสารแต่ละชนิดคือ positive ionization และ negative ionization พลังงานที่ใช้ในการแตกมวล (collision induced dissociation, CID) ทำการศึกษาในช่วง 20-45 eV เพื่อให้ได้ transition ions ที่เสถียรอย่างน้อย 2 ions สำหรับสารแต่ละชนิด transition ion ที่ 1 ใช้ในการหาปริมาณ transition ion ที่ 2 ใช้ในการยืนยันชนิดของสาร ค่าพารามิเตอร์ของเครื่อง mass analyzer มีดังต่อไปนี้

Spray voltage	5.00 kV
Capillary temperature	350 °C
Capillary voltage	26.0 V
Tube lens	70.0 V

ต่อมาได้เปลี่ยน mobile phase จาก 10 mM ammonium acetate buffer มาเป็น 0.2% formic acid in deionized water เพื่อลด background ของ mass analyzer การชะล้างสารให้อัตราการไหลของ mobile phase 0.3 mL/min และระบบ gradient ดังนี้

Time	% solvent A (0.2% formic acid in DI water)	% solvent B (0.1% formic in methanol)
0.00	98.0	2.0
8.00	98.0	2.0
8.10	10.0	90.0
13.00	10.0	90.0
13.10	98.0	2.0
15.00	98.0	2.0

4.4 การพัฒนาวิธีลิกวิตโครมาโตกราฟีแมสสเปคโตรเมตรีชนิด triple-quadrupole เพื่อหาปริมาณพิวรีนและกรดยูริก

4.4.1 การเตรียม 10 mM ammonium hydroxide

10 mM ammonium hydroxide เตรียมโดยการเจือจาง 25% ammonium hydroxide จำนวน 14 mL ด้วย deionized water ปรับปริมาตรให้เป็น 100 mL จะได้ ammonium hydroxide ความเข้มข้น 1 M เจือจางสารละลายนี้อีก 100 เท่าด้วย deionized water จะได้ ammonium hydroxide ความเข้มข้น 10 mM

4.4.2 การเตรียมสารละลายมาตรฐานความเข้มข้น 100 µg/mL

สารละลายมาตรฐานความเข้มข้น 100 µg/mL ของ adenine, guanosine, xanthine และ uric acid เตรียมแยกกันโดยการชั่งสารมาตรฐานอย่างถูกต้อง ละลายด้วย 10 mM ammonium hydroxide ให้ได้ความเข้มข้นที่ต้องการ

4.4.3 สารละลายมาตรฐานผสม

สารละลายมาตรฐานผสมระหว่าง adenosine และ guanosine แต่ละสารมีความเข้มข้น 10 µg/mL เตรียมโดยการปิเปตสารละลายมาตรฐานความเข้มข้น 100 µg/mL ของ adenine, guanosine อย่างละ 5.0 mL ใส่ volumetric flask ขนาด 50 mL เจือจางด้วย 10 mM ammonium hydroxide จนครบปริมาตร ส่วนสารละลายมาตรฐานผสมระหว่าง xanthine และ uric acid แต่ละสารมีความเข้มข้น 20 µg/mL เตรียมโดยการปิเปตสารละลายมาตรฐานความเข้มข้น 100 µg/mL ของ adenine, guanosine อย่างละ 10.0 mL ใส่ volumetric flask ขนาด 50 mL เจือจางด้วย 10 mM ammonium hydroxide จนครบปริมาตร

4.4.4 การเตรียมสารละลายมาตรฐานภายใน ความเข้มข้น 10 µg/mL

สารมาตรฐานภายใน (internal standard) ที่ใช้คือ caffeine เตรียมโดยการชั่งสารมาตรฐาน caffeine ละลายและเจือจางด้วย 10 mM ammonium hydroxide จนได้ความเข้มข้น 10 µg/mL

4.4.5 การพัฒนาวิธีวิเคราะห์

เครื่องมือ LC-MS/MS ที่ใช้ในการพัฒนาวิธีวิเคราะห์คือ Ultra-high performance liquid chromatography (UPLC) รุ่น LC-30AD Nexera (Shimadzu, Japan) มีอุปกรณ์ประกอบด้วย CBM-20A controller, LC-30AD binary pump, DGU-20A 5R degasser, SIL 30-AC autosampler และ column oven รุ่น CTO-30A การแยกสารทั้งหมดใช้ column Ascentis Express[®] C18 (2.1 × 100 mm, 2.7µm) และใช้ guard column Ascentis Express[®] C18-guard column (2.1 × 5 mm, 2.7µm) ตั้งอุณหภูมิของ column ที่ 40°C ตลอดการใช้งาน การแยกสารใช้ระบบ gradient ใช้ mobile phase 2 ชนิดคือ mobile phase A (0.2% formic acid in deionized water) และ mobile phase B (0.1% formic acid in methanol) อัตราการไหลของ mobile phase เป็น 0.2 mL/min สภาวะของ gradient ที่ใช้มีดังต่อไปนี้

Time (min)	% Mobile phase A	% Mobile phase B
0.50	98.0	2.0
1.50	98.0	2.0
3.10	10.0	90.0
4.00	10.0	90.0
5.50	98.0	2.0
8.50	98.0	2.0

เครื่องตรวจวัดสารคือ triple quadrupole mass spectrometer รุ่น LCMS-8030 (Shimadzu, Japan) ระบบ ionization แบบ electrospray การปรับเครื่องมือใช้สารละลายของสารมาตรฐานความเข้มข้น 1000 µg/mL โดยเตรียมแยกแต่ละชนิด ใช้การวัดแบบ full scan และ multiple reaction monitoring (MRM) ปรับพลังงานในการแตกมวลเพื่อให้ได้ transition ions ที่เสถียรอย่างน้อย 2 ions สำหรับแต่ละสาร transition ions ตัวหนึ่งใช้ในการหาปริมาณ อีก transition ion หนึ่งใช้เพื่อยืนยันชนิดของสาร ระบบของเครื่องตั้งตามสภาวะต่อไปนี้

Nebulizing gas N ₂ flow	3.0 L/min
Drying gas N ₂ flow	12.0 L/min
Temperature	350°C
Heat block temperature	500°C

การตรวจวัดปริมาณใช้ค่าอัตราส่วนของพื้นที่ใต้พีคของ transition ion ต่อพื้นที่ใต้พีคของสารมาตรฐานภายใน (peak area ratio)

4.5 การตรวจสอบเพื่อยืนยันความใช้ได้ของวิธี (method validation)

การตรวจสอบเพื่อยืนยันความใช้ได้ของวิธี (method validation) จะใช้หัวหอมใหญ่เป็นตัวอย่าง blank เนื่องจากมีรายงานว่า หัวหอมใหญ่มีปริมาณกรดยูริกต่ำ¹⁵ เกณฑ์มาตรฐานหรือ guideline ที่ใช้ในการศึกษา method validation คือเกณฑ์ของ The United States Food and Drug Administration (USFDA)¹⁶ ซึ่งพารามิเตอร์ที่แนะนำว่าควรตรวจสอบคือ linearity, recovery, accuracy, precision, matrix effect, stability และ lower limit of quantitation (LLOQ)

4.5.1 Accuracy และ precision

ใช้ตัวอย่างควบคุมคุณภาพ (quality control sample) ที่ 4 ระดับความเข้มข้น คือ 100-2000 ng/mL สำหรับ uric acid และ xanthine และในช่วงความเข้มข้น 10-1000 ng/mL สำหรับ adenosine และ guanosine ในการศึกษา accuracy และ precision การเตรียม quality control sample (QCS) ทำดังนี้

1. เตรียม stock standard solution ความเข้มข้น 100 µg/mL โดยการชั่งสารมาตรฐาน uric acid, xanthine, adenosine และ guanosine ให้มีน้ำหนักถูกต้อง ละลายและปรับปริมาตรด้วย ละลายและปรับปริมาตรด้วย 10 mM ammonium hydroxide ให้ได้ความเข้มข้น 100 µg/mL
2. เจือจาง stock standard solution ความเข้มข้น 100 µg/mL ให้ได้ความเข้มข้นของ uric acid และ xanthine เป็น 20 µg/mL ส่วน adenosine และ guanosine เจือจางเป็น 10 µg/mL ด้วย 10 mM ammonium hydroxide
3. เตรียม caffeine ความเข้มข้น 10 µg/mL เพื่อใช้เป็น internal standard โดยการชั่งสารมาตรฐาน caffeine ละลายและเจือจางด้วย 10 mM ammonium hydroxide ให้ได้ความเข้มข้น 10 µg/mL
4. ชั่งตัวอย่าง blank (หัวหอมใหญ่) ประมาณ 20 กรัม นำมาปั่นให้ละเอียดกับ 10 mM ammonium hydroxide 200 มิลลิลิตร เป็นเวลา 5 นาที
5. ชั่ง ตัวอย่าง blank (หัวหอมใหญ่) ที่ปั่นละเอียด ใส่ centrifuge tube จำนวน 5 หลอด โดยแต่ละ หลอดมีน้ำหนักเท่ากับ 10.5676 กรัม (น้ำหนักตัวอย่าง blank 1 กรัม + น้ำหนัก 10 mM ammonium hydroxide 10 มิลลิลิตร)
6. นำ centrifuge tube แต่ละหลอด มาเติมสารต่างๆ ดังตาราง

ตารางการเตรียมตัวอย่างเพื่อศึกษา Accuracy และ precision

Sample	Concentrations of uric acid and xanthine (ng/mL)	Concentrations of adenosine and guanosine (ng/mL)	mL of uric acid + xanthine 20 µg/mL	mL of adenosine + guanosine 10 µg/mL	mL of caffeine, 10 µg/mL	mL of 10 mM HN ₄ OH
QCS 0	0	0	-	-	1.00	9.00
QCS 1	100	10	2.00	2.00	1.00	5.00
QCS 2	200	50	0.50	0.60	1.00	7.90
QCS 3	500	300	0.20	0.10	1.00	8.70
QCS 4	2000	1000	0.10	0.02	1.00	8.88

ทำทั้งหมด 3 ซ้ำใน 1 วัน แล้วคำนวณค่า accuracy ในรูปของ % recovery และ ความแม่นยำของการวิเคราะห์ (repeatability) ในรูปของ % RSD ของผลวิเคราะห์

$$\% \text{ Recovery} = (\text{found conc} / \text{nominal conc}) \times 100$$

$$\% \text{ RSD} = (\text{SD} / \text{Average}) \times 100$$

เกณฑ์การยอมรับ : % Recovery = 85-115% (ที่จุด LLOQ = 80-120%)

% RSD ≤ 15% (ที่จุด LLOQ ≤ 20%)

4.5.2 Recovery และ matrix effect

1. การเตรียมตัวอย่าง blank

วิธีเตรียมตัวอย่าง blank ทำการหั่นย่อยหัวหอมใหญ่เป็นชิ้นเล็กแล้วชั่งตัวอย่าง 20 กรัม เติม 10 mM ammonium hydroxide ลงไป 200 mL ปั่นให้ละเอียดด้วยเครื่องบดผสมอาหาร นำตัวอย่างที่ปั่นละเอียดแล้วมา centrifuge ที่ความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที แยกส่วนใส (sample filtrate) ออกมา

2. เตรียม stock standard solution ความเข้มข้น 100 µg/mL โดยการชั่งสารมาตรฐาน uric acid, xanthine, adenosine และ guanosine ให้มีน้ำหนักถูกต้อง ละลายและปรับปริมาตรด้วย ละลายและปรับปริมาตรด้วย 10 mM ammonium hydroxide ให้ได้ความเข้มข้น 100 µg/mL เจือจาง stock standard solution ความเข้มข้น 100 µg/mL ให้ได้ความเข้มข้นของ uric acid และ xanthine เป็น 20 µg/mL ส่วน adenosine และ guanosine เจือจางเป็น 10 µg/mL ด้วย 10 mM ammonium hydroxide

3. เตรียมสารละลายของสารมาตรฐานภายใน (internal standard) โดยการชั่งสารมาตรฐาน caffeine ละลายและเจือจางด้วย 10 mM ammonium hydroxide ให้ได้ความเข้มข้น 10 µg/mL

4. เตรียมสารละลายมาตรฐานรวม ในช่วงความเข้มข้น 10-1000 ng/mL สำหรับ adenosine และ guanosine และ 100-2000 ng/mL สำหรับ uric acid และ xanthine โดยผสมสารต่างๆเข้าด้วยกันตามตารางดังนี้

ตารางการเตรียมสารมาตรฐานรวมเพื่อศึกษา Recovery และ matrix effect

Solution number	mL of uric acid + xanthine 20 µg/mL	mL of adenosine + guanosine 10 µg/mL	mL of caffeine 10 µg/mL	mL of 10 mM NH ₄ OH
1	-	-	1.00	9.00
2	2.00	2.00	1.00	5.00
3	1.50	1.50	1.00	6.00
4	1.00	1.00	1.00	7.00
5	0.75	0.80	1.00	7.45
6	0.50	0.60	1.00	7.90
7	0.40	0.40	1.00	8.20
8	0.30	0.20	1.00	8.50
9	0.20	0.10	1.00	8.70
10	0.10	0.02	1.0	8.88

ผสมสารละลายทั้งหมดให้เข้ากันโดยใช้ vortex mixer 10 วินาที นำไปกรองผ่าน nylon membrane ขนาด 0.2 µm ก่อนฉีดเข้าเครื่อง LC-MS/MS

5. การเตรียมสารละลายมาตรฐานรวม ในช่วงความเข้มข้น 10-1000 ng/mL สำหรับ adenosine และ guanosine และ 100-2000 ng/mL สำหรับ uric acid และ xanthine และมีตัวอย่าง blank ผสมอยู่ โดยผสมสารต่างๆเข้าด้วยกันตามตารางดังนี้

การเตรียมสารมาตรฐานรวมที่มี filtrate ของตัวอย่าง blank เพื่อศึกษา Recovery และ matrix effect

Solution number	mL of uric acid + xanthine 20 $\mu\text{g/mL}$	mL of adenosine + guanosine 10 $\mu\text{g/mL}$	mL of caffeine 10 $\mu\text{g/mL}$	mL of filtrate	mL of 10 mM NH_4OH
1	-	-	1.00	10.00	9.00
2	2.00	2.00	1.00	10.00	5.00
3	1.50	1.50	1.00	10.00	6.00
4	1.00	1.00	1.00	10.00	7.00
5	0.75	0.80	1.00	10.00	7.45
6	0.50	0.60	1.00	10.00	7.90
7	0.40	0.40	1.00	10.00	8.20
8	0.30	0.20	1.00	10.00	8.50
9	0.20	0.10	1.00	10.00	8.70
10	0.10	0.02	1.00	10.00	8.88

6. การเตรียมตัวอย่างที่เติมสารละลายมาตรฐานรวม ในช่วง ความเข้มข้น 10-1000 ng/mL สำหรับ adenosine และ guanosine และ 100-2000 ng/mL สำหรับ uric acid และ xanthine (ใช้สำหรับการศึกษา recovery ของการเตรียมตัวอย่าง)

ซึ่งตัวอย่าง blank (หัวหอมใหญ่) ประมาณ 20 กรัม นำมาปั่นให้ละเอียดกับ 10 mM ammonium hydroxide 200 มิลลิลิตร เป็นเวลา 5 นาที จากนั้นซึ่ง blank sample (หัวหอมใหญ่) ที่ปั่นละเอียด ใส่ centrifuge tube จำนวน 10 หลอด โดยแต่ละ หลอดมีน้ำหนักเท่ากับ 10.5676 กรัม (น้ำหนักตัวอย่าง blank 1 กรัม + น้ำหนัก 10 mM ammonium hydroxide 10 มิลลิลิตร)

ตารางการเตรียมตัวอย่างที่เติมสารมาตรฐานเพื่อศึกษา Recovery ของการเตรียมตัวอย่าง

Solution number	mL of uric acid + xanthine 20 µg/mL	mL of adenosine + guanosine 10 µg/mL	mL of caffeine(internal standard) 10 µg/mL	mL of 10 mM NH ₄ OH
1	-	-	1.000	9.000
2	2.000	2.000	1.000	5.000
3	1.500	1.500	1.000	6.000
4	1.000	1.000	1.000	7.000
5	0.750	0.800	1.000	7.450
6	0.500	0.600	1.000	7.900
7	0.400	0.400	1.000	8.200
8	0.300	0.200	1.000	8.500
9	0.200	0.100	1.000	8.700
10	0.100	0.020	1.000	8.880

นำสารละลายทั้งหมดไป centrifuge ที่ความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที นำส่วนใสไปกรองผ่าน nylon membrane ขนาด 0.2 µm ก่อนฉีดเข้าเครื่อง LC-MS

7. การศึกษา recovery ทำโดยการ plot กราฟระหว่าง สารมาตรฐานรวม ที่เติม filtrate ของตัวอย่าง blank ลงไป (แกน x) และ ตัวอย่าง blank ที่ปั่นละเอียด แล้วเติมสารมาตรฐานลงไป ผสมให้เข้ากัน นำไป centrifuge ความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที นำส่วนใสมากรองผ่าน membrane ขนาด 0.2 µm ก่อนนำไปวิเคราะห์ (แกน y) คำนวณสมการเส้นตรงโดยวิธี least square regression แล้วนำค่า slope มาคำนวณค่า recovery % จากสมการ

$$\text{Recovery (\%)} = \text{slope} \times 100$$

8. การศึกษา matrix effect ทำโดย การ plot กราฟระหว่าง สารมาตรฐานรวม (แกน x) และ สารมาตรฐานรวม ที่เติม filtrate ของตัวอย่าง blank ลงไป (แกน y) คำนวณสมการเส้นตรงโดยวิธี least square regression แล้วนำค่า slope มาคำนวณ matrix effect (ion suppression หรือ ion enhancement) จากสมการ

$$\text{Matrix effect (\%)} = (1 - \text{slope}) \times 100$$

การแปลผล:

ค่า slope น้อยกว่า 1 หรือ matrix effect เป็นบวก แปลว่ามี ion suppression

ค่า slope มากกว่า 1 หรือ matrix effect เป็นลบ แปลว่ามี ion enhancement

4.5.3 Linearity และ lower limit of quantitation (LLOQ)

เตรียมตัวอย่างที่เติมสารละลายมาตรฐานรวม ตามวิธีการในข้อ 6 ของการศึกษา recovery และ matrix effect นำค่า peak area ของแต่ละสารในตัวอย่าง blank (หลอดที่ 1) ลบออกจาก peak area ของสารแต่ละชนิดในหลอดที่ 2-10 จากนั้นคำนวณค่า area ratio ของสารกับ internal standard แล้วนำไป plot กราฟระหว่างความเข้มข้นของสาร (แกน x) และ area ratio (แกน y) โดย plot แยกกันสำหรับสารแต่ละชนิด

เกณฑ์การยอมรับ

linearity: ค่า $r \geq 0.99$ และค่าเบี่ยงเบนของผลวิเคราะห์ไม่เกิน 15 % ตลอดช่วง ยกเว้นจุด LLOQ

ค่า LLOQ : ความเข้มข้นต่ำสุดที่มีค่าเบี่ยงเบนของผลวิเคราะห์ไม่เกิน 20%

4.5.4 Stability

ในงานวิจัยนี้มีการศึกษาความคงตัวของสารมาตรฐานและสารตัวอย่าง ดังต่อไปนี้

1. ความคงตัวของสารตัวอย่างที่เติมสารมาตรฐานลงไป 3 ระดับความเข้มข้นคือ ต่ำ กลาง สูง โดยเตรียมสารตัวอย่างที่เติมสารมาตรฐานลงไป 3 ระดับความเข้มข้น นำไปแช่ไว้ในตู้แช่แข็ง อุณหภูมิ -20°C ทำการศึกษาความคงตัว 3 รอบการละลาย แต่ละรอบห่างกัน 1 สัปดาห์
2. ความคงตัวของสารมาตรฐานที่อุณหภูมิ -20°C
3. ความคงตัวของสารมาตรฐานที่อุณหภูมิห้อง

4.6 การตรวจวิเคราะห์ปริมาณพิวรีนและกรดยูริกในตัวอย่างผักพื้นบ้าน

การตรวจวิเคราะห์ปริมาณสารพิวรีนและ uric acid ในตัวอย่างผักแต่ละชนิด จะใช้การเทียบปริมาณกับกราฟของสารมาตรฐานที่เตรียมโดยการเติมสารมาตรฐานลงในตัวอย่างผักนั้นๆ (matrix match calibration) เนื่องจาก matrix effect ของผักแต่ละชนิดแตกต่างกัน โดยตัวอย่างผักแต่ละชนิดที่นำมาเตรียมกราฟของสารมาตรฐาน จะใช้ตัวอย่างผักจากร้านค้า 3 ร้านเท่าๆกันนำมารวมกัน การรายงานผลจะรายงานในหน่วย ng/g ของตัวอย่าง หากปริมาณที่ตรวจพบน้อยกว่าระดับ LLOQ จะรายงานว่า “พบน้อยกว่า LLOQ” ผักที่ทำการตรวจวิเคราะห์ในงานวิจัยนี้มีทั้งสิ้น 16 ชนิด ดังต่อไปนี้

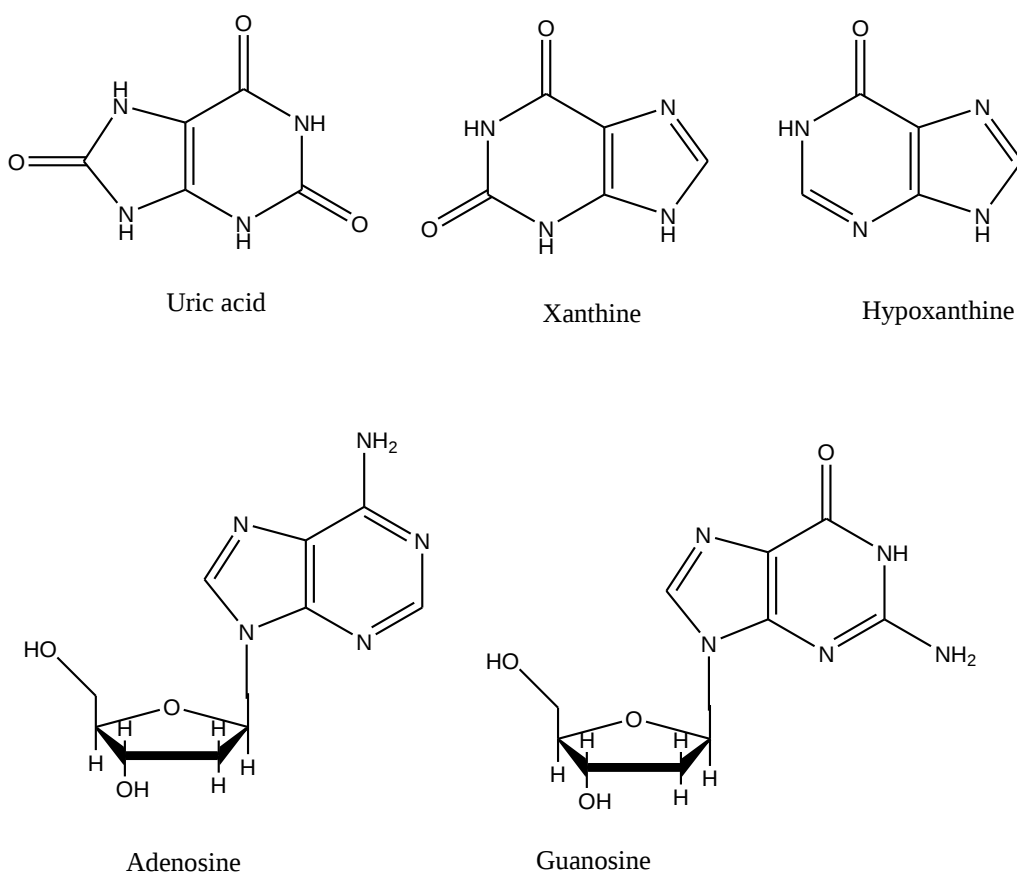
ตัวอย่างผัก	ชื่อภาษาอังกฤษ	ชื่อวิทยาศาสตร์
1. ถั่วฝักยาว	Yardlong bean	<i>Vigna unguiculate subsp. Sesquipedalis</i>
2. แตงกวา	Cucumber	<i>Cucumis sativus Linn.</i>
3. ผักกาดขาว	Chinese cabbage	<i>Brassica pekinensis</i>
4. ถั่วงอก	Bean Sprouts	<i>Vigna radiate (L.)</i>
5. ผักบุ้งจีน	Morning glory	<i>Lpomcea aquatic Forsk. Var. reptan</i>
6. ถั่วพู	Winged bean	<i>Psophocarpus tetragonolobus</i>
7. ผักหวานป่า	Melientha suavis	<i>Melientha suavis Pierre</i>
8. ผักกะเจต	Water minosa	<i>Neptunia oleracea Lour.</i>
9. ยอดกระถิน	White Popinac, Lead Tree	<i>Leucaena leucocephala (Lam.)de Wit</i>
10. ชะอม	Acacia pennata	<i>Acacia Insuavis Lace</i>
11. ตำลึง	Ivy Gourd	<i>Coccinia grandis (L.) Voigt</i>
12. ใบบัวบก	Asiatic Pennywort, Tiger Herbal	<i>Centella asiatica Urban</i>
13. ผักปลั่ง(ขาว)	Malabar Nightshade, Vinespinach	<i>Basella alba Linn.</i>
14. ผักพาย (ผักก้านจอง)	Yellow Velvet Leaf, Tummy-wood	<i>Limnocharis flava Buch.</i>
15. ผักแพว (ผักไผ่)	Vietnamese Coriander	<i>Polygonum odoratum</i>
16. มะเขือเปราะ	Thai Eggplant, Yellow berried nightshade	<i>Solanum xanthocarpum Schrad. & Wendl.</i>

บทที่ 5

ผลการวิจัยและอภิปราย

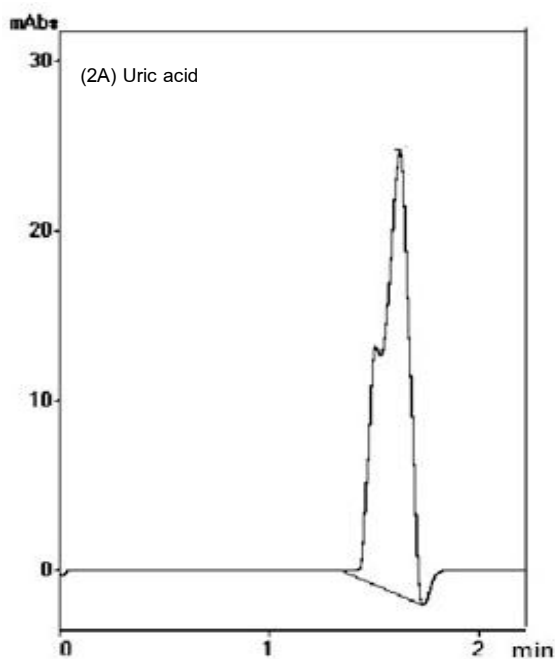
5.1 การพัฒนาวิธีไฮเพอร์ฟอร์แมนลิดิตโครมาโตกราฟีเพื่อหาปริมาณพิวรีนและกรดยูริก

การพัฒนาวิธีไฮเพอร์ฟอร์แมนลิดิตโครมาโตกราฟี (High-performance liquid chromatography, HPLC) เพื่อวิเคราะห์ปริมาณ พิวรีน (adenosine, guanosine) แซนทีน (xanthine) ไฮโปแซนทีน (hypoxanthine) และกรดยูริก (รูปที่ 1) ใช้คอลัมน์ Chromolith C18 และตรวจวัดสารทุกตัวด้วย UV detector ที่ความยาวคลื่น 284 นาโนเมตร mobile phase ใช้ส่วนผสมของ 10 mM ammonium acetate buffer, pH 4.5 ± 0.1 และ acetonitrile โดยปรับอัตราส่วนของ acetonitrile เป็น 5% และ 40% อัตราส่วนโดยปริมาตร ใช้ อัตราการไหล 0.5 มิลลิลิตรต่อนาที ระบบการชะล้างสารเป็นแบบ isocratic



รูปที่ 1 โครงสร้างของกรดยูริกและสารพิวรีนที่ทำการศึกษา

จากการใช้ระบบ mobile phase ดังกล่าว พบว่าสารทุกตัวมีค่า retention time ไม่แตกต่างกันมากในแต่ละอัตราส่วนของ acetonitrile (รูปที่ 2A-2J) แสดงว่า pH ของ mobile phase อาจจะไม่เหมาะสมและสารทุกตัวถูกจับไม่ดีภายในคอลัมน์ ต่อมาทำการเปลี่ยน pH ของ mobile phase ต่ำลงเป็น $\text{pH } 2.5 \pm 0.1$ และใช้ความเข้มข้นของ acetonitrile เป็น 5% อัตราส่วนโดยปริมาตร ระบบการชะล้างสารเป็นแบบ isocratic พบว่าสารแต่ละตัวถูกจับไว้ภายในคอลัมน์ดีขึ้นและเริ่มมีค่า retention time แตกต่างกัน (รูปที่ 3A-3F) แต่เมื่อนำรูปโครมาโตแกรมทั้งหมดมาซ้อนทับกันยังพบว่าการแยกของแต่ละสารยังไม่สามารถแยกจากกันได้ดีนัก (รูปที่ 3F) จึงทำการเปลี่ยนชนิดของตัวทำละลายอินทรีย์ใน mobile phase จาก acetonitrile เป็น methanol โดยใช้ความเข้มข้น 5% อัตราส่วนโดยปริมาตรเท่าเดิมพบว่า retention time ของสารแต่ละชนิดนานขึ้นและรูปโครมาโตแกรมที่ซ้อนทับมีการแยกที่ดีขึ้น แต่ กรดยูริก และ ไฮโปแซนทีน ยังแยกกันไม่ดี (รูปที่ 4) จึงลดอัตราส่วนของ methanol เป็น 3% อัตราส่วนโดยปริมาตรพบว่าการแยกของแต่ละสารดีขึ้น (รูปที่ 5)



HPLC condition

LC system: Shimadzu model LC-10AD

Column: Chromolith C18, 4.6 x 100 mm

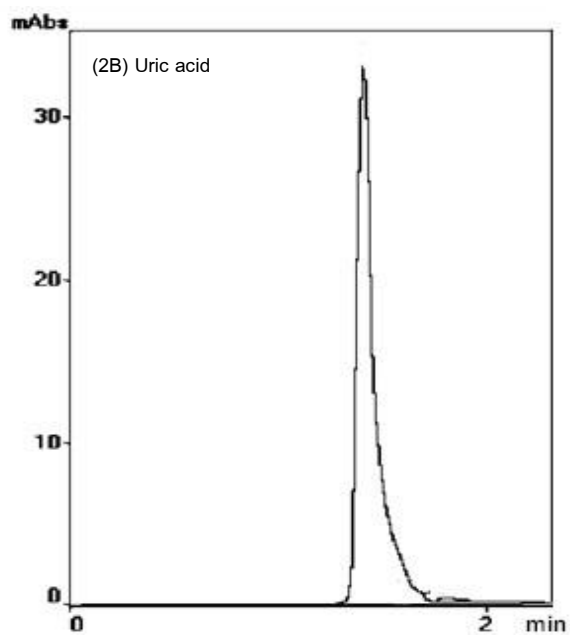
Flow rate: 0.50 mL/min

Mobile phase : 10 mM ammonium

acetate buffer pH, 4.5 :

acetonitrile 95:5 (%v/v)

Injection volume: 20uL



HPLC condition

LC system: Shimadzu model LC-10AD

Column: Chromolith C18, 4.6 x 100 mm

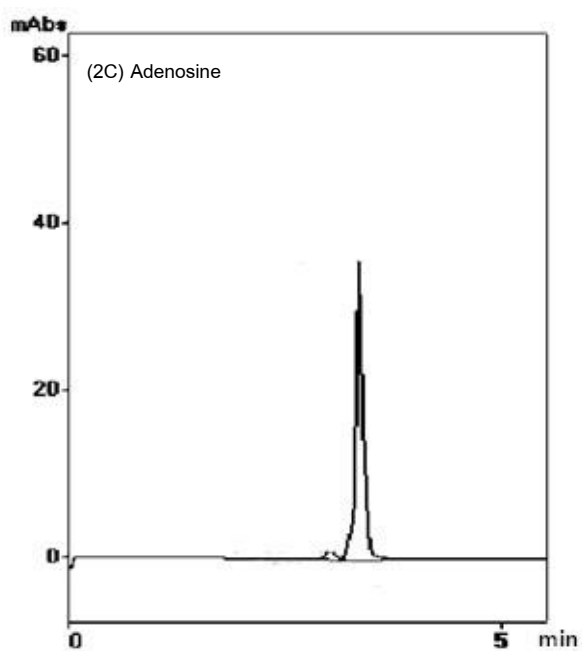
Flow rate: 0.50 mL/min

Mobile phase : 10 mM ammonium acetate

buffer pH, 4.5 : acetonitrile

60:40 (%v/v)

Injection volume: 20uL



HPLC condition

LC system: Shimadzu model LC-10AD

Column: Chromolith C18, 4.6 x 100 mm

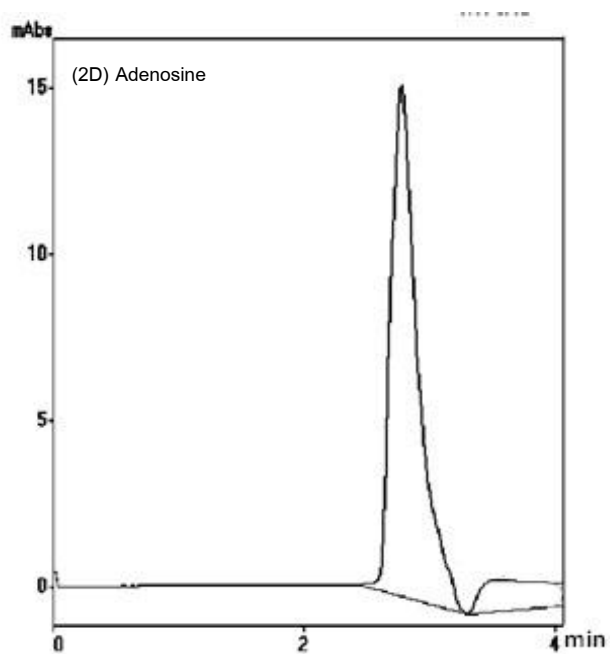
Flow rate: 0.50 mL/min

Mobile phase : 10 mM ammonium

acetate buffer pH, 4.5 :

acetonitrile 95:5 (%v/v)

Injection volume: 20uL



HPLC condition

LC system: Shimadzu model LC-10AD

Column: Chromolith C18, 4.6 x 100 mm

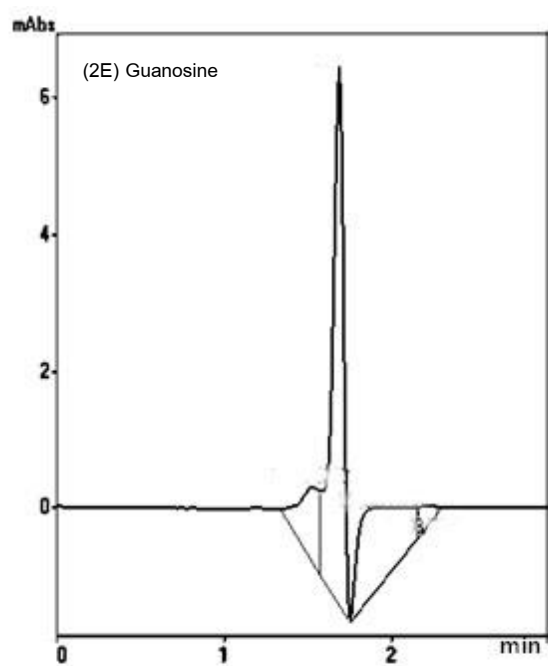
Flow rate: 0.50 mL/min

Mobile phase : 10 mM ammonium acetate

buffer pH, 4.5 : acetonitrile

60:40 (%v/v)

Injection volume: 20uL



HPLC condition

LC system: Shimadzu model LC-10AD

Column: Chromolith C18, 4.6 x 100 mm

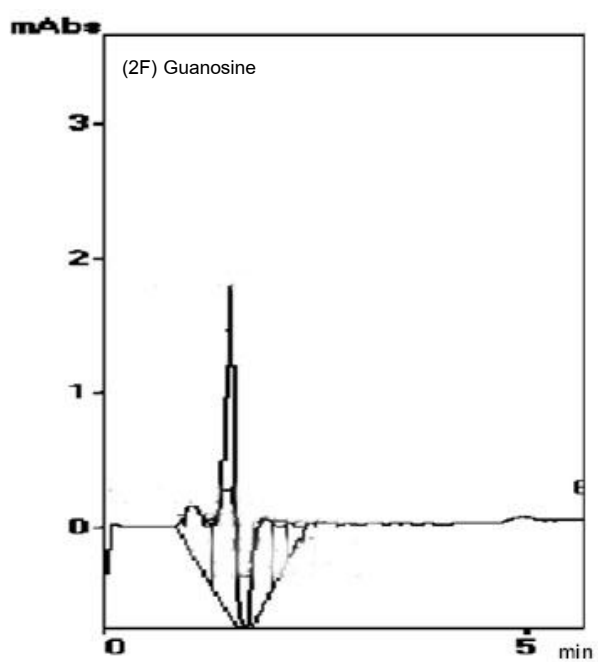
Flow rate: 0.50 mL/min

Mobile phase : 10 mM ammonium

acetate buffer pH, 4.5 :

acetonitrile 95:5 (%v/v)

Injection volume: 20uL



HPLC condition

LC system: Shimadzu model LC-10AD

Column: Chromolith C18, 4.6 x 100 mm

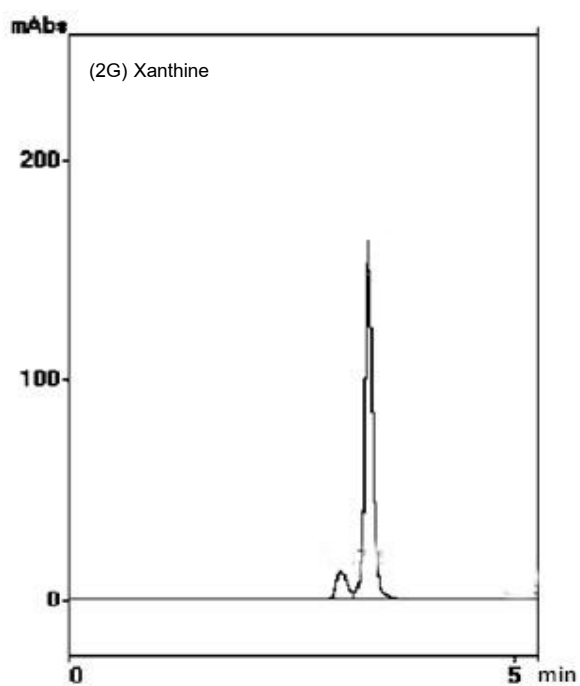
Flow rate: 0.50 mL/min

Mobile phase : 10 mM ammonium

acetate buffer pH, 4.5 :

acetonitrile 60:40 (%v/v)

Injection volume: 20uL



HPLC condition

LC system: Shimadzu model LC-10AD

Column: Chromolith C18, 4.6 x 100 mm

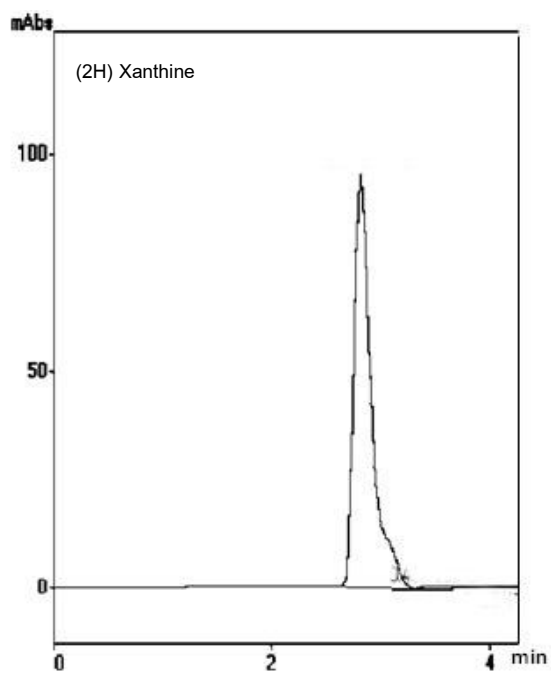
Flow rate: 0.50 mL/min

Mobile phase : 10 mM ammonium

acetate buffer pH, 4.5 :

acetonitrile 95:5 (%v/v)

Injection volume: 20uL



HPLC condition

LC system: Shimadzu model LC-10AD

Column: Chromolith C18, 4.6 x 100 mm

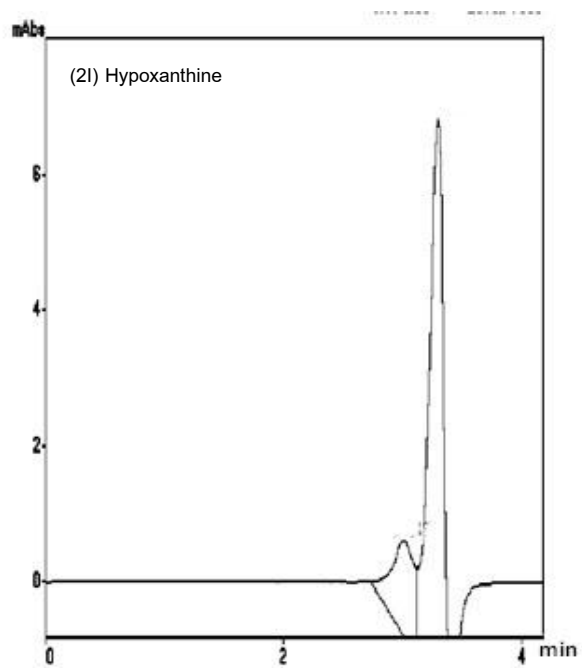
Flow rate: 0.50 mL/min

Mobile phase : 10 mM ammonium

acetate buffer pH, 4.5 :

acetonitrile 60:40 (%v/v)

Injection volume: 20uL



HPLC condition

LC system: Shimadzu model LC-10AD

Column: Chromolith C18, 4.6 x 100 mm

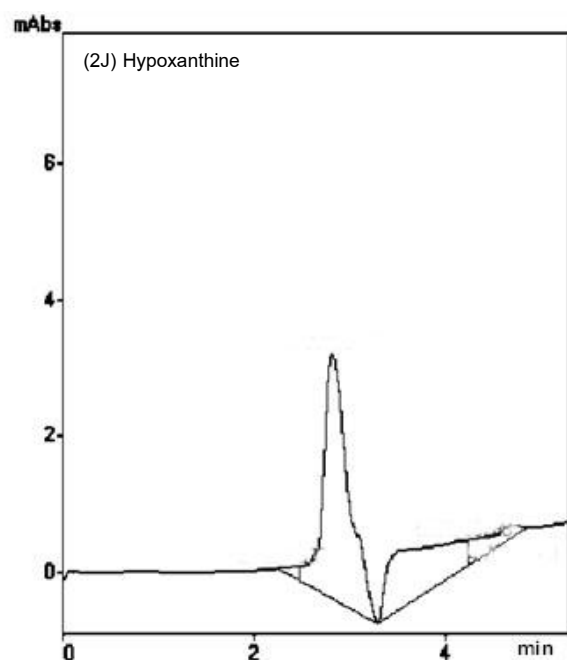
Flow rate: 0.50 mL/min

Mobile phase : 10 mM ammonium

acetate buffer pH, 4.5 :

acetonitrile 95:5 (%v/v)

Injection volume: 20uL



HPLC condition

LC system: Shimadzu model LC-10AD

Column: Chromolith C18, 4.6 x 100 mm

Flow rate: 0.50 mL/min

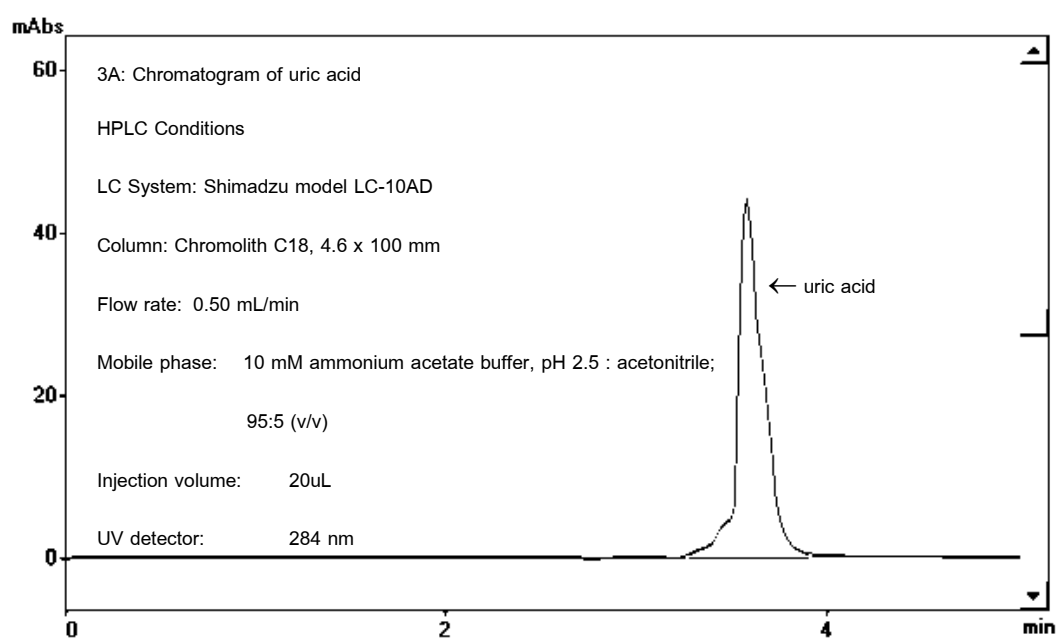
Mobile phase : 10 mM ammonium

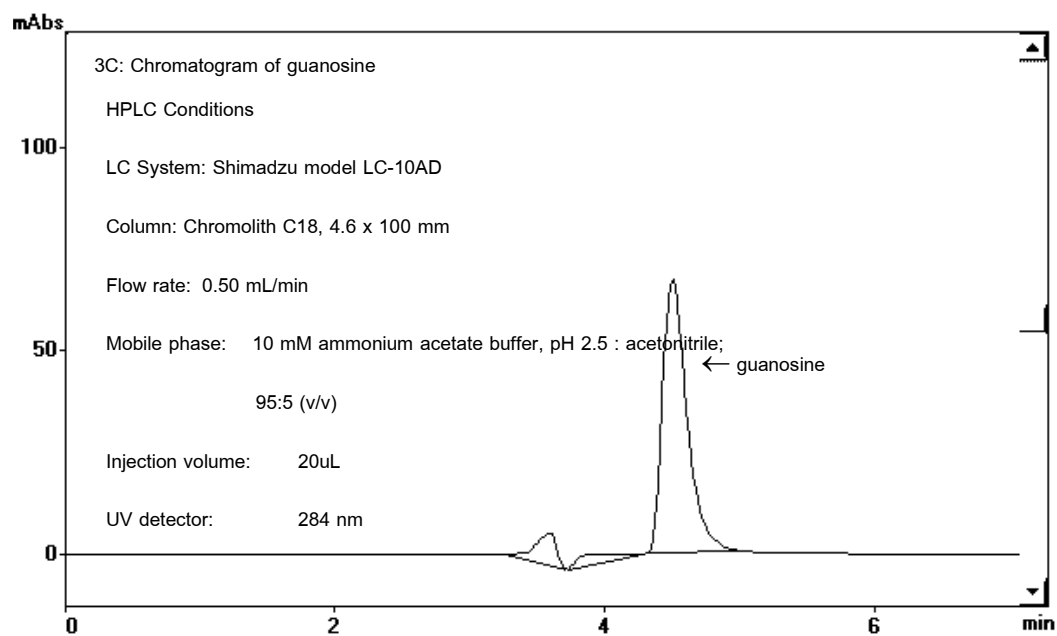
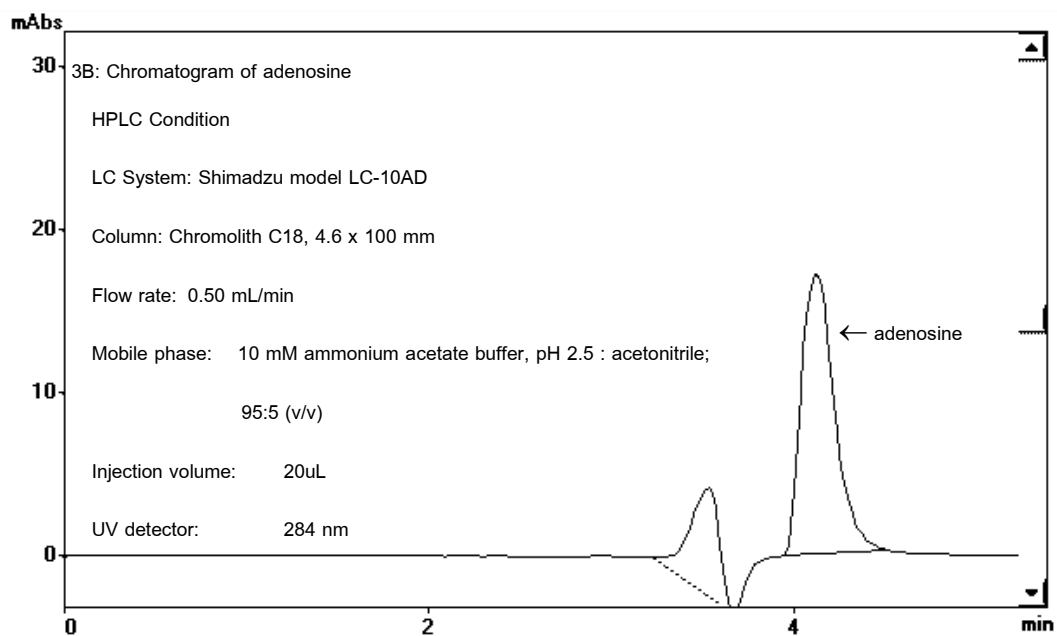
acetate buffer pH, 4.5 :

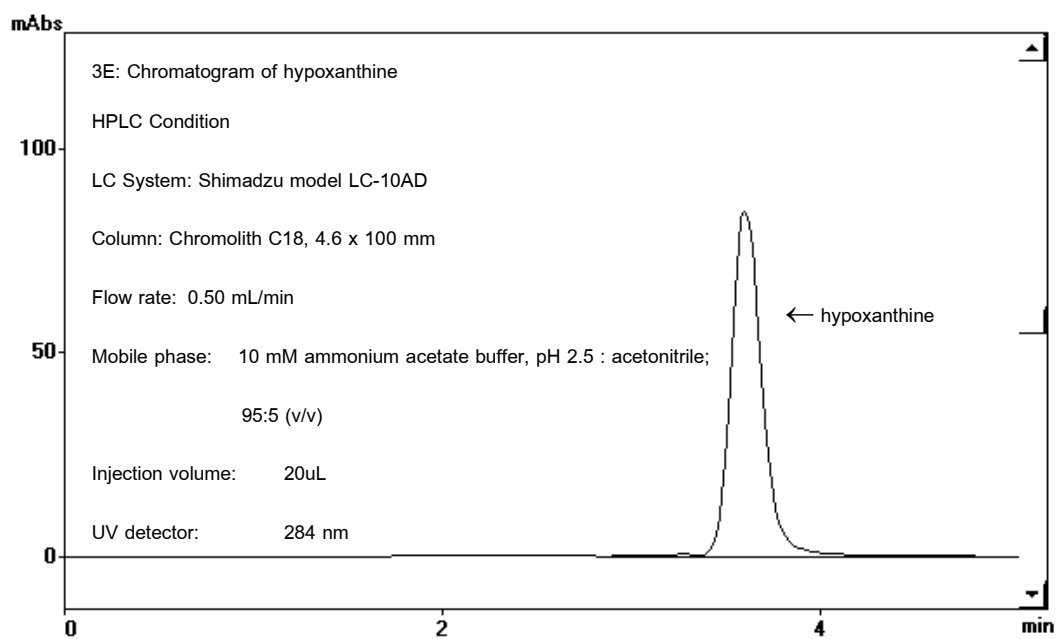
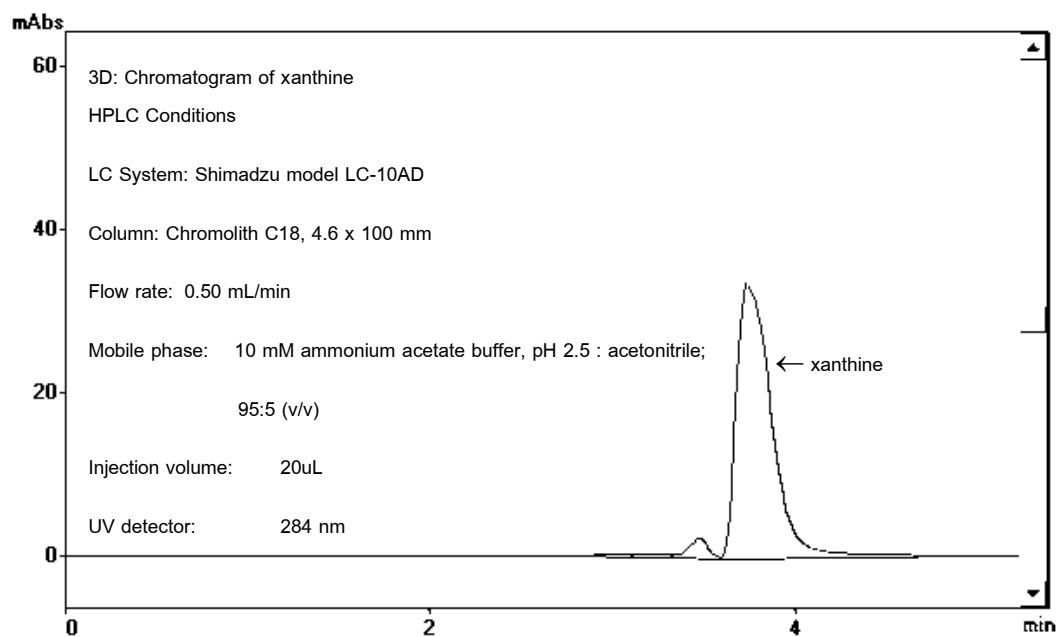
acetonitrile 60:40 (%v/v)

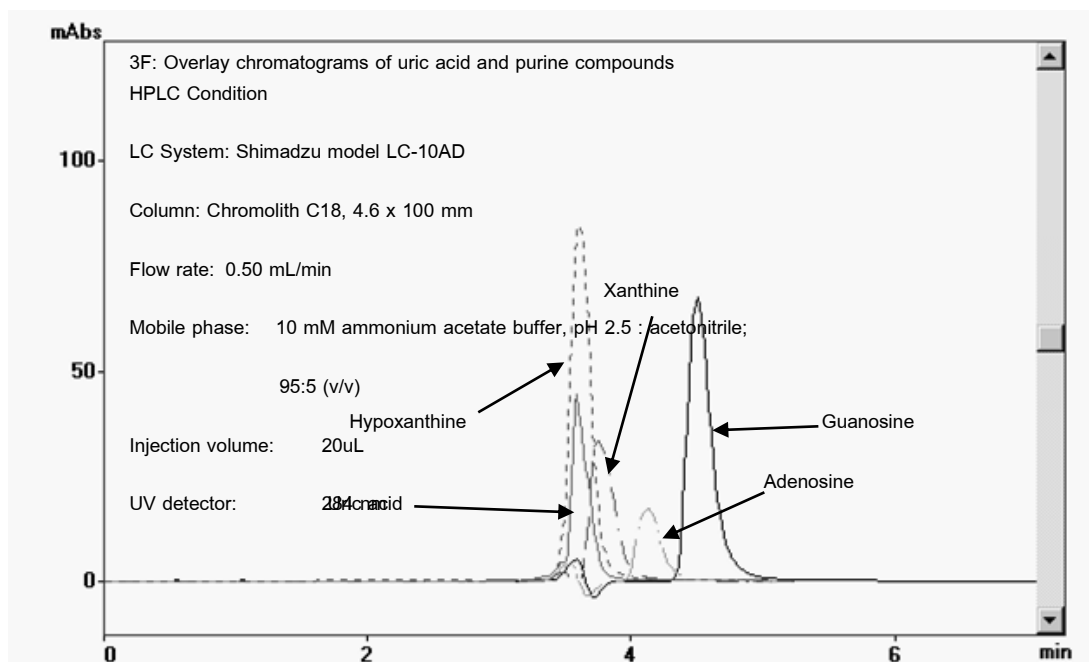
Injection volume: 20uL

รูปที่ 2 (A-J) Chromatograms ของกรดยูริกและสารพิวรีนใน mobile phase 10 mM ammonium acetate, pH 4.5 และ acetonitrile, 95:5 และ 60:40 อัตราส่วนโดยปริมาตร



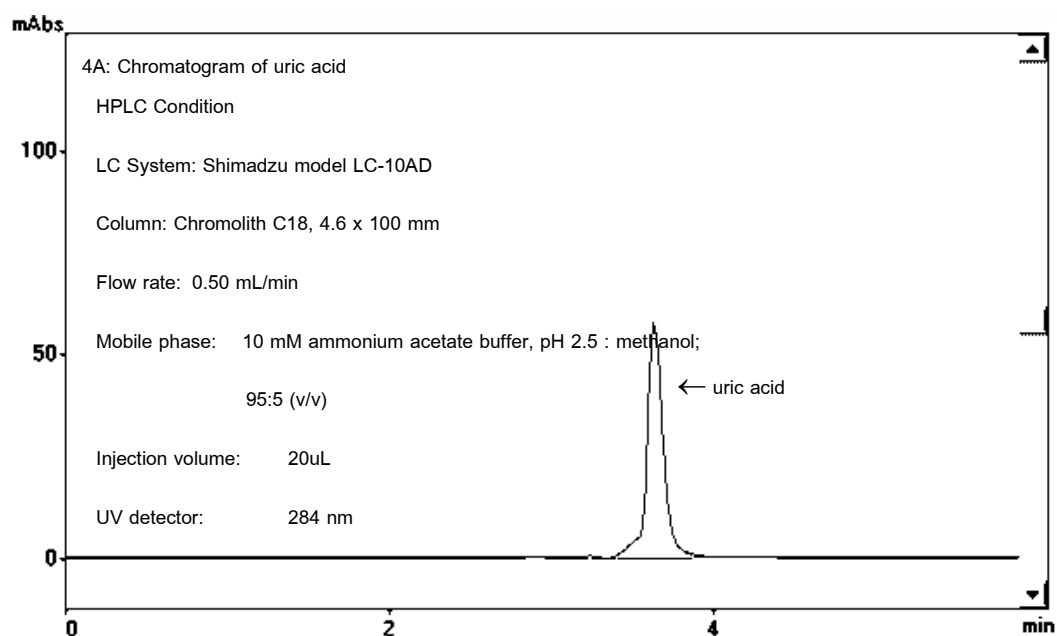


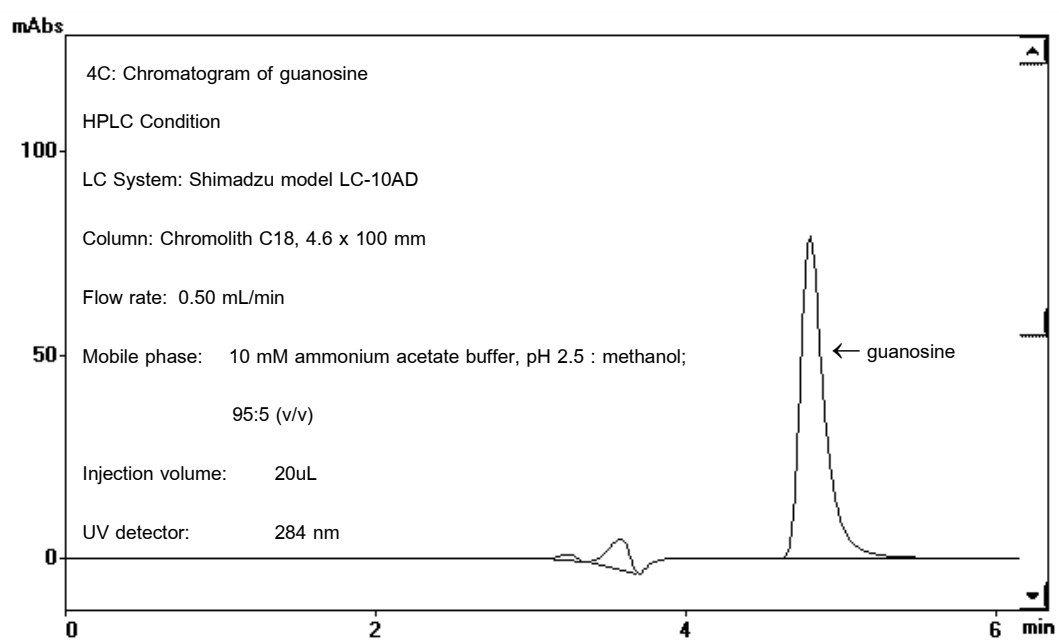
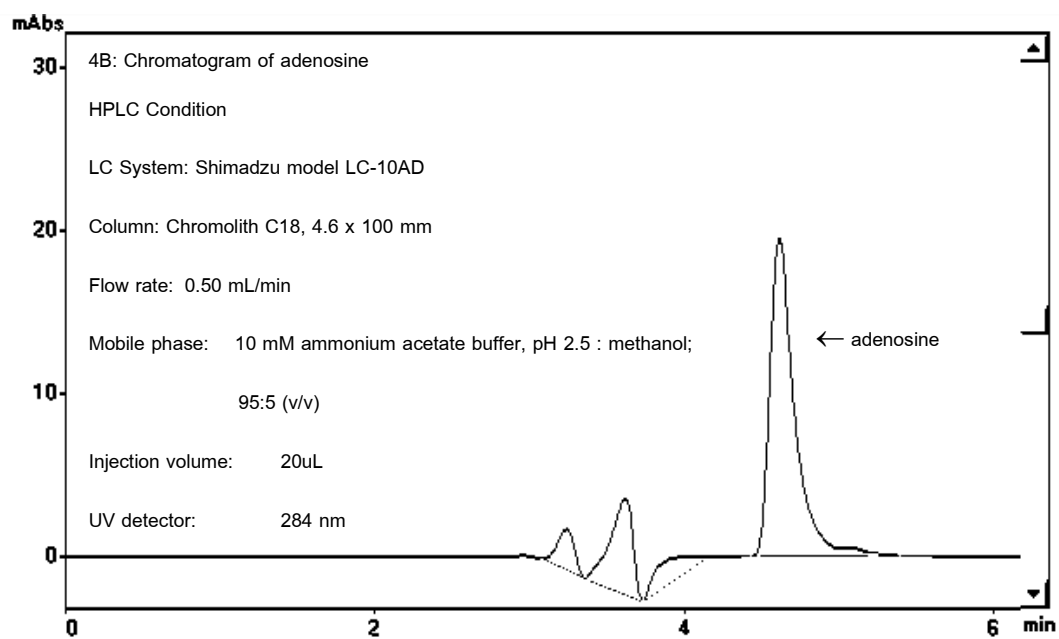


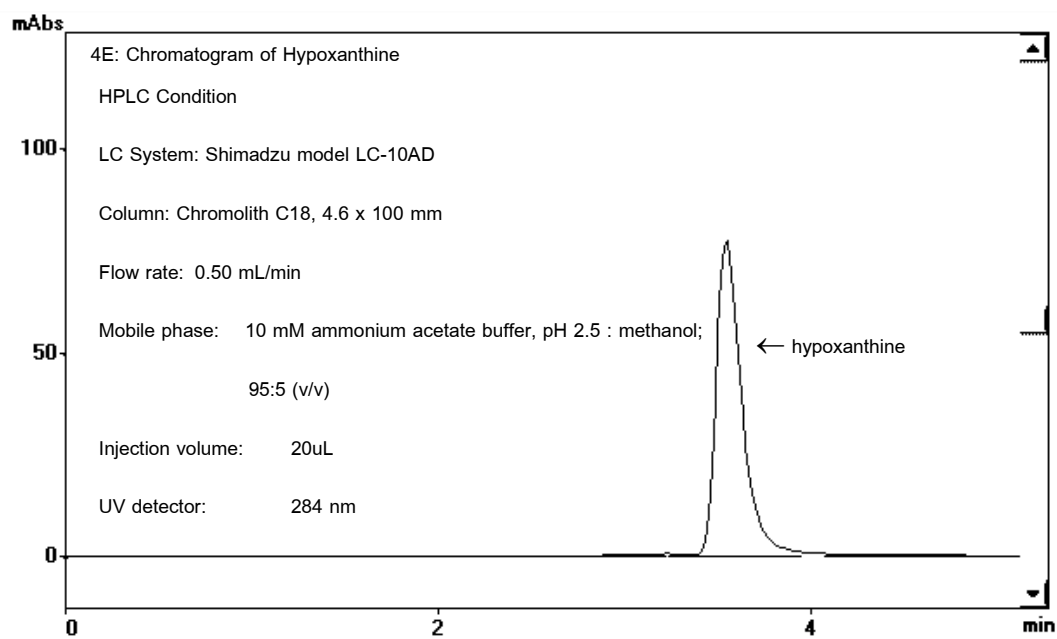
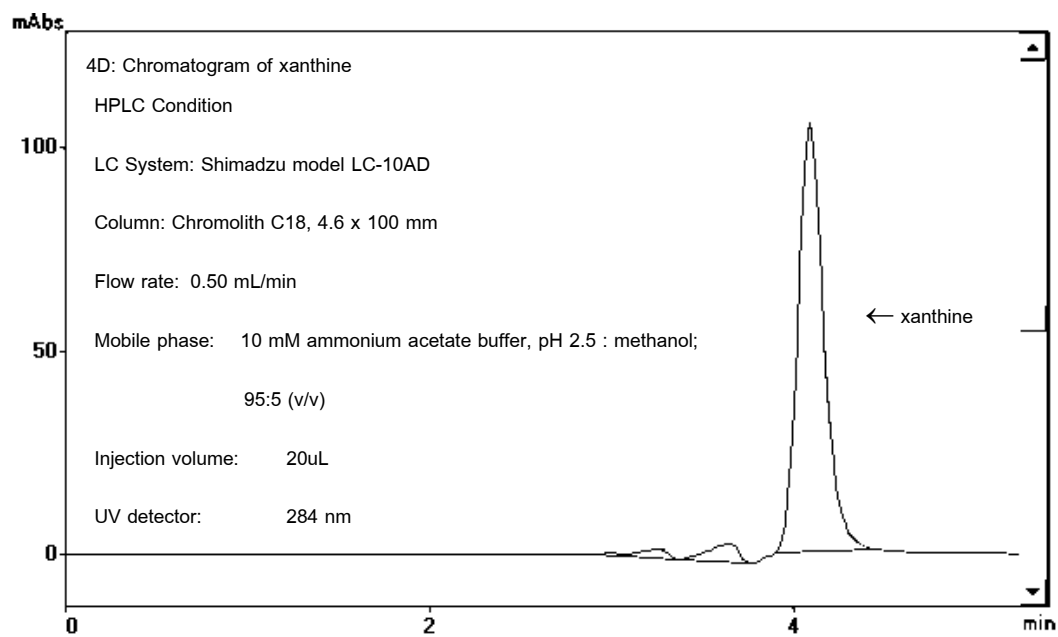


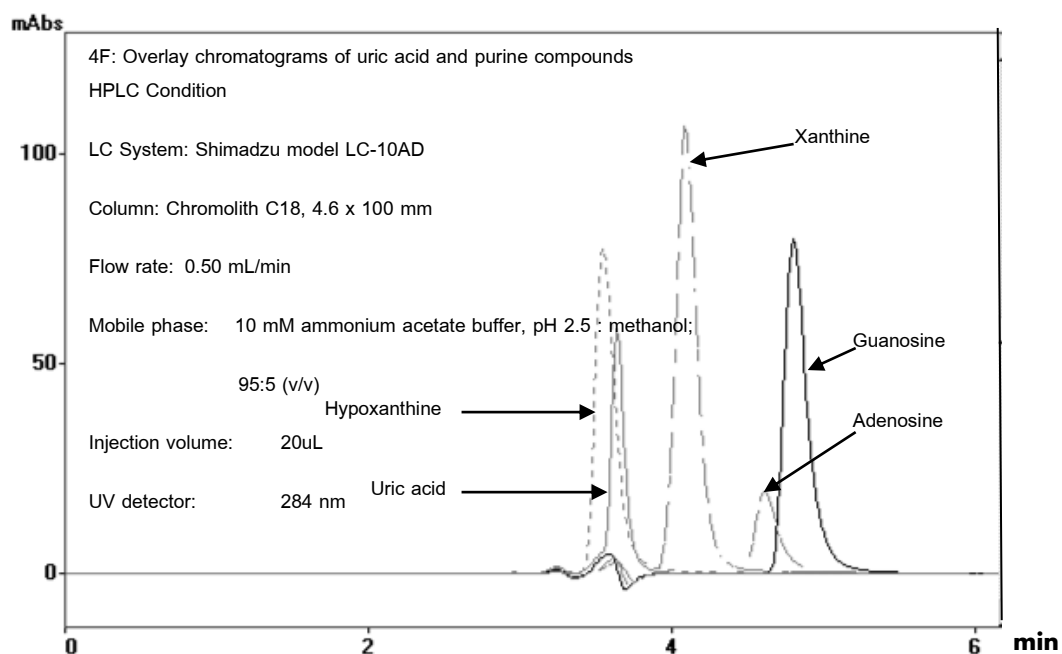
รูปที่ 3 (A-F) Chromatograms ของกรดยูริกและสารพิวรีนใน mobile phase ammonium

acetate pH 2.5 และ acetonitrile, 95:5 อัตราส่วนโดยปริมาตร



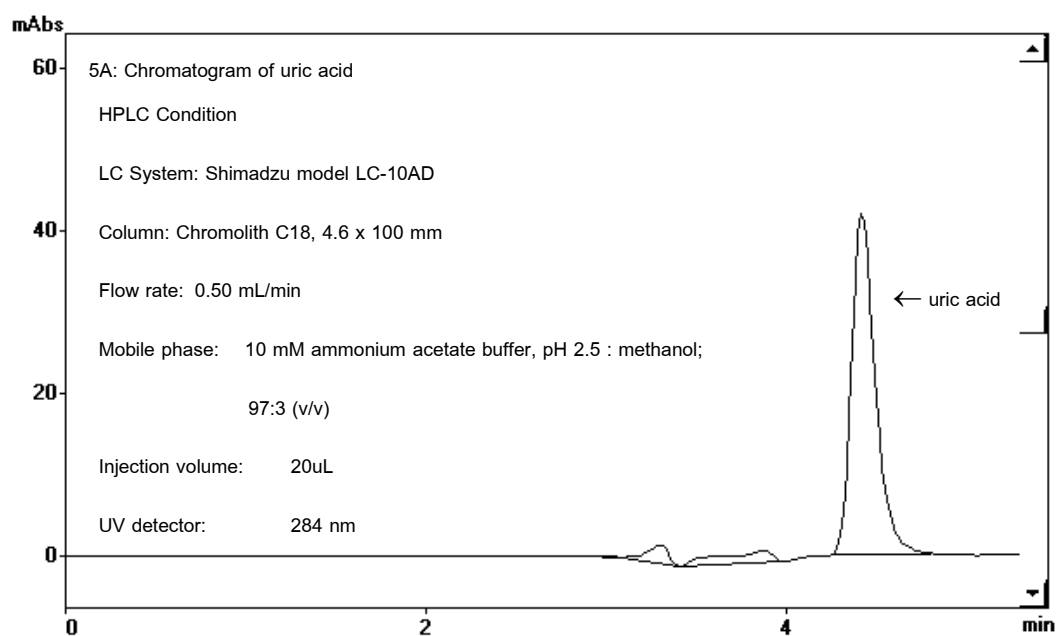


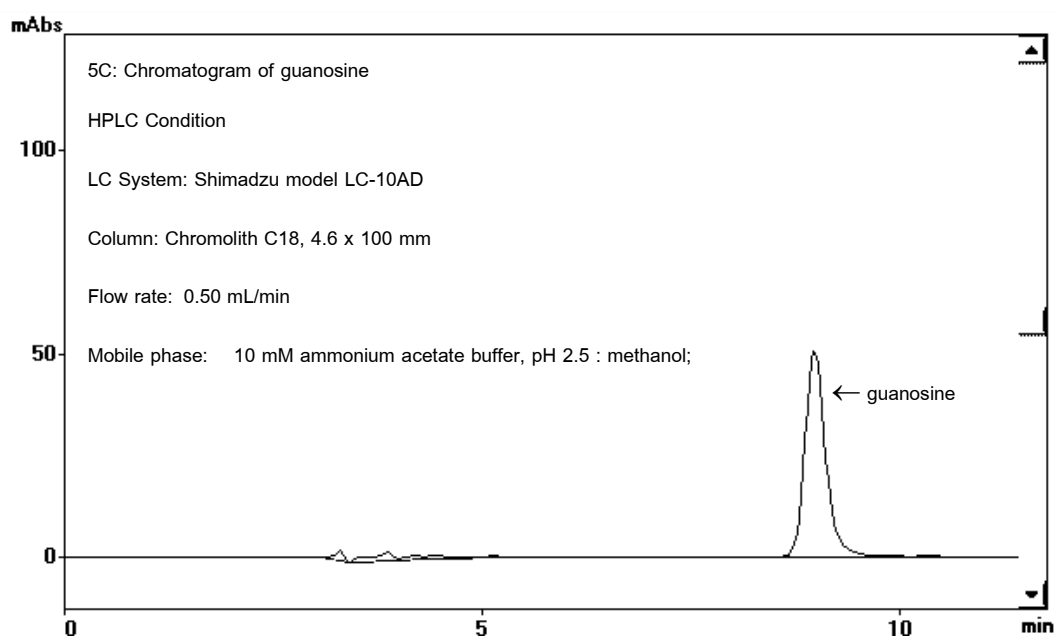
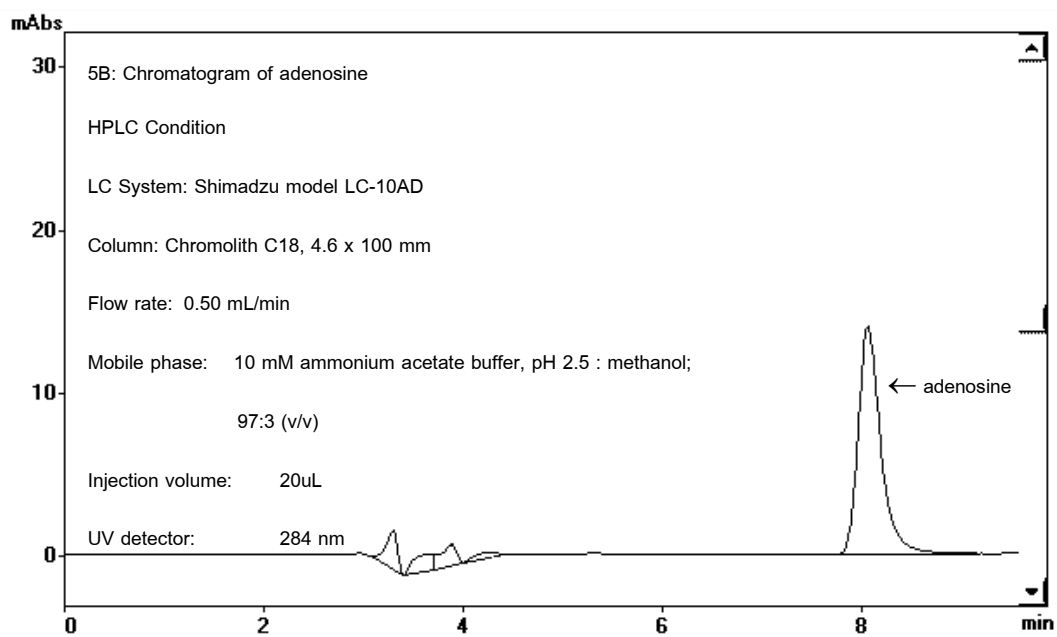


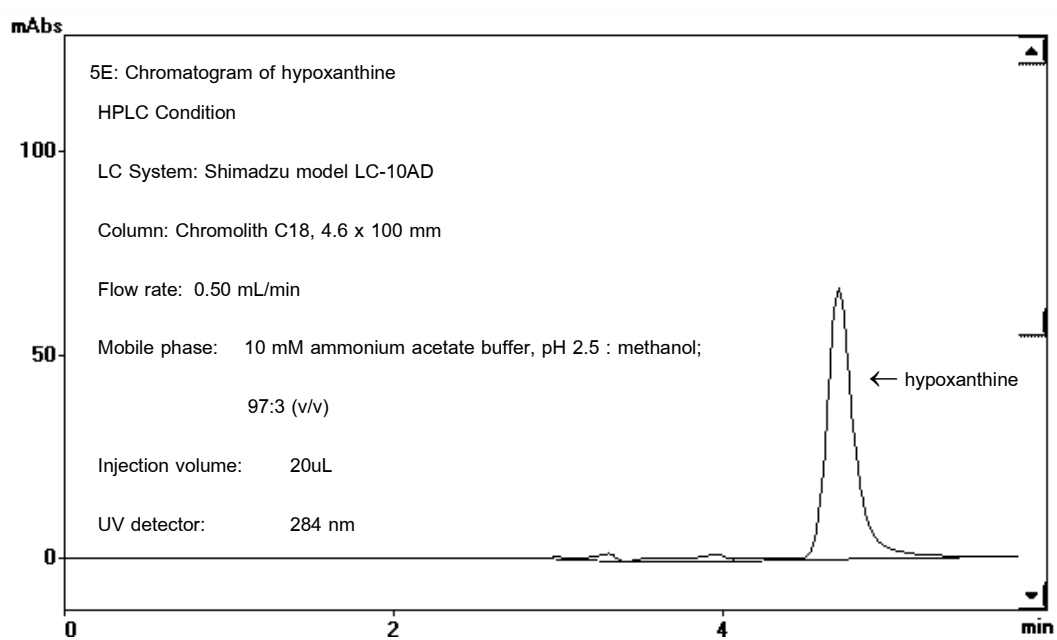
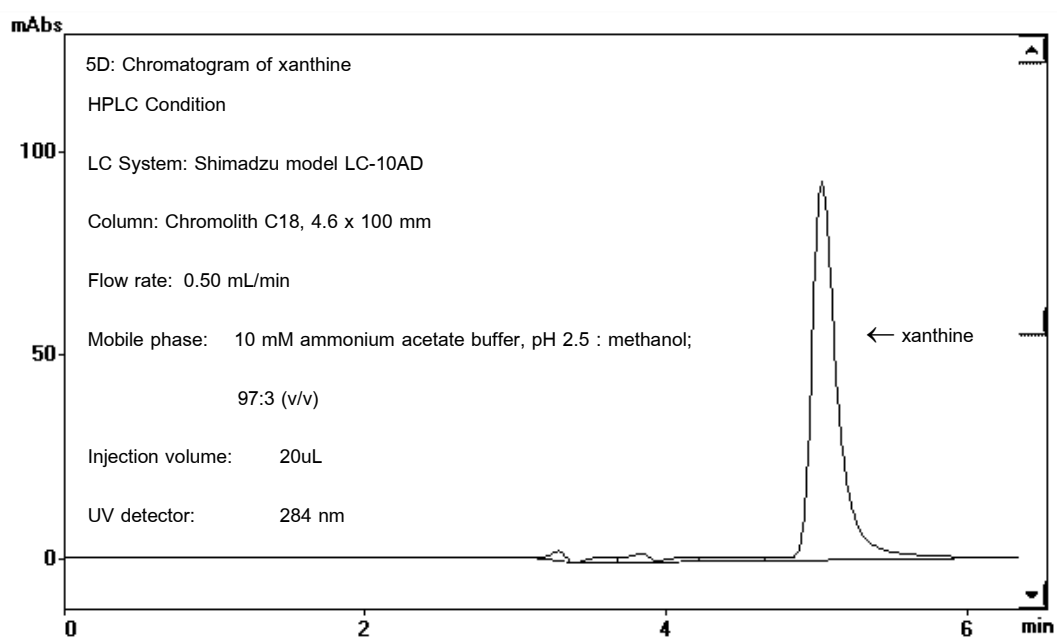


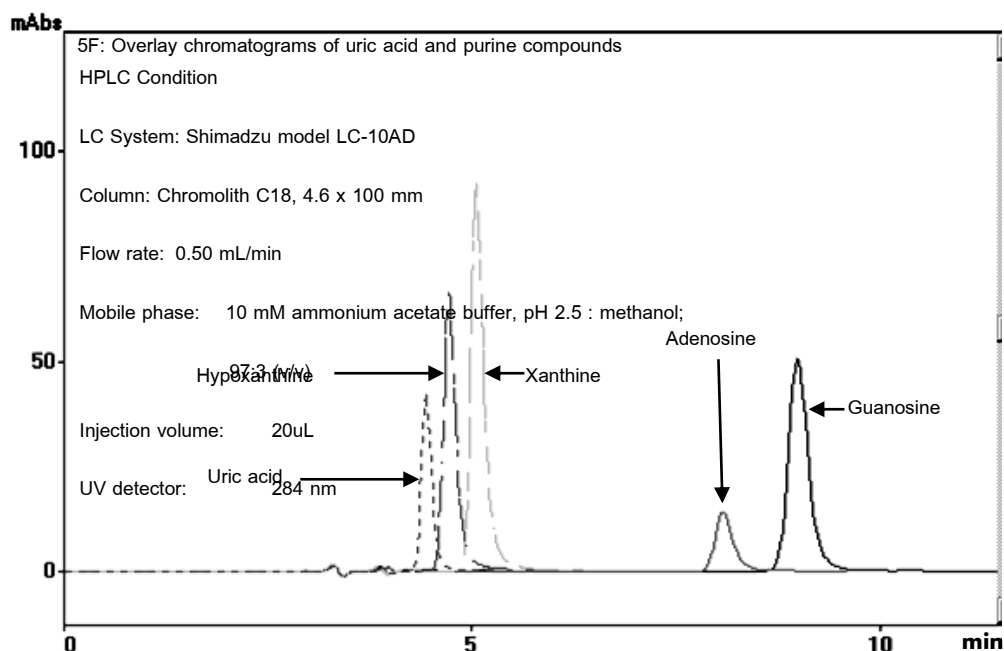
รูปที่ 4 (A-F) Chromatograms ของกรดยูริกและสารพิวรีนใน mobile phase ammonium acetate pH

2.5 และ methanol, 95:5 อัตราส่วนโดยปริมาตร









รูปที่ 5 (A-F) Chromatograms ของกรดยูริกและสารพิวรีนใน mobile phase ammonium acetate pH

2.5 และ methanol, 97:3 อัตราส่วนโดยปริมาตร

5.2 การพัฒนาวิธีลิควิดโครมาโตกราฟีแมสสเปคโตรเมตรีชนิด ion-trap เพื่อหาปริมาณพิวรีนและกรดยูริก

5.2.1 การหา fragmentation ions

การพัฒนาวิธีวิเคราะห์เพื่อหาปริมาณพิวรีนและกรดยูริกในผักพื้นบ้านมีสารทั้งหมด 5 ชนิดที่ทำการศึกษา คือ uric acid, xanthine, hypoxanthine, adenosine, guanosine โดยใช้ dextromethorphan เป็น internal standard การพัฒนาวิธีวิเคราะห์โดยใช้ LC-MS/MS ion-trap พบว่าไม่สามารถหาสภาวะการทดลองที่เหมาะสมที่จะวัดปริมาณ hypoxanthine ได้ เนื่องจาก hypoxanthine เป็นโมเลกุลขนาดเล็กมีมวลโมเลกุล 135 การพัฒนาวิธีวิเคราะห์ช่วงแรกได้เตรียมสารละลายมาตรฐาน hypoxanthine ความเข้มข้น 100 µg/mL นำไปทดลองเพื่อหา fragmentation ion พบว่ามี fragmentation ion (transition ion) $m/z = 92$ แต่เมื่อทำการทดลองในช่วงต่อไปโดยการเตรียมสารมาตรฐานในช่วงความเข้มข้น 0.1-50 µg/mL เพื่อเตรียมกราฟสารมาตรฐาน (standard curve) พบว่า hypoxanthine ให้สัญญาณ peak area ต่ำมากและให้สัญญาณไม่สม่ำเสมอในการฉีดแต่ละครั้งหรือบางครั้งไม่พบสัญญาณ แม้กระทั่งที่ระดับความเข้มข้นสูงสุดที่ทำการศึกษาคือ 50 µg/mL สาเหตุดังกล่าวอาจเนื่องมาจาก ระบบของเครื่องตรวจวัดที่ใช้เป็น mass analyzer ชนิด ion-trap

ซึ่งสารทุกชนิดที่ออกมาจากคอลัมน์หรือระบบลิควิดโครมาโตกราฟี จะเข้าไปสู่ ions chamber ทั้งหมด แล้วจึงเกิด fragmentation และตรวจวัด fragmentation ions ที่มีน้ำหนัก (m/z) ตามที่เลือกไว้ hypoxanthine parent ion (m/z 135) และ transition ion (m/z 92) มีมวลค่อนข้างน้อยเมื่ออยู่รวมกันกับสารอื่นๆ ภายใน ions chamber อาจเกิดการชนกับ ions ที่เป็น adduct อื่นๆ ทำให้ตรวจพบ ions m/z 135 และ 92 ได้น้อยและปริมาณที่ตรวจพบไม่สม่ำเสมอ ซึ่งปัญหาดังกล่าวพบกับสารอื่นๆ ที่เหลือคือ uric acid, xanthine, adenosine, guanosine และ dextromethorphan ด้วยแต่ไม่มากเท่ากรณีของ hypoxanthine ซึ่งมีมวลโมเลกุลน้อยที่สุดในกลุ่มสารที่ทำการศึกษา จึงตัด hypoxanthine ออกจากการศึกษานี้ก่อน โดยสรุปจึงมีสารที่จะพัฒนาวิธีวิเคราะห์ได้โดยวิธี LC-MS ทั้งหมด 4 ชนิด คือ uric acid, xanthine, adenosine และ guanosine

ในการวิเคราะห์ปริมาณจะใช้อัตราส่วนระหว่างพื้นที่ใต้ peak ของ parent ion ของสารต่อพื้นที่ใต้ peak ของ parent ion ของ internal standard (peak area ratio) และใช้ fragmentation ions 1 ชนิด (transition ion) เพื่อยืนยันชนิดของสาร จากการทดลองหา fragmentation ions โดยใช้สารมาตรฐานแต่ละชนิดในความเข้มข้น 10 $\mu\text{g/mL}$ พบ fragmentation ions หรือ transition ions ของสารแต่ละชนิดดังแสดงในตารางที่

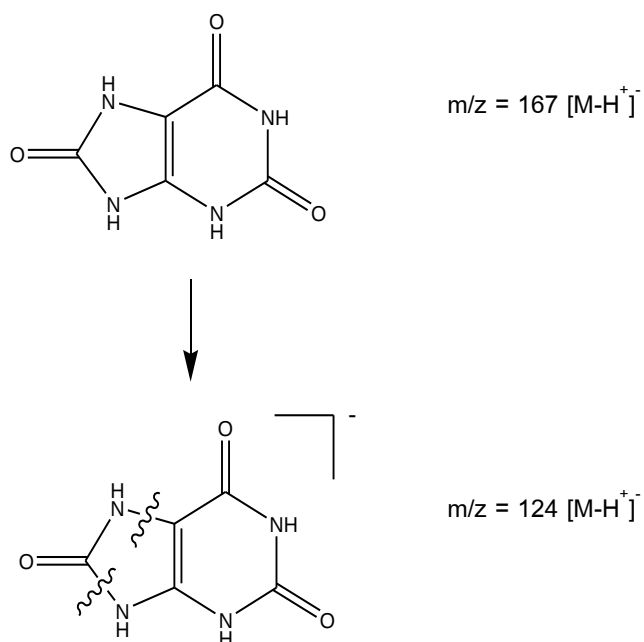
1

ตารางที่ 1. แสดง parent ions และ transition ions ของพิวรีนและกรดยูริกที่ใช้ในการศึกษา

สาร	Parent ions (m/z)	Transition ions (m/z)
Uric acid	167	124
Xanthine	151	108
Adenosine	268	136
Guanosine	284	152

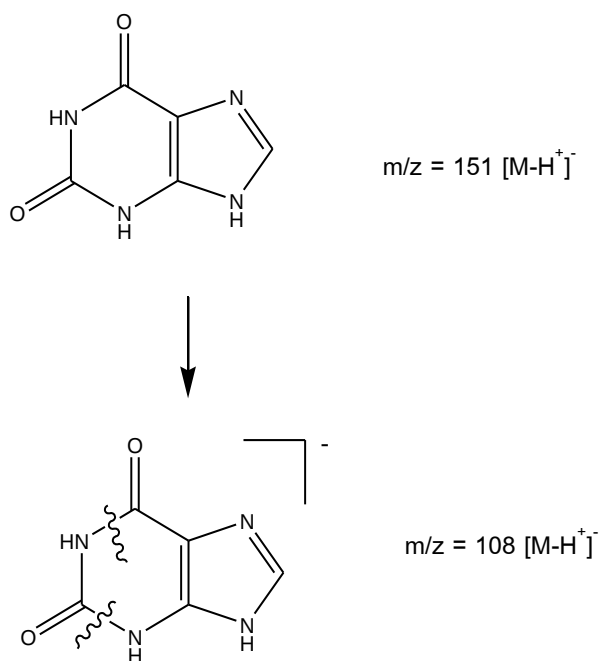
การแตกมวล (fragmentation) ของสารแต่ละชนิดเพื่อให้ได้ transition ions ในตาราง เป็นดังรูปที่ 6-9

Uric acid: 167>>124



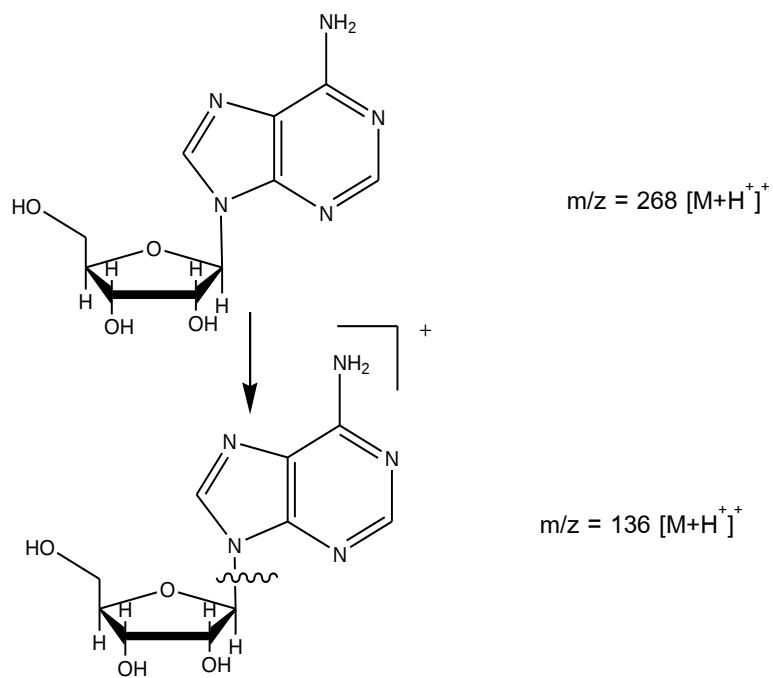
รูปที่ 6. Fragmentation ของ uric acid ได้ transition ion, m/z 124

Xanthine: 151>>108



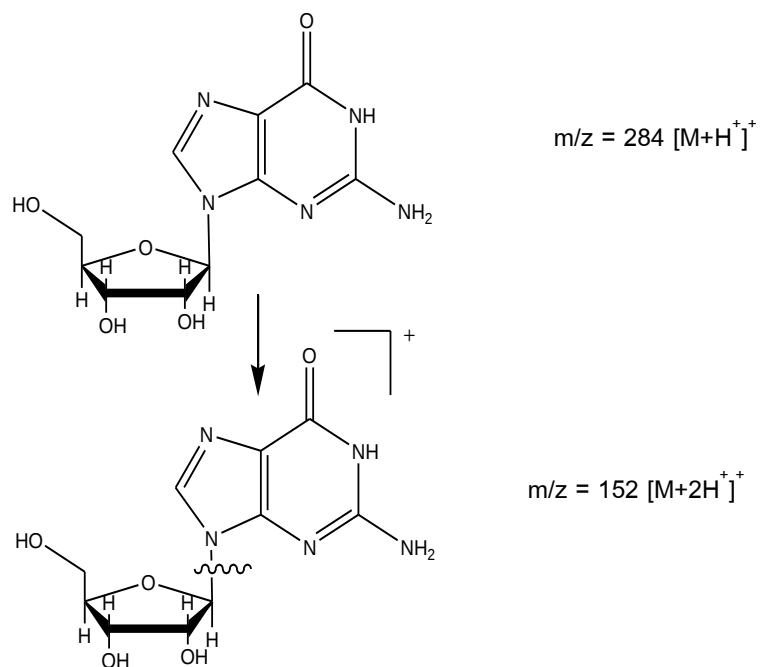
รูปที่ 7. Fragmentation ของ xanthine ได้ transition ion, m/z 108

Adenosine: 268>>136



รูปที่ 8. Fragmentation ของ adenosine ได้ transition ion, m/z 136

Guanosine: 284>>152



รูปที่ 9. Fragmentation ของ guanosine ได้ transition ion, m/z 152

จากการทดลองพบว่า uric acid และ xanthine ให้สัญญาณใน negative mode ได้ดี แต่ให้สัญญาณน้อยหรือไม่สามารถตรวจวัดได้เลยเมื่อใช้ positive mode ในขณะที่ adenosine guanosine และ dextromethorphan ให้สัญญาณดีใน positive mode ดังนั้นระบบการวิเคราะห์และตรวจวัดจึงใช้ทั้ง positive mode และ negative mode โดยที่ตั้งแต่เวลาเริ่มต้นจนถึง 7 นาทีตั้งระบบการตรวจวัดเป็น negative mode ซึ่ง uric acid และ xanthine จะออกมาในช่วงเวลาดังกล่าว หลังจากนั้นจะ switch ไปตรวจวัดใน positive mode เพื่อตรวจวัด adenosine guanosine และ Dextromethorphan ที่ออกมาในช่วง 7-13 นาที

การใช้งานในระบบ negative และ positive mode พบว่าทั้งสอง modes มีความไว (sensitivity) ต่างกันคือ positive mode มีความไวดีกว่าประมาณ 10-100 เท่า ในการวิเคราะห์ด้วยระบบ LC-MS ที่อธิบายในบทที่ 4 สารต่างๆจะถูกแยกออกมาในช่วงเวลา 5-12.5 นาที ค่า retention time, transition ions และพลังงานที่ใช้ในการแตกของสารแต่ละชนิดแสดงดังตารางที่ 2

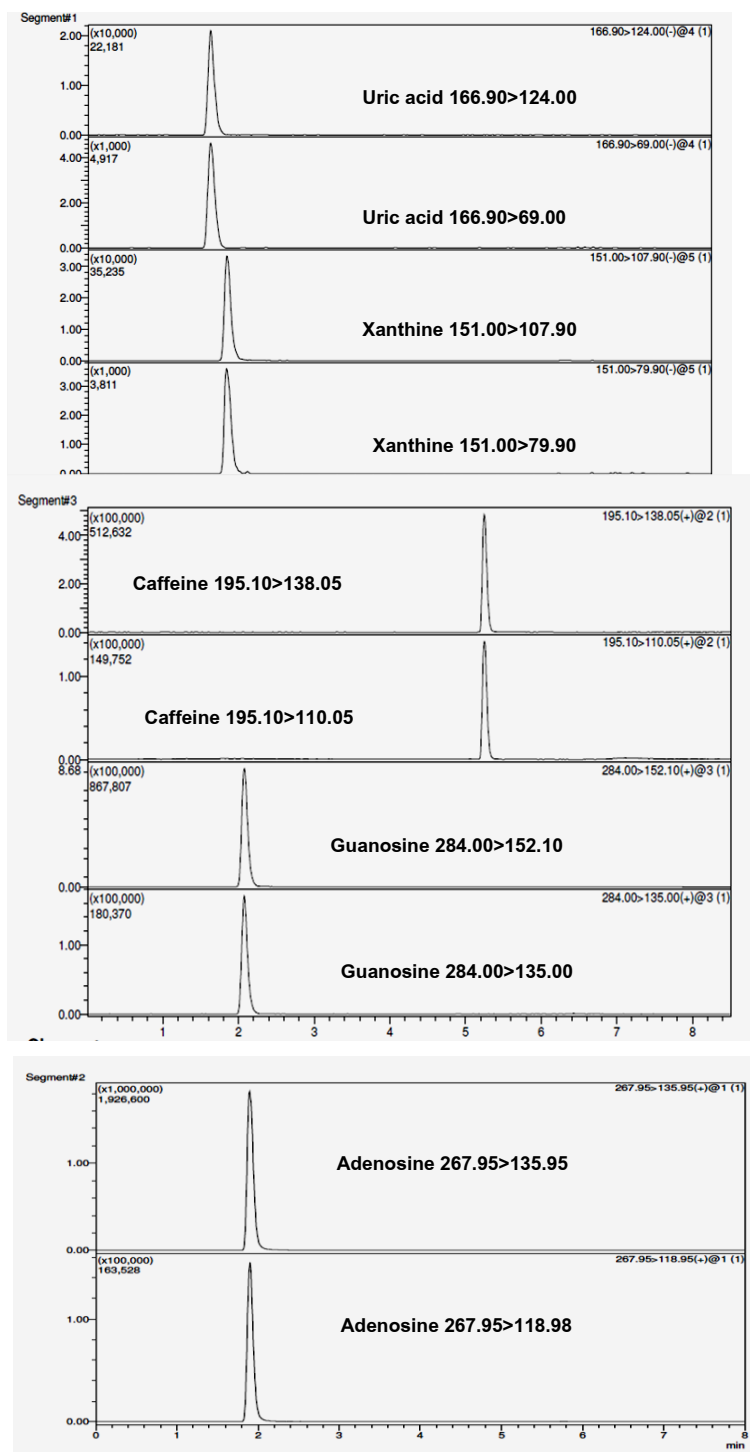
ตารางที่ 2. สรุปผลค่า retention time, transition ions, พลังงานที่ใช้ในการแตกของสารแต่ละชนิด (collision induced dissociation,cid)

สาร	Retention time (min)	Transition	cid (eV)
Uric acid	5.07	167>>124	33
Xanthine	6.39	151>>108	30
Adenosine	7.89	268>>136	28
Guanosine	10.78	284>>152	22
Dextromethorphan	12.37	272>>215	40

จากการศึกษา method validation เบื้องต้นของวิธี LC-MS/MS ion-trap ผลการศึกษาพบว่าค่าพารามิเตอร์บางอย่างเช่นความแม่นยำ (precision) ไม่อยู่ในเกณฑ์ที่ยอมรับได้ แม้ว่าจะทำซ้ำหลายครั้ง

5.3 การพัฒนาวิธีลิควิดโครมาโตกราฟีแมสสเปคโตรเมตรีชนิด triple-quadrupole เพื่อหาปริมาณพิวรีนและกรดยูริก

การวิเคราะห์สารพิวรีนและ uric acid โดยใช้ระบบ LC-MS/MS triple quadrupole ที่แสดงในบทที่ 4 พบว่าให้ผลการศึกษาที่ดีขึ้น สามารถตรวจสอบ transition ions ของสารแต่ละชนิดรวมทั้งสารมาตรฐานภายใน (internal standard: caffeine) ได้โดยมีตัวอย่างโครมาโตแกรมดังแสดงในรูปที่ 10 และพลังงานที่ใช้ในการแตกมวลและ transition ions ของสารที่ศึกษาแสดงดังตารางที่ 3



รูปที่ 10. โครมาโตแกรม transition ions ของพิวรีน uric acid และ caffeine (internal standard)

ตารางที่ 3. พลังงานที่ใช้ในการแตกมวลและ transition ions ของสารที่ศึกษา

Substances	Precursor ions	Transition ions	Collision energy CE (V)
Uric acid	166.90	124.00	19.2
		69.00	19.0
Xanthine	151.00	107.90	9.0
		79.90	25.5
Adenosine	267.95	135.95	-14.7
		118.98	-43.1
Guanosine	284.00	152.10	-12.1
		135.00	-32.1
Caffeine	195.10	138.05	-18.2
		110.05	-22.1

5.4 การตรวจสอบเพื่อยืนยันความใช้ได้ของวิธี (method validation)

ผลการศึกษา method validation มีดังต่อไปนี้

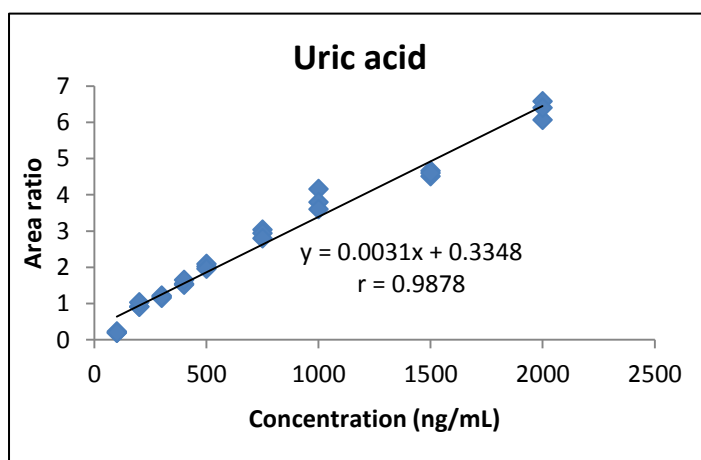
5.4.1 Specificity

ระบบการวิเคราะห์ที่พัฒนาขึ้นมีความจำเพาะกับสารแต่ละชนิดที่ต้องการ จะเห็นได้จากผลโครมาโตแกรมที่แสดง พบว่าสารแต่ละชนิดมีค่า retention time ต่างกัน และแต่ละ retention time จะตรวจวัดเฉพาะสารที่ต้องการเท่านั้นไม่มีสารอื่นเจือปน ยืนยันได้จากการตรวจวัด fragmentation ion ของสารแต่ละชนิดได้ที่เวลาเดียวกันกับ parent ion

5.4.2 Linearity

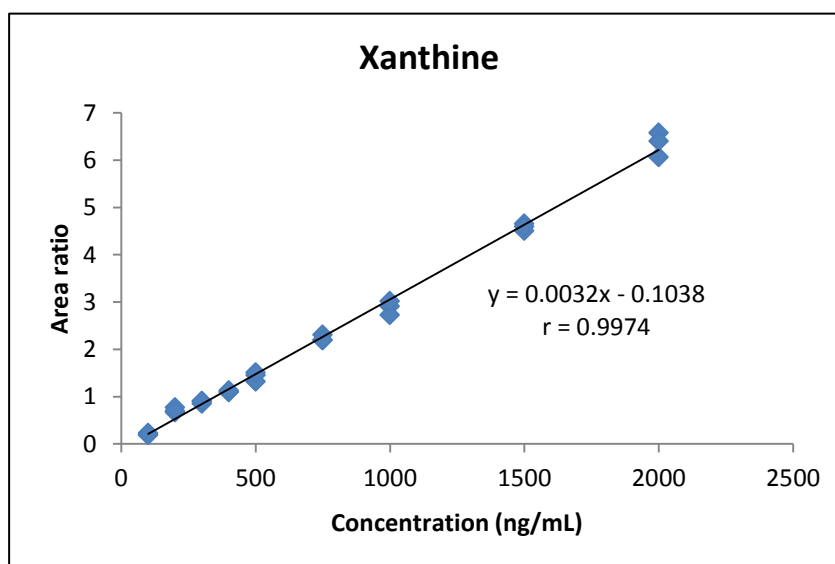
การศึกษา linearity ทำโดยการนำสารมาตรฐานมาเติมลงในตัวอย่าง blank ที่ปั่นละเอียดแล้วผสมให้เข้ากัน โดยมีความเข้มข้นของสารมาตรฐาน 10-1000 ng/mL สำหรับ adenosine และ guanosine และ 100-2000 ng/mL สำหรับ uric acid และ xanthine ผ่านขั้นตอนตามวิธีการเตรียมตัวอย่างจริง plot กราฟระหว่างค่า peak area ratio (แกน Y) กับความเข้มข้น (แกน X) คำนวณค่าสมการแสดงความสัมพันธ์โดยวิธี least square regression ได้ผลดังต่อไปนี้

1. Uric acid



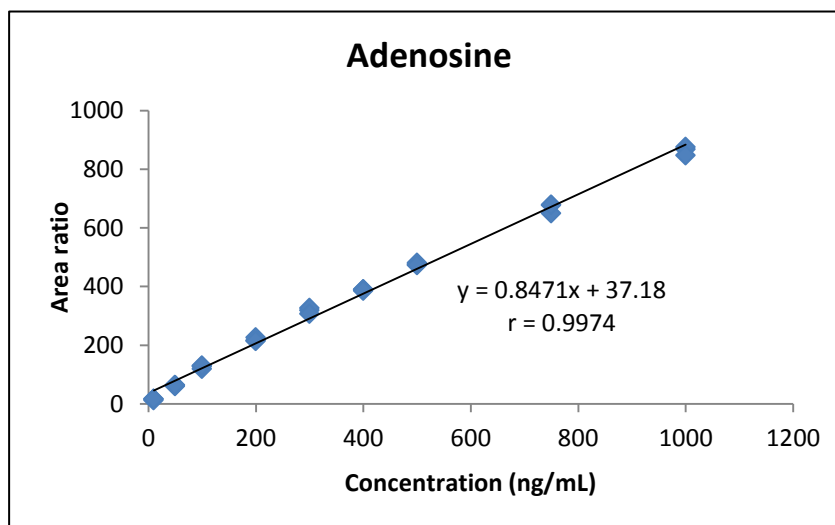
รูปที่ 11. Linearity ของ uric acid

2. Xanthine



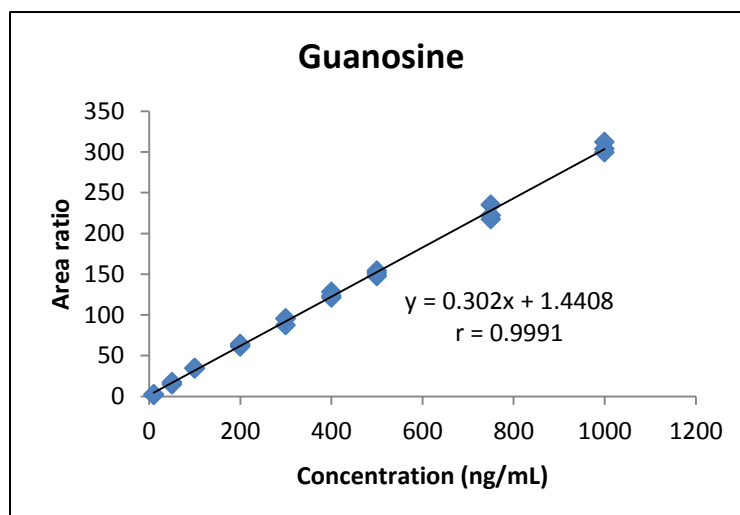
รูปที่ 12. Linearity ของ Xanthine

3. Adenosine



รูปที่ 13. Linearity ของ Adenosine

4. Guanosine



รูปที่ 14. Linearity ของ Guanosine

ตารางที่ 4. สรุปผล Linearity แสดงสมการและค่า r ของกราฟ linearity ของสารแต่ละชนิด

Substance	Equations	r
Uric acid	$Y = 0.0031x + 0.3348$	0.9878
Xanthine	$Y = 0.0032x - 0.1038$	0.9974
Adenosine	$Y = 0.8471x + 37.18$	0.9974
Guanosine	$Y = 0.302x + 1.4408$	0.9991

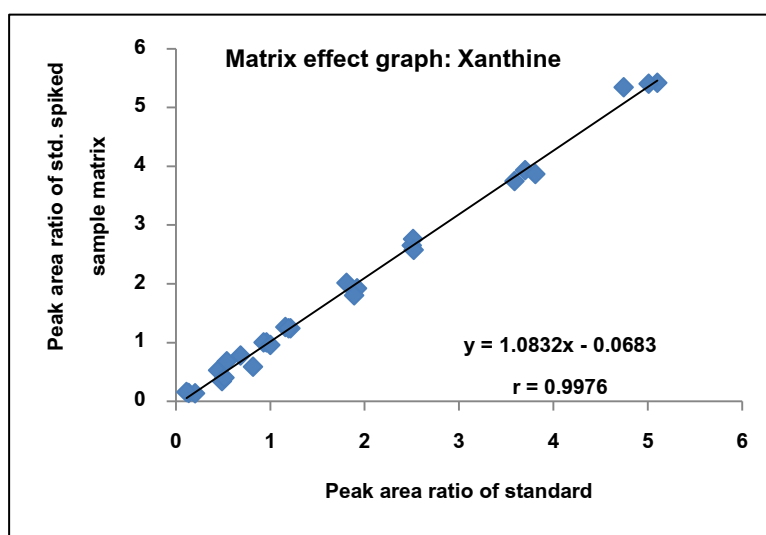
ผลการศึกษา linearity ของวิธีวิเคราะห์ที่พัฒนาขึ้นโดยการประเมินจากค่า correlation coefficient (r) พบว่าค่า r มีค่าประมาณ 0.99 หรือมากกว่า แสดงว่าค่าการวัดของวิธีมีความสัมพันธ์กับความเข้มข้นอยู่ในเกณฑ์ที่ยอมรับได้สำหรับสารทั้ง 4 ชนิดคือ uric acid, xanthine adenosine และ guanosine

5.4.3 Recovery และ matrix effect

การศึกษาผลของ matrix (matrix effect)

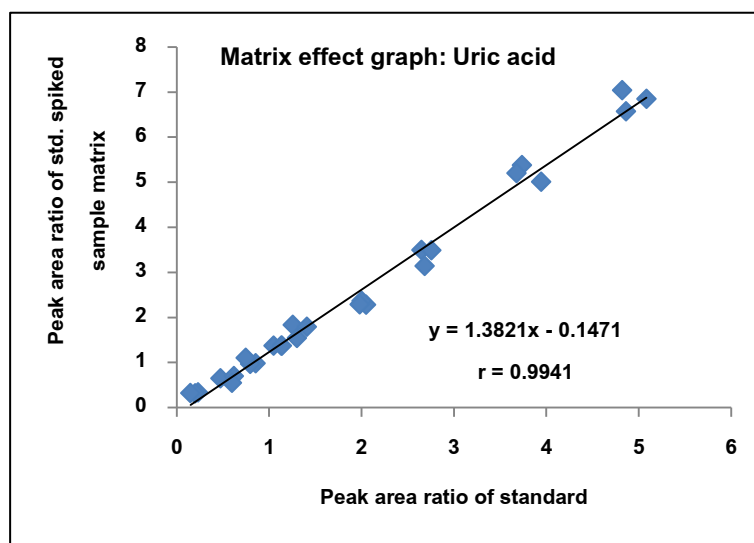
ศึกษาโดยการเปรียบเทียบ peak area ratios ของสารมาตรฐานที่เติมลงใน สารสกัด blank (แกน Y) กับ peak area ratios ของสารมาตรฐานใน 10 mM ammonium hydroxide (แกน X) นำค่า slope ของสมการแสดงความสัมพันธ์มาคำนวณค่า matrix effect ผลการศึกษาดังต่อไปนี้

1. Xanthine



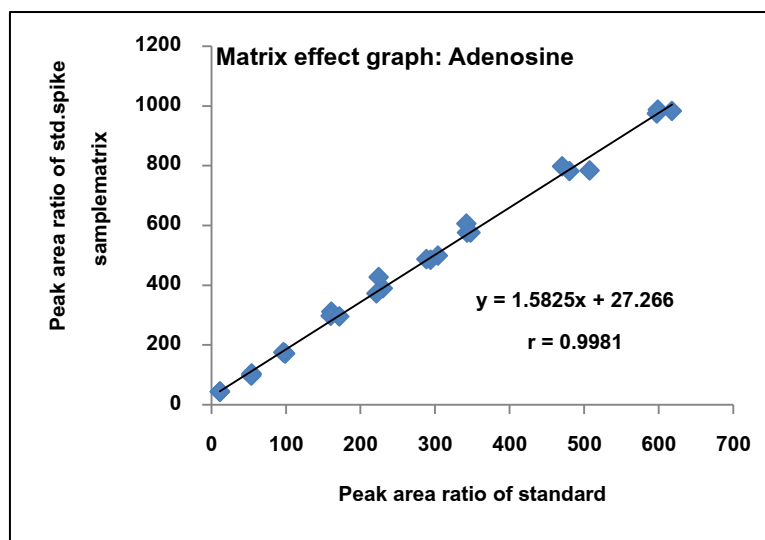
รูปที่ 15. ผลการศึกษา matrix effect ของ xanthine

2. Uric acid



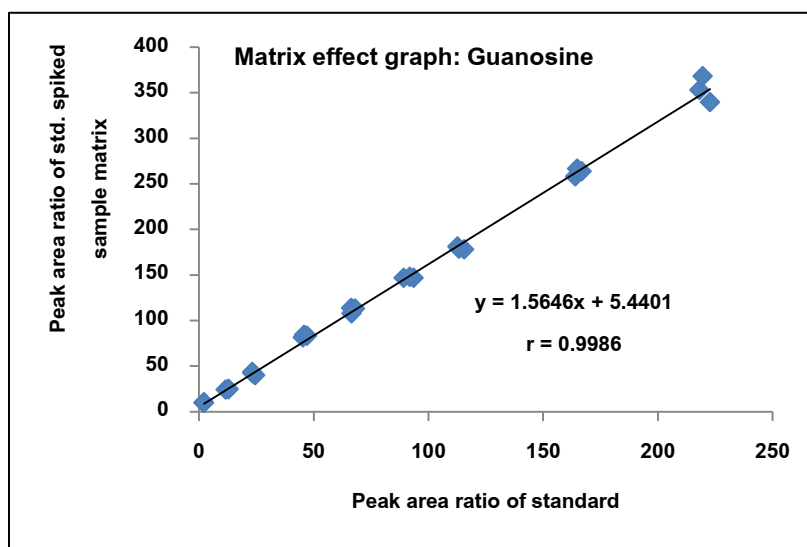
รูปที่ 16. ผลการศึกษา matrix effect ของ uric acid

3. Adenosine



รูปที่ 17. ผลการศึกษา matrix effect ของ adenosine

4. Guanosine



รูปที่ 18. ผลการศึกษา matrix effect ของ guanosine

ตารางที่ 5. สรุปผล matrix effect

Substance	Equation	Matrix Effect	Percent matrix effect
Uric acid	$Y = 1.3821X - 0.1471$	Ion Enhancement	38.2
Xanthine	$Y = 1.0832X - 0.0683$	Ion Enhancement	8.3
Adenosine	$Y = 1.5825X + 27.266$	Ion Enhancement	58.2
Guanosine	$Y = 1.5646X + 5.4401$	Ion Enhancement	56.5

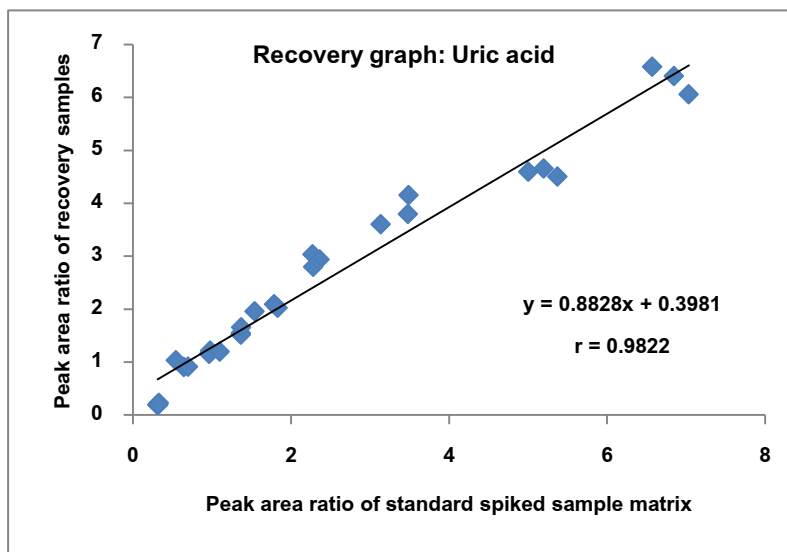
จากการศึกษาพบว่า matrix effect ของวิธีวิเคราะห์สำหรับสารทั้ง 4 ชนิดในลักษณะที่จะทำให้สัญญาณการตรวจวัดสูงขึ้น (ion enhancement) ในการนำวิธีวิเคราะห์ที่พัฒนาขึ้นนี้ไปใช้ในการตรวจปริมาณ สารทั้ง 4 ชนิดในผักชนิดต่างๆ จึงต้องทำการ compensate matrix effect โดยเตรียม calibration curve ใน matrix ของผักชนิดนั้นๆ (matrix matched calibration standard)

5.4.4 การศึกษา recovery ของการเตรียมตัวอย่าง

ศึกษาโดยการเปรียบเทียบ peak area ratios ของสารมาตรฐานที่เติมลงใน สารสกัด blank (แกน X) กับ peak area ratios ของสารมาตรฐานที่เติมลงในตัวอย่าง blank ที่ปั่นละเอียดแล้วผสมให้เข้ากัน ผ่านขั้นตอนตามวิธีการเตรียมตัวอย่างจริง ก่อนนำไปฉีด (แกน Y) นำค่า slope ของสมการแสดงความสัมพันธ์มาคำนวณค่า recovery ของการเตรียมตัวอย่าง ผลการศึกษามีดังต่อไปนี้

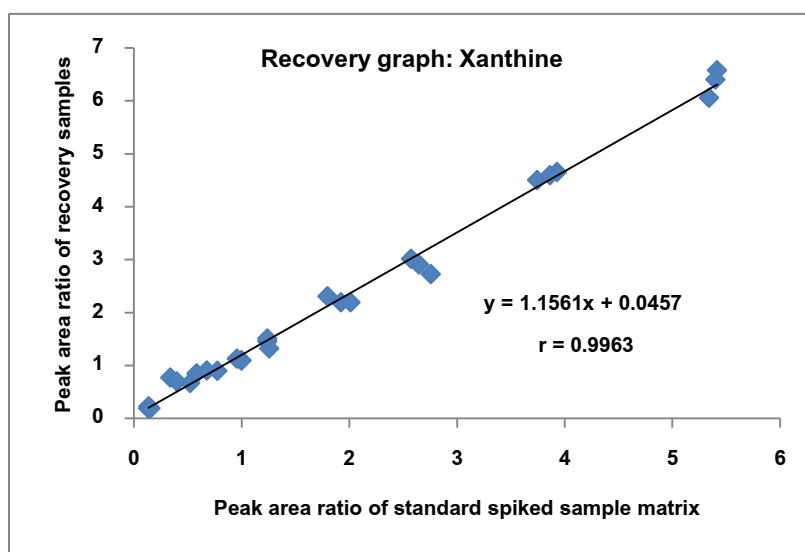
ผลการศึกษา recovery (extraction recovery)

1. Uric acid



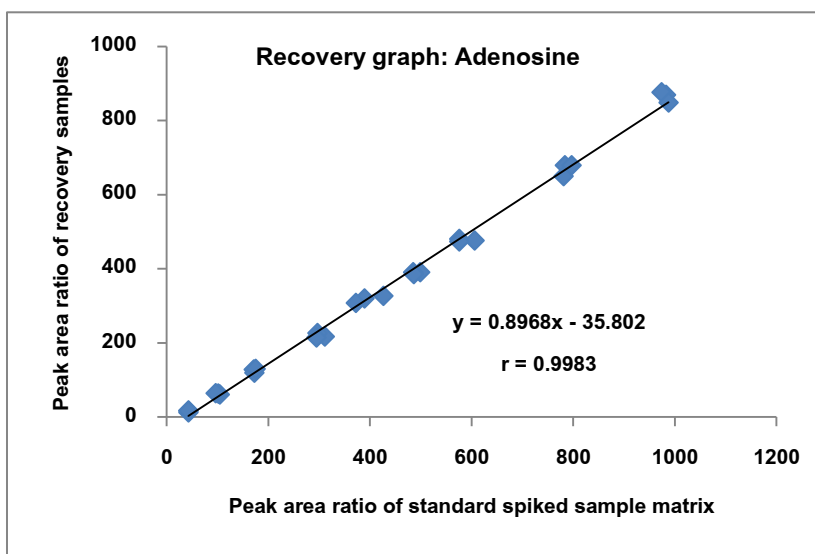
รูปที่ 19. ผลการศึกษา extraction recovery ของ uric acid

2. Xanthine



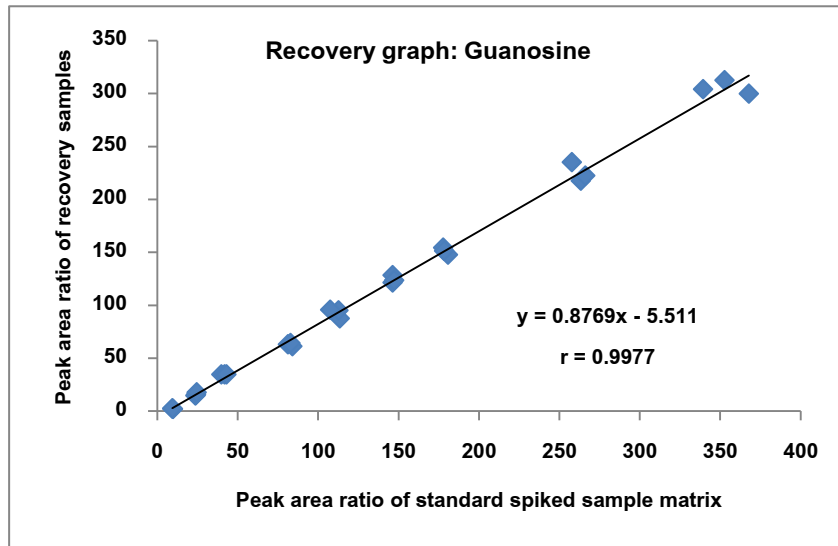
รูปที่ 20. ผลการศึกษา extraction recovery ของ xanthine

3. Adenosine



รูปที่ 21. ผลการศึกษา extraction recovery ของ adenosine

4. Guanosine



รูปที่ 22. ผลการศึกษา extraction recovery ของ guanosine

ตารางที่ 6. สรุปผล recovery (extraction recovery) ของการเตรียมตัวอย่าง

Substance	Equation	Recovery (%)
Uric acid	$Y = 0.8828X + 0.0004$	88.3
Xanthine	$Y = 1.1561X + 5E-05$	115.6
Adenosine	$Y = 0.8968X - 0.0358$	89.7
Guanosine	$Y = 0.8769X - 0.0055$	87.7

ผลการศึกษา recovery ของการสกัดสารในวิธีการเตรียมตัวอย่าง พบว่าสารทั้ง 4 ชนิดสามารถถูกสกัดออกมาได้ในปริมาณสูง ในช่วง 87.7-115.6% แสดงว่าตัวทำละลายและวิธีการเตรียมตัวอย่างที่ใช้มีประสิทธิภาพดีในการสกัดสารทั้ง 4 ชนิด

5.4.5 Accuracy และ precision

ผลการศึกษา accuracy และ precision โดยใช้ตัวอย่างควบคุมคุณภาพ (quality control sample) ที่ 4 ระดับความเข้มข้น คือ 100-2000 ng/mL สำหรับ uric acid และ xanthine และในช่วงความเข้มข้น 10-1000 ng/mL สำหรับ adenosine และ guanosine ในการศึกษา accuracy และ precision ได้ผลดังต่อไปนี้

ผลการศึกษา Accuracy และ precision (repeatability)

ตารางที่ 7. แสดงผลการศึกษา accuracy และ precision ของ uric acid

Uric acid Nominal conc. (ng/mL)	% Recovery #1	% Recovery #2	% Recovery #3	Average (n=3)	% RSD (n=3)
100	103.6	84.6	83.4	90.5	12.5
200	99.8	95.8	89.5	95.1	5.4
500	100.7	97.5	102.7	100.3	2.6
2000	107.0	98.9	106.6	104.2	4.4

ตารางที่ 8. แสดงผลการศึกษา accuracy และ precision ของ xanthine

Xanthine Nominal conc. (ng/mL)	% Recovery #1	% Recovery #2	% Recovery #3	Average (n=3)	% RSD (n=3)
100	106.1	101.7	102.3	103.4	2.3
200	109.0	100.9	102.6	104.2	4.1
500	107.3	112.0	109.3	109.5	2.1
2000	101.6	111.0	105.9	106.2	4.4

ตารางที่ 9. แสดงผลการศึกษา accuracy และ precision ของ adenosine

Adenosine Nominal conc. (ng/mL)	% Recovery #1	% Recovery #2	% Recovery #3	Average (n=3)	% RSD (n=3)
10	116.2	113.1	81.0	103.4	18.9
50	106.1	89.4	92.3	95.9	9.3
300	100.5	104.7	104.6	103.3	2.3
1000	91.9	99.5	100.5	97.3	4.8

ตารางที่ 10. แสดงผลการศึกษา accuracy และ precision ของ guanosine

Guanosine Nominal conc. (ng/mL)	% Recovery #1	% Recovery #2	% Recovery #3	Average (n=3)	% RSD (n=3)
10	108.2	83.1	114.7	102.0	16.4
50	94.4	93.5	96.6	94.8	1.7
300	93.5	104.8	97.4	98.6	5.9
1000	85.5	112.5	99.0	99.0	13.6

ผลการศึกษา Intermediate precision

ตารางที่ 11. แสดงผลการศึกษา Intermediate precision ของ uric acid

Uric acid Nominal conc. (ng/mL)	% Recovery day 1	% Recovery day 2	% Recovery day 3	Average (n=3)	% RSD (n=3)
100	97.1	99.3	103.6	100.0	3.3
200	104.6	99.9	99.8	101.4	2.7
500	101.9	97.4	100.7	100.0	2.3
2000	99.6	98.0	107.0	101.5	4.7

ตารางที่ 12. แสดงผลการศึกษา Intermediate precision ของ xanthine

Xanthine Nominal conc. (ng/mL)	% Recovery day 1	% Recovery day 2	% Recovery day 3	Average (n=3)	% RSD (n=3)
100	83.5	82.7	102.3	89.5	12.4
200	90.5	88.7	102.6	93.9	8.1
500	107.8	101.5	109.3	106.2	3.9
2000	95.0	97.8	105.9	99.6	5.7

ตารางที่ 13. แสดงผลการศึกษา Intermediate precision ของ adenosine

Adenosine Nominal conc. (ng/mL)	% Recovery day 1	% Recovery day 2	% Recovery day 3	Average (n=3)	% RSD (n=3)
10	98.2	91.7	113.1	101.0	10.8
50	103.9	109.9	89.4	101.1	10.4
300	100.7	113.9	104.7	107.1	7.3
1000	93.4	91.9	99.5	94.9	4.3

ตารางที่ 14. แสดงผลการศึกษา Intermediate precision ของ guanosine

Guanosine Nominal conc. (ng/mL)	% Recovery day 1	% Recovery day 2	% Recovery day 3	Average (n=3)	% RSD (n=3)
10	95.2	86.3	83.1	88.2	7.1
50	105.9	101.8	93.5	100.4	6.3
300	102.3	103.6	104.8	103.6	1.2
1000	103.1	103.4	112.5	106.3	5.0

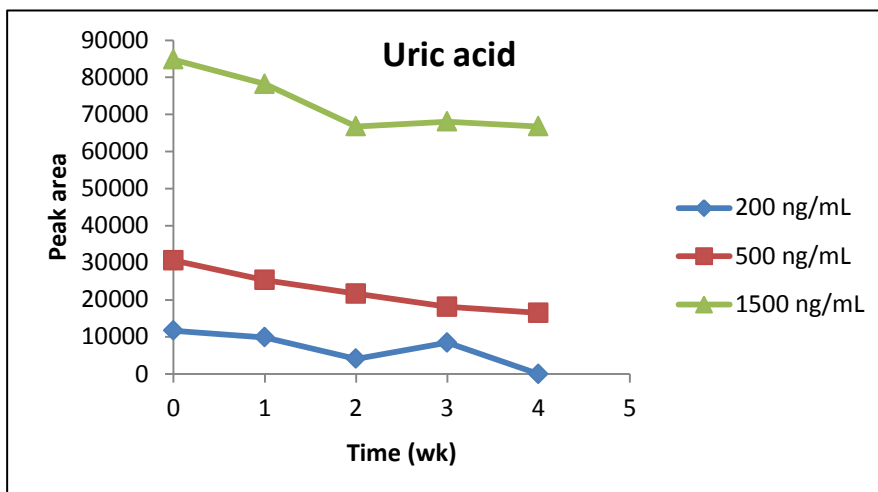
สรุปผลการศึกษา method validation

จากผลการศึกษา method validation ของวิธี LC-MS/MS ที่พัฒนาขึ้นเพื่อใช้ในการปริมาณของ สารพิวรีนและ uric acid ในตัวอย่างผักพบว่าค่าพารามิเตอร์ต่างๆอยู่ในเกณฑ์ที่ยอมรับได้ และค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถวัดปริมาณได้ (LLOQ) คือ 100 ng/mL สำหรับ uric acid และ xanthine และ 10 ng/mL สำหรับ adenosine และ guanosine ซึ่งความเข้มข้นดังกล่าวเป็นจุดที่มีค่าความถูกต้องและความแม่นยำอยู่ในเกณฑ์ที่ยอมรับได้ คือค่าความถูกต้องรายงานในรูปของ % Recovery อยู่ในช่วง 80-120% และ ความแม่นยำรายงานในรูปของ %RSD ของผลวิเคราะห์ที่ทำซ้ำใน 1 วัน (Repeatability) และผลวิเคราะห์ที่ทำซ้ำต่างวัน (Intermediate precision) อยู่ในเกณฑ์ที่ยอมรับได้คือ ไม่เกิน 20%

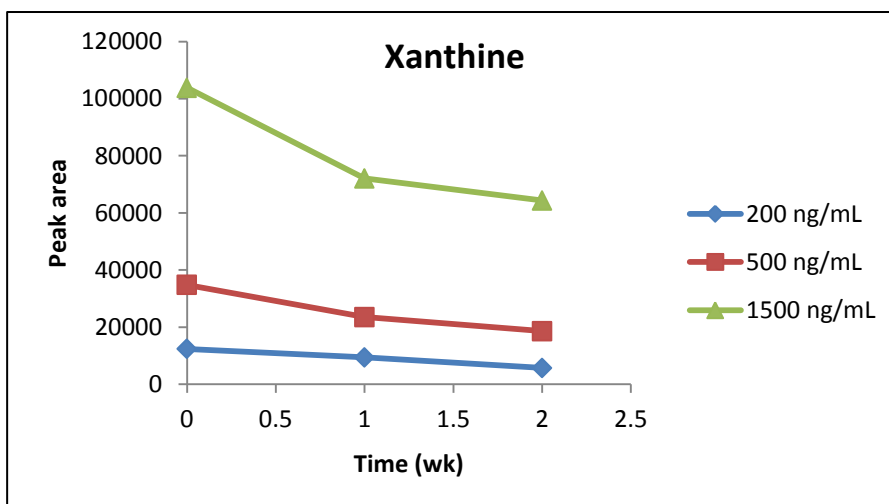
5.4.6 การศึกษาความคงตัว (stability)

จากการศึกษาความคงตัวพบว่า adenosine และ guanosine มีความคงตัวดีกว่า uric acid และ xanthine โดยที่ adenosine และ guanosine คงตัวที่อุณหภูมิห้องอย่างน้อย 72 ชั่วโมง ส่วนความคงตัวของสารละลายมาตรฐานทั้ง 2 ชนิดรวมทั้ง ความคงตัวของสารทั้งสองใน matrix ของตัวอย่าง ที่ -20°C พบว่าความเข้มข้นค่อนข้างคงที่เป็นเวลาอย่างน้อย 2 สัปดาห์ ในขณะที่ uric acid และ xanthine ไม่ค่อยคงตัวโดยพบว่า ความเข้มข้นลดลงมากกว่า 10% ภายใน 24 ชั่วโมงเมื่อตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง นอกจากนั้นยังพบว่าสารทั้งสองทั้งในรูปของสารละลายมาตรฐานและในสารละลายของ matrix ของตัวอย่าง มีการสลายตัวมากกว่า 10% ที่อุณหภูมิ -20°C ดังนั้นการเตรียมสารละลายมาตรฐานของ uric acid และ xanthine จึงต้องเตรียมแล้วใช้ทันที (freshly prepared) ส่วนสารละลายมาตรฐานของ adenosine และ guanosine สามารถเตรียมและใช้ภายใน 2 สัปดาห์ กราฟผลการศึกษาความคงตัวแสดงในรูปที่ 22-24

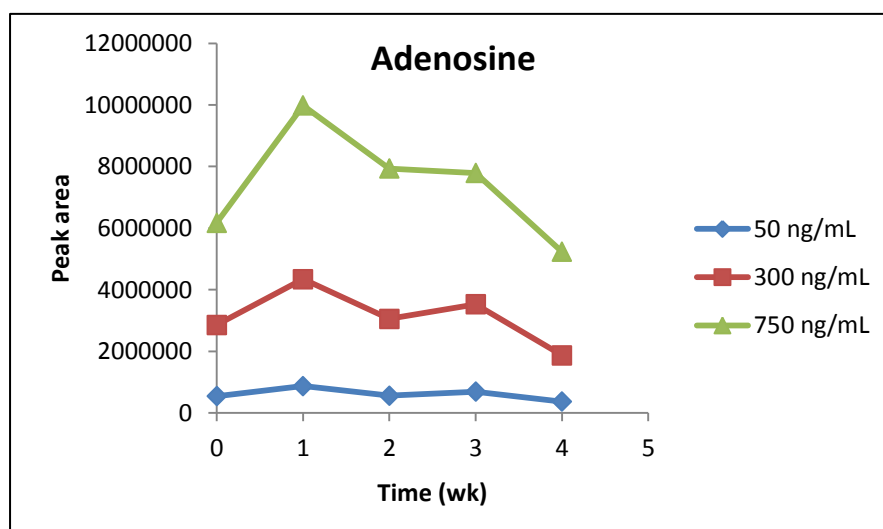
22A



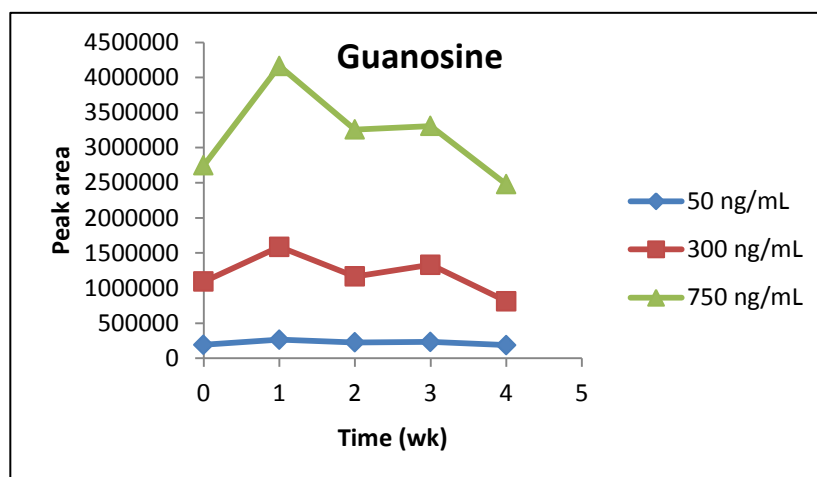
22B



22C

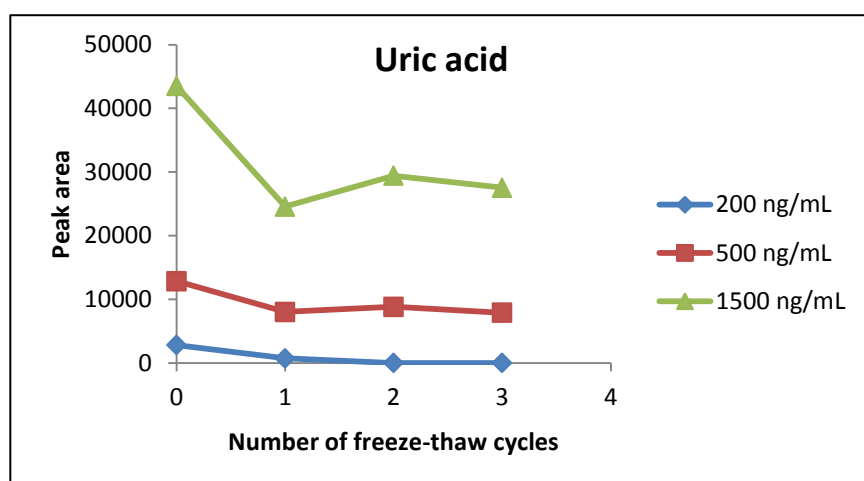


22D

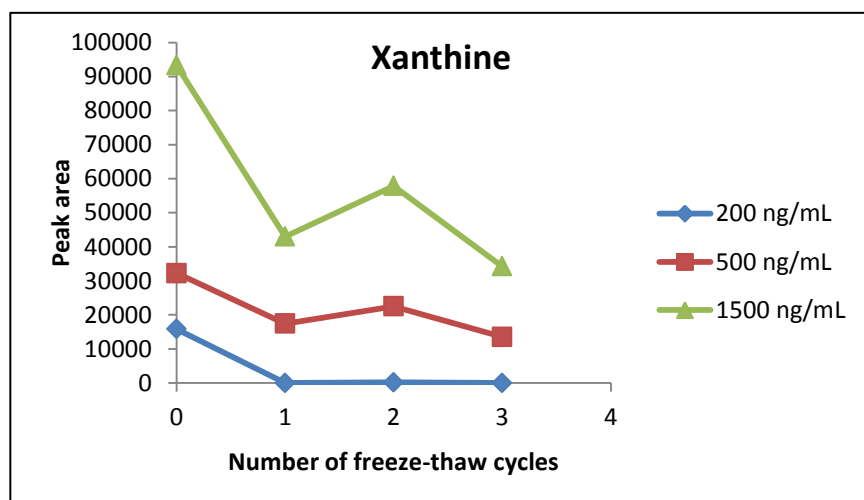


รูปที่ 22. ผลการศึกษาความคงตัวของสารมาตรฐานที่อุณหภูมิ -20°C

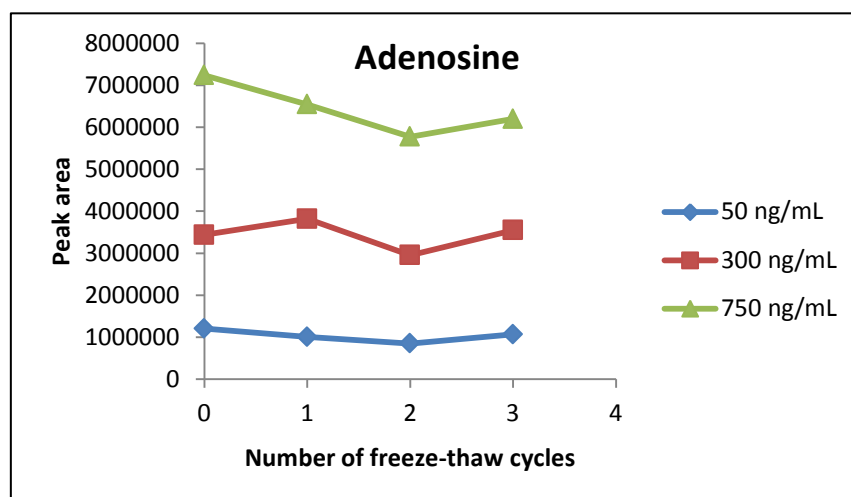
23 A



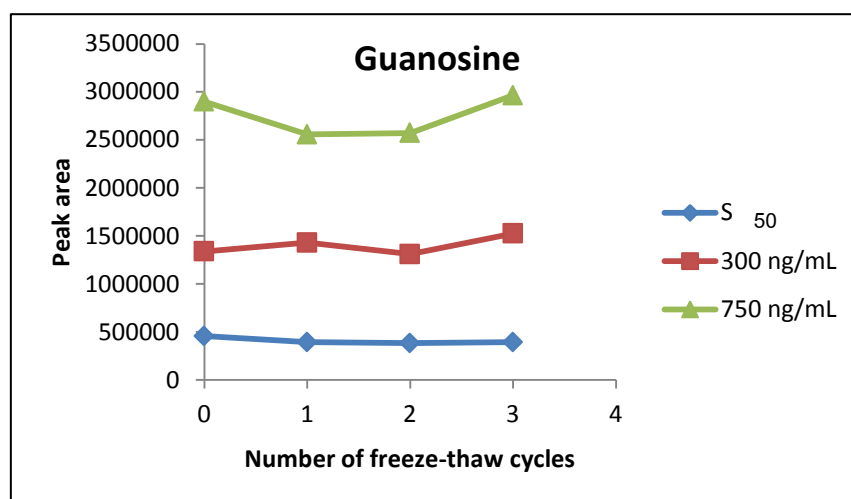
23 B



23 C

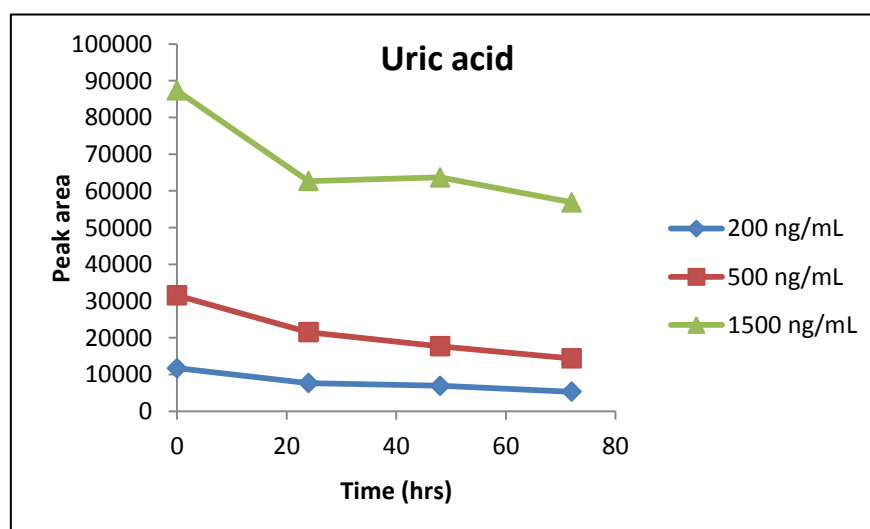


23 D

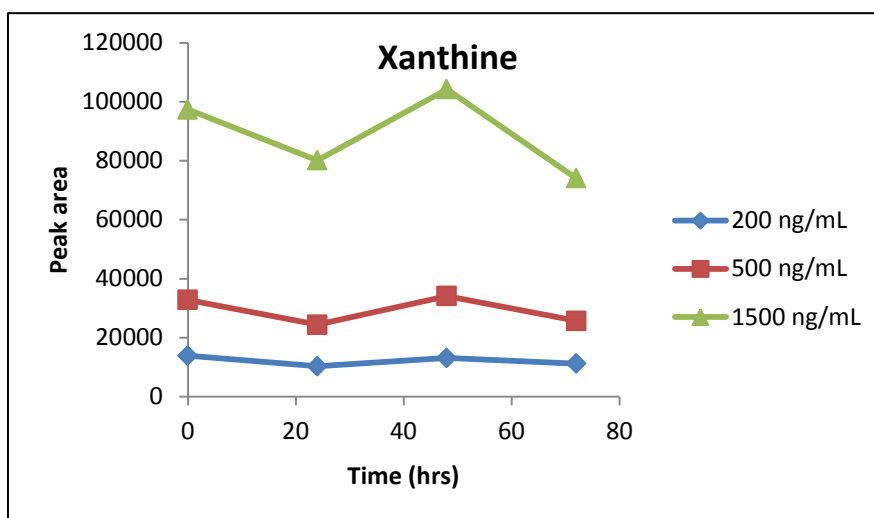


รูปที่ 23. ผลการศึกษาความคงตัวของตัวอย่างที่เติมสารมาตรฐานที่อุณหภูมิ -20°C ทำแช่แข็งและละลาย 3 รอบ

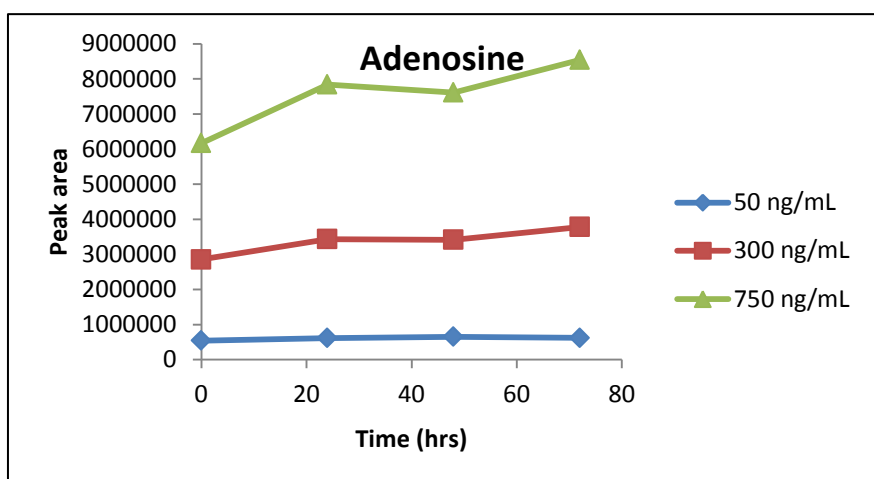
24 A



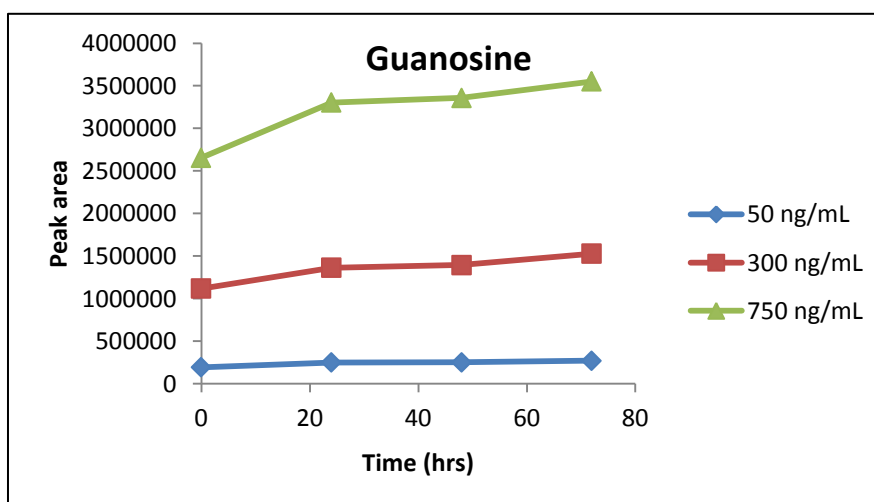
24 B



24 C



24 D



รูปที่ 24. ผลการศึกษาความคงตัวของสารมาตรฐานที่อุณหภูมิห้อง

5.5 การตรวจวิเคราะห์ปริมาณพิวรีนและกรดยูริกในตัวอย่างผักพื้นบ้าน

สรุปปริมาณพิวรีนและ uric acid ในหน่วย มิลลิกรัมต่อน้ำหนักผัก 100 กรัม ได้ดังตารางต่อไปนี้

ตัวอย่างผัก	ปริมาณพิวรีนและ uric acid (มิลลิกรัมต่อ 100 กรัม)			
	Uric acid	Xanthine	Adenosine	Guanosine
ถั่วฝักยาว	0.1-0.2	3.4-4.9	1.1-1.2	0.4-0.6
แตงกวา	ไม่พบ	ไม่พบ	0.1	0.1
ผักกาดขาว	ไม่พบ	< LLOQ	0.2-0.7	0.1-0.2
ถั่วงอก	ไม่พบ	< LLOQ	0.8-2.7	0.4-0.9
ผักบุ้งจีน	0.2-0.5	ไม่พบ	3.3-5.0	0.2
ถั่วพู	< LLOQ	0.2	1.4-2.9	0.2-0.4
ผักหวานป่า	0.6-1.3	< LLOQ -0.2	1.1-2.6	0.8-1.8
ผักกะเจต	ไม่พบ	ไม่พบ	0.4-0.7	1.3-1.5
ยอดกระถิน	0.2-0.5	< LLOQ -0.1	0.1-0.3	1.6-6.2
ชะอม	ไม่พบ	0.0-0.8	0.1-0.2	1.8-3.5
ตำลึง	ไม่พบ	ไม่พบ-0.1	0.9-4.7	0.6-1.5
ใบบัวบก	ไม่พบ	ไม่พบ	1.2-2.1	0.2-0.3
ผักปลัง(ขาว)	7.8-10.1	ไม่พบ-< LLOQ	0.6-1.2	0.2-0.4
ผักพาย (ผักก้านจอง)	7.8-10.1	ไม่พบ-0.2	1.2-2.0	0.6-0.7
ผักแพว (ผักไผ่)	ไม่พบ-< LLOQ	< LLOQ	0.1	0.1-0.2
มะเขือเปราะ	0.0-0.1	ไม่พบ	< LLOQ	0.4-0.5

ผลจากตารางจะเห็นว่าผักที่นำมาวิเคราะห์ทั้งหมดจัดเป็นประเภทอาหารที่พิวรีนต่ำ โดยที่ อาหารที่มีพิวรีนสูง หมายถึงอาหารที่มีปริมาณพิวรีนมากกว่าหรือเท่ากับ 400 มิลลิกรัมต่อ 100 กรัม อาหารที่มีพิวรีนปานกลาง หมายถึงอาหารที่มีปริมาณพิวรีน 100 - 400 มิลลิกรัมต่อ 100 กรัม) และอาหารที่มีพิวรีนต่ำ หมายถึงอาหารที่มีปริมาณพิวรีนน้อยกว่าหรือเท่ากับ 100 มิลลิกรัมต่อ 100 กรัม

5.6 ข้อดีและข้อเสียของวิธี LC-MS/MS triple quadrupole ที่พัฒนาขึ้น

วิธี LC-MS/MS triple quadrupole ที่พัฒนาขึ้นเพื่อหาปริมาณพิวรีนและ uric acid ในผักชนิดต่างๆ มีข้อดีดังนี้

- มีความจำเพาะสูง (high selectivity) กว่าที่ใช้ระบบตรวจวัดชนิด UV เนื่องจากวิธีที่พัฒนาขึ้นใช้ค่าสัญญาณของ transition ions 2 ค่าที่จำเพาะของสารแต่ละชนิด โดย transition ion ชนิดหนึ่งใช้หาปริมาณ และอีกชนิดหนึ่งใช้เพื่อตรวจยืนยันชนิดของสาร ทำให้เชื่อมั่นได้ว่าค่าที่วัดได้เป็นค่าที่ถูกต้องของสารแต่ละชนิดจริง

- ค่าที่วัดได้ของตัวอย่างแต่ละชนิดมีความคงที่ ความแม่นยำของการวัดดีกว่าการใช้ระบบ mass detector ชนิด ion-trap และเมื่อเปรียบเทียบกับวิธีวิเคราะห์ทางไฟฟ้าเคมีที่มีการใช้ขั้วไฟฟ้าชนิดต่างๆ พบว่าความไว (sensitivity) ของวิธี LC-MS/MS จะคงที่มากกว่า ขณะที่วิธีไฟฟ้าเคมีโดยทั่วไป sensitivity ลดลงตามจำนวนตัวอย่างที่ตรวจวัดจึงมักพบปัญหา reproducibility ของสัญญาณไม่คงที่
- การเตรียมตัวอย่างง่าย ไม่ซับซ้อน
- ใช้ column เส้นผ่านศูนย์กลางเล็ก ใช้เวลาในการวิเคราะห์ต่อตัวอย่างเพียง 15 นาที

ข้อเสียของวิธีที่พัฒนาขึ้นมีดังนี้

- เครื่องมือมีราคาแพงเมื่อเทียบกับเครื่อง HPLC-UV, LC-MS/MS ion-trap รวมทั้งเครื่องมือวิเคราะห์ทางไฟฟ้าเคมี เมื่อคิดเป็นราคาค่าวิเคราะห์เฉลี่ยต่อตัวอย่างจึงมีค่าใช้จ่ายที่สูงกว่าวิธีอื่น
- การใช้เครื่องมือมีความซับซ้อน ต้องใช้ผู้วิเคราะห์ที่เชี่ยวชาญ
- ต้องใช้สารเคมีที่มีระดับความบริสุทธิ์สูง เนื่องจากจะเกิดสัญญาณรบกวนมากหากใช้สารเคมีทั่วไป

บทที่ 6

สรุปผล

ในโครงการวิจัยนี้ได้ทำการพัฒนาวิธีโครมาโตกราฟีทั้งหมด 3 วิธี เพื่อหาปริมาณพิวรีนและกรดยูริกในผักพื้นบ้านไทย วิธีทั้งสามคือ วิธีไฮเพอร์ฟอร์แมนลิดิตโครมาโตกราฟีระบบตรวจวัด UV (HPLC-UV) วิธีลิดิตโครมาโตกราฟีแมสสเปคโตเมตรีชนิด ion-trap และ วิธีลิดิตโครมาโตกราฟีแมสสเปคโตเมตรีชนิด triple quadrupole ผลการศึกษาพบว่าวิธีที่ประสบความสำเร็จคือวิธีลิดิตโครมาโตกราฟีแมสสเปคโตเมตรีชนิด triple quadrupole ระบบการ ionization แบบ electrospray สามารถตรวจวัดสารพิวรีน 3 ชนิดคือ adenosine, guanosine, hypoxanthine และ uric acid ได้โดยใช้สาร caffeine เป็นสารมาตรฐานภายใน (internal standard) ทำการตรวจสอบเพื่อยืนยันความใช้ได้ของวิธี (method validation) ตามเกณฑ์ของ สำนักงานคณะกรรมการอาหารและยาสหรัฐอเมริกา (USFDA) เนื่องจากเป็นเกณฑ์มาตรฐานที่นิยมใช้และเป็นที่ยอมรับ หัวข้อที่ทำการศึกษาคือ accuracy, precision, recovery, matrix effect, linearity, lower limit of quantitation และ stability โดยใช้หัวหอมใหญ่เป็นตัวอย่าง blank ผลการศึกษาพบว่าค่าต่างๆเป็นไปตามเกณฑ์มาตรฐานที่ยอมรับได้ แสดงว่าวิธีที่พัฒนาขึ้นสามารถนำไปใช้ตรวจปริมาณพิวรีนและกรดยูริกได้ตามวัตถุประสงค์

นำวิธีลิดิตโครมาโตกราฟีแมสสเปคโตเมตรีชนิด triple quadrupole ที่พัฒนาขึ้นและผ่านการศึกษา method validation แล้วไปตรวจสอบปริมาณพิวรีนและกรดยูริกในผักพื้นบ้านไทยจำนวน 16 ชนิดคือ ถั่วฝักยาว แตงกวา ผักกาดขาว ถั่วงอก ผักบุ้งจีน ถั่วพู ผักหวานป่า ผักกะเจต ยอดกระถิน ชะอม ตำลึง ใบบัวบก ใบบัวบก ผักปลัง ผักพาย (ผักก้านจอง) ผักแพว (ผักไผ่) มะเขือเปราะ โดยผักแต่ละชนิดซื้อมาจากตลาด 3 แห่งในกรุงเทพมหานคร ผลการตรวจพบว่าผักแต่ละชนิดมีปริมาณพิวรีนและกรดยูริกแตกต่างกัน และผักชนิดเดียวกันที่มาจากต่างแหล่งก็มีปริมาณพิวรีนและกรดยูริกที่แตกต่างกันบ้าง ความแตกต่างนี้อาจมีสาเหตุมาจากแหล่งปลูก และระยะเวลาเก็บเกี่ยวผลผลิตต่างกัน อย่างไรก็ตามเมื่อจัดกลุ่มตามเกณฑ์ของพิวรีนและกรดยูริกในอาหารแล้ว พบว่าผักทุกชนิดจัดอยู่ในกลุ่มอาหารที่มีพิวรีนและกรดยูริกน้อย ผู้ป่วยเก๊าท์และผู้ที่มีความเสี่ยงสูงสามารถบริโภคผักพื้นบ้านไทยได้

เอกสารอ้างอิง

1. Perez-Ruiz F, Dalbeth N, Bardin T. A review of uric acid, crystal deposition disease, and gout. *Adv. Ther.* (2015), 32: 31-41.
2. Poelzer C, Hildebrand KA. Gout of the wrist. *Journal of the American Society for surgery of the hand* (2004), 4: 256-265.
3. Fox IH. Metabolic basis for disorders of purine nucleotide degradation. *Metabolism* (1981), 30: 616-634.
4. Kim KY, Schumacher HR, Hunsche E, Wertheimer AI, Kong SX. A literature review of the epidemiology and treatment of acute gout. *Clinical Therapeutics* (2003), 25: 1593-1617. *Clin Ther.*
5. Zhao J, Liang Q, Luo G, Wang Y, Zuo Y, Jiang M, Yu G, Zhang T. Purine metabolites in gout and asymptomatic hyperuricemia: Analysis by HPLC-electrospray tandem mass spectrometry. *Clin Chem.* (2005), 51: 1742-1744.
6. Choi HK, Liu S, Curhan G. Intake of purine-rich foods, protein, and dairy products and relationship to serum levels of uric acid. *Arthritis Rheum.* (2005), 52: 283-289.
7. Kaneko K, Yamanobe T, Fujimori S. Determination of purine contents of alcoholic beverages using high performance liquid chromatography. *Biomed Chromatogr.* (2009), 23: 858-864.
8. Kim KM, Henderson GN, Ouyang X, Frye RF, Sautin YY, Feig DI, Johnson RJ. A sensitive and specific liquid chromatography-tandem mass spectrometry method for the determination of intracellular and extracellular. *J Chromatogr B.* (2009), 877: 2032-2038.
9. Zhang F, Wang Z, Zhang Y, Zheng Z, Wang C, Du Y, Ye W. Simultaneous electrochemical determination of uric acid, xanthine and hypoxanthine based on poly(L-arginine)/grapheme composite film modified electrode. *Talanta* (2012), 93: 320-325.
10. Wang Y. Simultaneous determination of uric acid, xanthine and hypoxanthine at poly (pyrocatechol violet)/functionalized multi-walled carbon nanotubes composite film modified electrode. *Colloid surface B.* (2011), 88: 614-621.
11. Revin SB, John SA. Selective determination of inosine in the presence of uric acid and hypoxanthine using modified electrode. *Anal Biochem.* (2012), 421: 278-284.
12. Wang Y, Tong LL. Electrochemical sensor for simultaneous determination of uric acid, xanthine and hypoxanthine based on poly (bromocresol purple) modified glassy carbon electrode. *Sensor Actuat B.* (2010), 150: 43-49.

13. Yang H, Zhang J, Liu G, Zhang P. Measurment of purines and uric acid simultaneous in meat with high performance liquid chromatographys. *Journal of hygiene research*. (2012), 41: 303-306.
14. Steinmann D, Ganzera M. Recent advances on HPLC/MS in medicinal plant analysis. *J Pharm Biomed Anal*.(2011), 55: 744-757.
15. Kaneko K, Aoyagi Y, Fukuuchi T, Inazawa K, Yamaoka N. Total purine and purine base content of common foodstuffs for facilitating nutritional therapy for gout and hyperuricemia. *Biol Pharm Bull*. (2014), 37: 709-721.
16. USFDA Guidance for industry bioanalytical method validation 2013.
<http://www.fda.gov/downloads/drugs/guidancecomplianceregulatoryinformation/guidances/ucm368107.pdf> Accessed on February 24, 2015.

ภาคผนวก 1

ตารางเปรียบเทียบกิจกรรมที่วางแผน กิจกรรมที่ดำเนินจริง และผลที่ได้รับ

เดือนที่	กิจกรรมที่วางแผนไว้	กิจกรรมที่ดำเนินการ	ผลที่ได้รับ
1 เดือนที่ 6	พัฒนาวิธีการสกัดและวิธี LC/MS สำหรับการแยกสารพิวรีนและกรดยูริกในพืชผัก	ได้วิธีการสกัดและวิธี LC/MS สำหรับการแยกสารพิวรีนและกรดยูริกในพืชผัก	ทราบข้อมูลการสกัดด้วยน้ำแบบใช้และไม่ใช้ความร้อน และได้วิธีการวิเคราะห์ด้วย HPLC ที่สามารถประยุกต์ใช้กับ LC/MS ได้ต่อไป
2 เดือนที่ 6	ตรวจสอบความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์ที่พัฒนาขึ้นและวิเคราะห์ปริมาณ สารพิวรีนและกรดยูริกในผักพื้นบ้าน 5 ตัวอย่าง โดยพารามิเตอร์ที่จะศึกษาคือ accuracy, precision, linearity, selectivity และ stability	ทราบข้อมูลปริมาณสารพิวรีนและกรดยูริกในผักพื้นบ้าน 5 ตัวอย่าง	ได้วิธี LC-MS ในการวิเคราะห์ปริมาณสารพิวรีนและกรดยูริกในตัวอย่างผัก และได้ผลเบื้องต้นของการตรวจสอบความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์
เดือนที่ 63	วิเคราะห์ปริมาณ สารพิวรีนและกรดยูริกในผักพื้นบ้าน 5 ตัวอย่าง	ทราบข้อมูลปริมาณสารพิวรีนและกรดยูริกในผักพื้นบ้าน 5 ตัวอย่าง	ได้ผลการตรวจสอบความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์ปริมาณสารพิวรีนและกรดยูริกโดยวิธี LC-MS/MS triple quadrupoles และทราบข้อมูลปริมาณสารพิวรีนและกรดยูริกในผักพื้นบ้าน 7 ตัวอย่าง
เดือนที่ 64	วิเคราะห์ปริมาณ สารพิวรีนและกรดยูริกในผักพื้นบ้าน 5 ตัวอย่าง และประมวลผลข้อมูลสารพิวรีนและกรดยูริกในผักพื้นบ้านทั้งหมด	ทราบข้อมูลปริมาณสารพิวรีนและกรดยูริกในผักพื้นบ้านทั้งหมด	ได้ข้อมูลปริมาณสารพิวรีนและกรดยูริกในผักพื้นบ้านทั้งหมด ชนิด 16

ภาคผนวก 2 บทความที่เผยแพร่

Pure and Applied Chemistry International Conference 2015 (PACCON2015)

DEVELOPMENT OF HIGH-PERFORMANCE LIQUID CHROMATOGRAPHY MASS SPECTROMETRY FOR DETERMINATION OF PURINES AND URIC ACID IN THAI VEGETABLES

Narisa Rukdee¹, Piyanuch Rojsanga¹ and Chutima Matayatsuk Phechkrajang^{1,2*}

¹Department of Pharmaceutical Chemistry, Faculty of Pharmacy, Mahidol University, Bangkok, 10400, Thailand

²Center of Excellence for Innovation in Drug Design and Discovery, Faculty of Pharmacy, Mahidol University, Bangkok, 10400, Thailand

* E-mail for Corresponding Author; E-mail: chutima.mat@mahidol.ac.th, Tel. +66 2644 8695, Fax. +66 2644 8695

Abstract: Purines and uric acid are causative of gout disease. This study is aimed at developing new and rapid methods for determining purines and uric acid in Thai vegetables using a high-performance liquid chromatography with UV detector (HPLC-UV) and a liquid chromatography ion-trap mass spectrophotometry (LC-MS). For HPLC-UV method, Chromolith C18 column (4.6 × 100 mm) and UV detector setting at 284 nm were used throughout the study. Type and concentration of organic solvents were evaluated to obtain an appropriate mobile phase condition. Accordingly, the optimum separation was achieved from the mixture of 10 mM ammonium acetate, pH 2.5 and methanol (97:3, v/v). Using ion-trap LC-MS technique, a mixture of 0.1% formic acid and acetonitrile with gradient elution was exploited as mobile phase condition. Five intended compounds (adenosine, guanosine, hypoxanthine, xanthine and uric acid) were well separated and detected under this condition. Results obtained from this study would be enormously valuable to the treatment of gout disease.

1. Introduction

Daily meal is an important factor of health. In addition, when human is subjected to some diseases, controlling of foods is necessary to control the symptoms. For example, gout disease causes from increasing of uric acid in human body. Elevating of uric acid causes from wrong metabolism of purines pathway, exceed synthesized uric acid will deposit in joints and leading to inflame, red swollen of the joint and pain [1-2].

Purine is the common name of purine bases, nucleotides and nucleosides. In human body, purines can be metabolized to uric acid by using enzyme xanthine oxidase. Various Thai vegetables, especially the shoot part, have been reported for high containing of purines. Such vegetables should be limit consumed in gout patients. However, there was not official report of purines and uric acid in Thai vegetables. By these reasons, this study was conducted to contribute valuable information for controlling gout symptoms.

There were reports for quantitative determination methods of purines and uric acid. Liquid-chromatography mass spectrophotometry (LC-MS) was used to quantify purines and uric acid in Japanese soup, beer, Chinese cabbage, potato and beef [3-6].

High-performance liquid chromatography (HPLC) was also used to determine purines and uric acid in meat, alcoholic beverage, vegetarian meat, soy bean, and mushroom [7-10]. Although HPLC is the basic instrument in general laboratories, certain and expensive columns were used in these studies. In this research, a simple HPLC-UV method was developed for determination of purines and uric acid by using C18 column. An ion-trap LC-MS method was also developed to determine such compounds. The optimum HPLC-UV and LC-MS methods will be further validated and used to quantify purines and uric acid in Thai vegetables.

2. Materials and Methods

A Shimadzu LC-10AD system equipped with UV detector was employed for chromatographic separation on a Chromolith C18 column (4.6 × 100 mm). A mixture of 10 mM ammonium acetate buffer, pH 2.5 and methanol (97:3, v/v) was used as a mobile phase. The flow rate of mobile phase was 0.5 mL/min. The UV detector wavelength was set at 284 nm. Standards purines (adenosine, guanosine, hypoxanthine, xanthine), uric acid, dextrometophan HBr and ammonium acetate were purchased from Sigma Chemical, methanol (HPLC grade) was purchased from Labscan (Thailand). For LC-MS ion-trap system, a Thermo LCQ Fleet equipped with Symmetry C18 column (4.6 × 150 mm, 5µm) was used. A gradient program was applied consisting of A) 0.2 % formic acid in deionized water; B) 0.1% formic in methanol (HPLC grade). The gradient started with a 8 min initial equilibration with 2% of solvent B, then increased to 90% in 0.1 min, and held for 4.9 min to elute strongly retained analytes and clean the column. Finally, solvent B was decreased to 2% within 0.1 min and held for 1.9 min. Flow rate was set at a constant 300 µL/min for the whole run and 10 µL of sample was injected. Electrospray ionization (ESI) was utilized, spray voltage was 5.00kV, capillary temperature was 350.0° C, capillary voltage was 26.00V and tube lens was set at 70.00V. Dextrometophan HBr was used as an internal standard for LC-MS experiment.

3. Results and Discussion

3.1 Development of HPLC-UV method

Chromolith C18 column and UV detector setting at 284 nm were utilized to develop HPLC-UV method for determination of four purines and uric acid (Figure 1). The starting mobile phase was the mixture of 10 mM ammonium acetate, pH 4.5 and acetonitrile. The ratio of acetonitrile was varied between 5 and 40 % (v/v). The separation was performed using isocratic elution. It was found that the interest compounds were not completely separated, and the retention times of five compounds were almost the same in these mobile phase conditions.

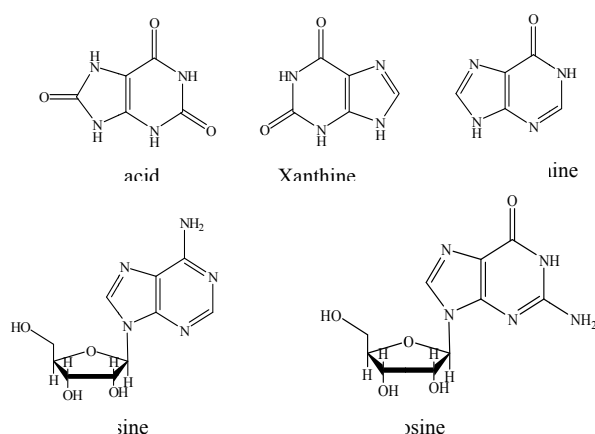


Figure 1. Chemical structures of purines and uric acid

This might be due to the pH of mobile phase was not allowed an appropriate separation. The pH of mobile was further adjusted to 2.5 and concentration of acetonitrile was 5 % by volume. The resulting chromatograms were improved, but acceptable resolutions of all compounds were not achieved yet. Methanol was then used instead of acetonitrile. The separation was better but the separation was still not complete with 5% methanol by volume. Finally, methanol was reduced to 3% by volume and acceptable results were achieved in this condition. The chromatograms obtained from the optimum condition are illustrated in Figure 2.

3.2 Development of Ion-trap LC-MS method

Mobile phase from HPLC-UV system, 10 mM ammonium acetate, pH 2.5 and methanol, was transferred to LC-MS condition. However, MS noise signal was found to be interfered with ammonium acetate, therefore deionized water adjusted to pH 2.5 was used instead of ammonium acetate. In addition, formic acid was added in both mobile solvent to promote solvent volatilization. The collision induced dissociation or CID was adjusted to obtain the dominate transition ions of each compound because the transition ions will be used for quantitative determination. Unfortunately, the study failed to find the major transition ion of hypoxanthine. This may be due to the fact that molecular weight of hypoxanthine

is too low (MW.135) so it was hard to get the major transition ion after fragmentation.

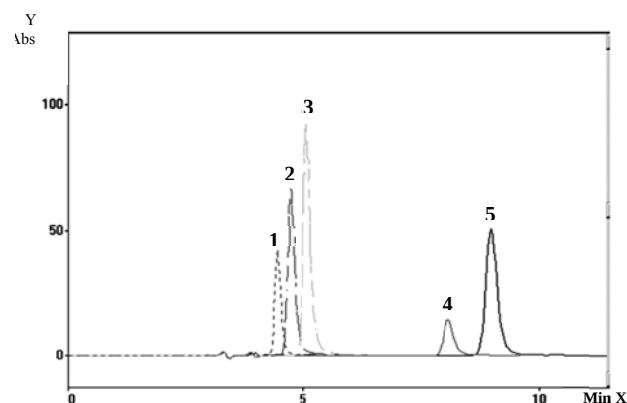


Figure 2. Overlaid chromatograms of uric acid and purine compounds. Column Chromolith C18, (4.6 x 100 mm); mobile phase, 10 mM ammonium acetate buffer, pH 2.5 : methanol (97:3, v/v); flow rate, 0.5 mL/min; injection volume, 20 μ L; detection, 284 nm. Peak 1, uric acid; peak 2, hypoxanthine; peak 3, xanthine; peak 4, adenosine; peak 5, guanosine.

Therefore, only four compounds namely, uric acid, xanthine, adenosine and guanosine, were investigated for LC-MS method development. Dextromethorphan was used as internal standard. For ionization mode, it was found that uric acid and xanthine might be ionized in negative ion mode while adenosine, guanosine and dextromethorphan were ionized in positive ion mode. By using the condition described above, five compounds were eluted between 5.0-12.5 min. The retention times, transition ions and CID energy are summarized in Table 1. Chromatograms of transition ions are shown in Figure 3.

Table 1. The retention times, transition ions and CID energy

Compounds	Retention time (min)	Transition	CID (eV)
Uric acid	5.07	167>>124	33
Xanthine	6.39	151>>108	30
Adenosine	7.89	268>>136	28
Guanosine	10.78	284>>152	22
Dextromethorphan	12.37	272>>215	40

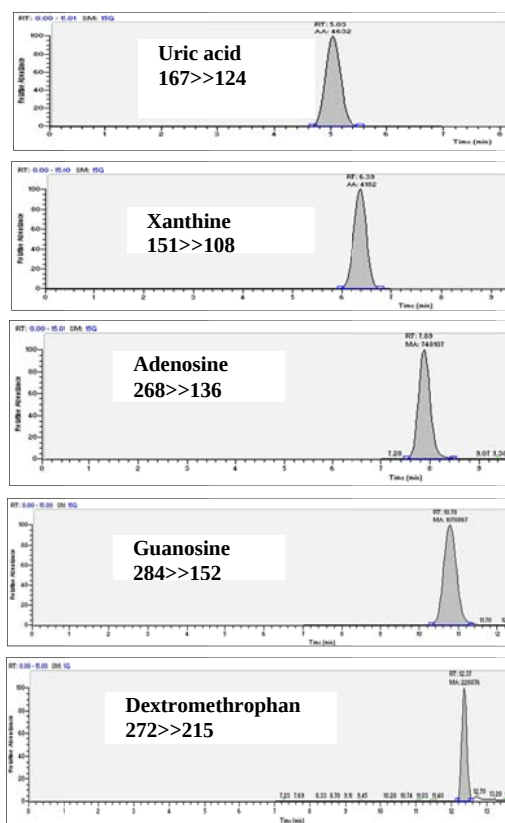


Figure 3. Chromatograms of transition ions.

4. Conclusions

A simple HPLC-UV and ion-trap LC-MS were successfully developed for the determination of purines (xanthine, adenosine and guanosine) and uric acid. The developed methods will be validated for intend purpose and further applied to quantify purines and uric acid in Thai vegetables. The information from the study will contribute to the treatment of gout disease.

Acknowledgements

The authors would like to thank The Thailand Research Fund (RDG 5620011) and the Department of Pharmaceutical Chemistry, Faculty of Pharmacy, Mahidol University for research facilities.

References

- [1] Havroslav, J., Plachy, V., Fernandez, J. and Rada, V., 2010, *J sci Food Agric.*, 90, 2352- 2357.
- [2] Cooper, N., Khosravan, R., Erdmann, C., Fiene, J and Lee, J.W., 2006, *J Chromatogr B.*, 837, 1-10.
- [3] Yamaoka, N., Kudo, Y., Inazawa, K., et. al., 2010, *J Chromatogr B.*, 878, 2054-2060.
- [4] Tabilo, G., Flores, M., Fiszman, S.M. and ToldraÂ, F., 1999, *Meat Science.*, 51, 255-260.
- [5] Zhao, J., Liang, O., Luo, G., et.al., 2005, *Clin. Chem.*, 51(9), 1742-1744.
- [6] Inazawa, K., Sato, A., Kato, Y., et. al., 2014, *Nucleosides, Nucleotides and Nucleic Acids.*, 33(4-6), 439-444.

- [7] Clariana, M., Gratacos-Cubarsi, M., Hortos, M., Garcia-Regueiro, J.A. and Castellari, M., 2010, *J Chromatogr A.*, 1217, 4294-4299.
- [8] Kaneko, K., Yamanobe, T. and Fujimori, S., 2009, *Biomed Chromatogr.*, 23, 858-864.
- [9] Kaneko, K., Kudo, Y., Yamanobe, T., et. al., 2008, *Nucleosides, nucleotide, and nucleic acids.*, 27, 628-630.
- [10] Yang, H., Zhang, J., Liu, G. and Zhang, P., 2012, *Wei Sheng Yan Jiu.*, 41(2), 303-306.