การตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์สารแกมมาอะมิโนบิวเทอริกเอซิดในข้าวกล้องงอก

Method Validation of Gamma-aminobutyric acid (GABA) in germinated rice

■ พุทธลักษณ์ ไขประภาย[1] นภัสพร ชื่นรัตน์[1]
Putaluk Khaiprapai[1], Naphatsaphone Chuenrat[1]
มาลัย เมืองน้อย[1] พัชรี ตั้งตระกูล[1]
Malai Muangnoi[1] Patcharee Tungtrakul[1]

Abstract

Method validation of Gamma-aminobutyric acid (GABA) in germinated rice by determination of GABA Dabsyl-Cl derivatize agent using precolumn derivatization RP-HPLC (UV detector at 465 nm) technique was demonstrated. The percent of recovery was 99.98 , Limit of detection (LOD) and Limit of quantitation (LOQ) were 0.60 and 0.80 mg/100g sample , respectively . Moreover , the AOAC and Codex standard acceptance of precision validation of the results was less than 2 by HARRAT Equation method which is acceptable by AOAC and Codex standard on validation range of GABA 0.80-40 mg/100 g sample.

บทคัดย่อ

ได้ทดสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์สารแกมมาอะมิโนบิวเทอริกเอซิด *(Gamma- aminobutyric acid : GABA)* ในข้าวกล้องงอก โดยวิเคราะห์สารอนุพันธ์ GABA Dabsyl-Cl ด้วยเทคนิค precolumn derivatization RP-HPLC *(UV detector)* ที่ความยาวคลื่น 465 นาโนเมตร พบว่ามีร้อยละการคืนกลับ *(% Recovery)* 99.98 ขีดจำกัดของการตรวจพบ *(Limit of detection, LOD)* และ ขีดจำกัดของการวัดเชิงปริมาณ *(Limit of quantitation, LOQ)* เท่ากับ 0.60 และ 0.80 มิลลิกรัม/100กรัม ตามลำดับ ผลการทดสอบความเที่ยงตรง *(Precision)* ของวิธีวิเคราะห์ที่ระดับความเข้มข้นของปริมาณสาร GABA ตั้งแต่ 0.80-40 มิลลิกรัม/100กรัม ด้วยสมการ HARRAT พบว่าน้อยกว่า 2 ซึ่งอยู่ในเกณฑ์การยอมรับตามมาตรฐาน AOAC และ Codex

Keywords : GABA / Method Validation / High Performance Liquid Chromatography : HPLC

[1] *สถาบันค้นคว้าและพัฒนาผลิตภัณฑ์อาหาร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์*
[1] *Institute of Food Research and Product Development , Kasetsart University*

บทนำ

สารแกมมาอะมิโนบิวเทอริกเอซิด *(γ-aminobutyric acid : GABA)* เป็นสารสื่อประสาท *(neurotransmitter)* ในระบบประสาทส่วนกลางที่สร้างมาจาก glutamate ในเนื้อเยื่อของสมอง แต่ในธรรมชาติพบมากเมื่อนำข้าวกล้องมาแช่น้ำเพื่อทำให้งอกหรือเรียกว่าขณะจมูกข้าวกำลังงอก จะทำให้ข้าวกล้องมีสาร GABA เพิ่มขึ้น ซึ่งนอกจากจะได้ประโยชน์จากการที่มีปริมาณสารอาหารเพิ่มขึ้นแล้ว ยังทำให้ข้าวกล้องงอกที่หุงสุกมีเนื้อสัมผัสที่อ่อนนุ่มอีกด้วย GABA นอกจากมีบทบาทสำคัญในการทำหน้าที่เป็นสารสื่อประสาทในระบบประสาทส่วนกลางประเภทสารยับยั้ง *(inhibitor)* แล้วยังทำหน้าที่รักษาสมดุลในสมองที่ได้รับการกระตุ้นซึ่งช่วยทำให้สมองเกิดการผ่อนคลายและนอนหลับสบาย อีกทั้งยังทำหน้าที่ช่วยกระตุ้นต่อมไร้ท่อ *(anterior pituitary)* ซึ่งทำหน้าที่ผลิตฮอร์โมนที่ช่วยในการเจริญเติบโต *(HGH)* ทำให้เกิดการสร้างเนื้อเยื่อ กล้ามเนื้อเกิดความกระชับและเกิดสาร lipotropic ซึ่งเป็นสารป้องกันการสะสมไขมัน ข้อมูลผลการศึกษาวิเคราะห์หลายแหล่งยืนยันตรงกันว่าในข้าวกล้องงอก *(Germinated rice)* เป็นแหล่งที่อุดมไปด้วยสาร GABA ในปริมาณสูง ทั้งนี้ เทคนิควิธีการวิเคราะห์ที่แตกต่างกัน จะมีผลต่อข้อมูลปริมาณ GABA ที่ไม่แน่นอนแม้ว่าจะเป็นตัวอย่างชนิดเดียวกันจึงมีความจำเป็นที่ต้องศึกษาเทคนิคการวิเคราะห์ที่สามารถใช้เป็นมาตรฐานน่าเชื่อถือและยอมรับได้

GABA จัดเป็นกรดอะมิโนที่ไม่จำเป็น *(non-essential amino acid)* มีสูตรโมเลกุล C4H9NO2 *(Figure 1)* โดย GABA เป็นผลิตผลจากกระบวนการ decarboxylation ของกรดกลูตามิก

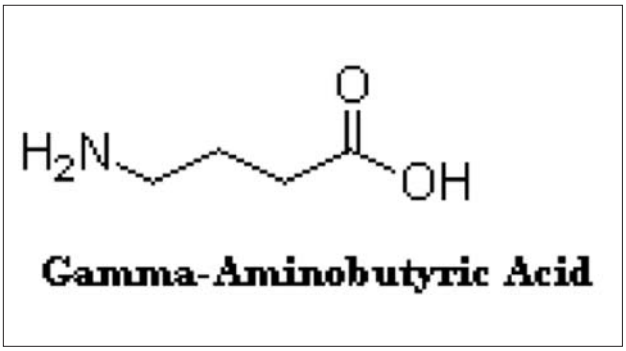

Figure 1 GABA Formular structure
ที่มา : http://en.wikipedia.org/wiki/Gamma-Aminobutyric_acid

เนื่องจาก GABA รวมทั้งกรดอะมิโนทุกชนิดไม่สามารถดูดกลืนแสงในช่วงความยาวคลื่น 400-700 nm *(visible light)* ได้ จึงเป็นการยากที่จะวิเคราะห์หาปริมาณด้วยเทคนิคสเปกโตรโคมาโตกราฟี แต่จากข้อมูลพื้นฐานพบว่าโครงสร้างของกลุ่มกรดอะมิโนมีกลุ่มฟังก์ชั่นเอมีน *(-NH2)* ซึ่งมีไนโตรเจนเป็นองค์ประกอบสามารถทำปฏิกิริยากับสารประกอบอื่น เช่น สารสร้างอนุพันธ์ *(derivatized agent)* ที่มีคุณสมบัติเปลี่ยนโครงสร้างของโมเลกุลหรือเปลี่ยนคุณสมบัติความมีขั้วของสารที่ต้องการวิเคราะห์ *(analyte)* หรือเปลี่ยนแปลงสารผสมอื่น *(Matrix)* ที่อยู่ในตัวอย่าง เพื่อให้การแยกดีขึ้น อีกทั้งยังเพิ่มความคงตัวของสารที่ต้องการวิเคราะห์

เทคนิค pre-column derivatization เป็นการทำปฏิกิริยาสร้างอนุพันธ์ *(derivatization)* ก่อนที่จะมีการวิเคราะห์นำ ซึ่งเป็นวิธีที่ใช้กันโดยทั่วไปสำหรับโมเลกุลสารที่มีขนาดเล็ก เช่น กรดอะมิโน *(amino acids)* ผลิตภัณฑ์จะเกิดเป็นสารประกอบที่มีคุณสมบัติดูดกลืนแสงช่วงที่ตามองเห็น *(visible light)* และวัดค่าความเข้มของแสงที่ถูกดูดกลืนได้ โดยปริมาณความเข้มสีจะผันตามปริมาณสาร Fuerst และคณะ*(1990)*, Sarwar และ Botting *(1993)* และ Fisher และ คณะ *(2001)* พบว่าเทคนิค pre-column derivatization โดยสารสร้างอนุพันธ์ได้แก่ dansyl chloride, phenylisothiocyanate, fluorenylmethyl chloroformate, OPA และ dabsyl chloride สามารถช่วยแยกสารที่ต้องการวิเคราะห์ด้วยเทคนิคโครมาโตกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง *(HPLC)* ได้ Chang *(1983)* ใช้ 4-dimethylaminoazobenzene-4-sulfonyl chloride *(Dabsyl-Cl)* ซึ่งมีคุณสมบัติในการทำปฏิกิริยากับหมู่ฟังก์ชั่น primary amine และ secondary amine ในโครงสร้างกรดอะมิโน เพื่อทำให้เกิดเป็นสารประกอบที่สามารถดูดกลืนแสงช่วงที่ตามองเห็น และสามารถตรวจวัดเชิงคุณภาพและปริมาณสารที่สนใจได้ด้วยเทคนิคทางโครมาโตกราฟี ซึ่งเทคนิคนี้มีการนำมาใช้เพื่อวิเคราะห์หาปริมาณกรดอะมิโนและองค์ประกอบในตัวอย่างที่เป็นเนื้อเยื่อและของเหลวในร่างกาย *(Watanbe และคณะ(1992)*, Jansen และคณะ *(1991)*, Krause และคณะ *(1995)*, Vendrell และ Aviles *(1986)*

คณะผู้วิจัยจึงมีแนวคิดนำวิธีวิเคราะห์มาพัฒนาดัดแปลงกับตัวอย่างที่เป็นข้าวกล้องงอกซึ่งอุดมไปด้วยสาร GABA ทั้งนี้การพัฒนาดัดแปลงวิธีจากวิธีต้นแบบมาใช้กับผลิตภัณฑ์อื่น ซึ่งมีความแตกต่างกันทั้งลักษณะตัวอย่าง อุปกรณ์ เครื่องมือวัด สถานที่ และบุคคลที่ทำการวิเคราะห์ จึงจำเป็นต้องสร้างความมั่นใจในผลการวิเคราะห์และยืนยันตามขั้นตอนและวิธีการว่ามีความถูกต้องแม่นยำ สามารถนำมาดัดแปลงใช้ได้จริงเพื่อเป็นข้อมูลและแนวทางสำหรับการจัดทำวิธีมาตรฐาน โดยอ้างอิงขั้นตอนการยืนยันผลตามระบบมาตรฐานสากล ประกอบด้วยวิธีการยืนยันช่วงของการวัด *(Working Range)* และความเป็นเส้นตรง *(Linearity)* ความแม่นยำ *(Accuracy)* ความเที่ยงตรง *(Precision)* และขีดจำกัดของการตรวจพบ *(Limit of detection, LOD)* และขีดจำกัดของการวัดเชิงปริมาณ *(Limit of quantitation, LOQ)* ของสาร GABA

อุปกรณ์และวิธีการ

1. สารเคมีและวิธีเตรียม

สารเคมี ได้แก่ สารมาตรฐาน GABA *(γ-Aminobutyric acid)* purity > 99% , Dabsyl-Cl (4-Dimethylaminoazobenzene-4-sulfonyl chloride ,Ethanol HPLC Grade และ Acetonitrile HPLC Grade

1.1 วิธีเตรียมสาร 3.98 mM Dabsyl-Cl *(4-Dimethylaminoazobenzene-4-sulfonyl chloride)* เตรียมโดย ชั่ง Dabsyl-Cl หนัก 0.00129 กรัม ละลายใน Acetonitrile HPLC grade ปริมาตร 1 มิลลิลิตร

1.2 วิธีเตรียมสาร 3% Sulfosalicylic acid เตรียมโดย ชั่ง 5-Sulfosalicylic acid dihydrate หนัก 3 กรัม ลงในขวดปรับปริมาตร ขนาด 100 มิลลิลิตร เติมน้ำกลั่นปรับปริมาตรให้ได้ 100 มิลลิลิตร

1.3 วิธีเตรียมสาร 0.01 M Sodium hydrogen carbonate *($NaHCO_3$)* ปริมาตร 25 มิลลิลิตร เตรียมโดย ชั่ง $NaHCO_3$ หนัก 0.21 กรัม ลงในขวดปรับปริมาตร ขนาด 25 มิลลิลิตร เติมน้ำกลั่นปรับปริมาตรให้ได้ 25 มิลลิลิตร

1.4 วิธีเตรียมสาร 0.025 M Potassium dihydrogen phosphate *(KH_2PO_4)* pH 6.8 ปริมาตร 50 มิลลิลิตร เตรียมโดยชั่ง KH_2PO_4 หนัก 0.1702 กรัม ลงในบีกเกอร์ขนาด 50 มิลลิลิตร เติมน้ำกลั่น 30 มิลลิลิตร กวนจนละลายปรับ pH ให้ได้ 6.8 ด้วย 10% KOH แล้วถ่ายสารละลายที่ได้ลงใน ขวดปรับปริมาตร ขนาด 50 มิลลิลิตร และปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่น

1.5 วิธีเตรียมสาร 0.025 M Sodium Acetate *(CH_3COONa)* pH 6.8 ปริมาตร 1 มิลลิลิตร เตรียมโดยชั่ง CH_3COONa หนัก 2.0507 g ลงในบีกเกอร์ เติมน้ำกลั่นละลายสารเทลงในบีกเกอร์ขนาด 1000 มิลลิลิตร และเติมน้ำกลั่นเพิ่มลงไปให้ถึงประมาณ 800 มิลลิลิตร) ปรับ pH ให้ได้ 6.8 ด้วยกรดอะซิติกเจือจาง และถ่ายสารละลายที่ได้ลงใน ขวดปรับปริมาตร ขนาด 1000 มิลลิลิตร และปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่น

2. เครื่องมือและอุปกรณ์

- เครื่อง High Performance Liquid Chromatography *(HPLC)* ยี่ห้อ Agilent Technologist รุ่น 1200 series
- เครื่องอุลตราโซนิก *(Ultrasonic)*
- เครื่องปั่นเหวี่ยงแบบตกตะกอน *(Centrifuge)*
- เครื่องชั่งน้ำหนักแบบละเอียด 4 ตำแหน่ง
- อ่างควบคุมอุณหภูมิ *(Water bath)*
- เครื่องวัดความเป็นกรด-ด่าง *(pH meter)*
- เครื่องดูดจ่ายสารละลายแบบอัตโนมัติ ขนาด 5, 1 มิลลิลิตร 200 และ 20 ไมโครลิตร

3. วิธีการทดลอง

3.1 วิธีเตรียมสารละลายมาตรฐานเข้มข้น ความเข้มข้น 1000 μg/ml ชั่งสารมาตรฐาน GABA 0.05 กรัมลงใน ขวดปรับปริมาตร ขนาด 50 มิลลิลิตร เติมน้ำกลั่นปรับปริมาตรให้ได้ 50 มิลลิลิตร

3.2 วิธีการเตรียมสารละลายมาตรฐาน ปิเปตสารละลายมาตรฐานเข้มข้นปริมาตร 0.01, 0.05, 0.1, 0.2, 0.25 และ 0.5 มิลลิลิตร ลงใน ขวดปรับปริมาตร ขนาด 10 มิลลิลิตร แต่ละขวดปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่น จะได้สารละลายมาตรฐานความเข้มข้น 1, 5, 10, 20, 25 และ 50 μg/ ml ตามลำดับ

4 . ขั้นตอนการวิเคราะห์

4.1 การสกัดตัวอย่างข้าวกล้องงอก *(Figure 2)* ชั่ง ตัวอย่างที่บดละเอียดประมาณ 1.5-2.5 กรัม ลงในขวดรูปชมพู่ขนาด 125 มิลลิลิตร ปิเปตน้ำกลั่นปริมาตร 18 มิลลิลิตร และ 3% Sulfosalicylic acid ปริมาตร 2 มิลลิลิตร ลงไปและปิดปากขวดด้วย อลูมิเนียมฟอยล์ นำไปสกัดด้วยคลื่นเสียงจากเครื่องอุลตราโซนิก นาน 20 นาที เทสารละลายไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 4000 รอบต่อนาที นาน 10 นาที กรองส่วนใสที่ได้ประมาณ 1 มิลลิลิตร ด้วย 0.45 μm cellulose acetate syringe filter

Figure 2 Germinated rice sample

4.2 การเตรียมอนุพันธ์ *(Derivatisation)* ปิเปตสารละลายมาตรฐานความเข้มข้นต่างๆ และสารละลายตัวอย่างข้าวกล้องงอกปริมาตร 50 μL ลงใน microtube ขนาด 1 มิลลิลิตร แต่ละหลอด เติม 0.01 M $NaHCO_3$ ปริมาตร 50 μL และ 3.98 mM Dabsyl-Cl ปริมาตร 200 μL ลงไปตามลำดับ ปิดฝาและเขย่าด้วยเครื่องเขย่า *(vortex mixer)* ให้เข้ากัน นำไปแช่ในอ่างควบคุมอุณหภูมิที่ 70 องศาเซลเซียส นาน 10 นาที เปิดฝาเติมเอทานอลปริมาตร 0.25 มิลลิลิตร และ 0.025 M KH_2PO_4 ปริมาตร 0.25 มิลลิลิตร ปิดฝาและ เขย่า ให้เข้ากัน กรองสารละลายด้วย 0.45 μm nylon syringe filter และนำไปฉีดเข้าเครื่อง HPLC *(ดัดแปลงวิธีจาก Tadashi et al., 1998)*

4.3 สภาวะการวิเคราะห์ GABA โดยเครื่อง HPLC Column ประกอบด้วย : คอลัมน์ชนิด Supelcosil LC-DABS, เครื่องตรวจวัด : UV *(λ 465 nm)*, อุณหภูมิคอลัมน์ *(Column Temperature)* : 40 ˚C, อัตราการไหล *(Flow rate)* : 1.0 ml/min, ปริมาตรสาร *(Injection Volume)*: 5 uL, เฟสเคลื่อนที่ *(Mobile Phase)* : gradient 80% CH_3COONa : 20% ACN to 0% CH_3COONa : 100% ACN, เวลาในการเคลื่อนที่ *(Run Time)* : 25 min , เวลาหลังวิเคราะห์ *(Post Time)* : 5 min

<u>วิธีคำนวณ</u>

ปริมาณ GABA *(mg/100g)* =

$$\frac{\text{ปริมาณที่วิเคราะห์ได้เมื่อเทียบกับกราฟมาตรฐาน } (\mu g/mL) \times \text{ ปริมาตรสุดท้าย } (mL)}{\text{น้ำหนักตัวอย่าง } (g) \times 10}$$

5. การพิสูจน์ความใช้ได้ของวิธี (Method validation) (EURACHEM Guide, 1998)

แบ่งเป็น 4 ขั้นตอนได้แก่

5.1 ช่วงของการวัด และความเป็นเส้นตรง

เตรียมสารละลายมาตรฐานในรูปสารประกอบอนุพันธ์ที่มีความเข้มข้น ต่างกัน 6 ระดับ ความเข้มข้นละ 3 ซ้ำ นำไปฉีดเข้าเครื่อง HPLC และวัดสัญญาณ *(พื้นที่ใต้กราฟ, peak area)* ผลการทดลองดัง table 1 สร้างกราฟมาตรฐานโดยเขียนกราฟความสัมพันธ์ระหว่าง ระหว่างความเข้มข้นของสารมาตรฐานและพื้นที่ใต้กราฟดัง fig 1 ประเมินความเป็นเส้นตรงของกราฟมาตรฐานโดยการคำนวณหาค่าสัมประสิทธิ์ สหสัมพันธ์ *(Correlation coefficient, r)* ซึ่งค่าที่ได้ควรเข้าใกล้ 1

5.2 ความถูกต้อง *(Accuracy)*

เตรียมตัวอย่างที่เติมสารละลายมาตรฐาน *(spiked sample)* ให้มีความเข้มข้นระดับต่างๆในช่วงการวัด 3 ระดับ และวิเคราะห์ตามวิธีการวิเคราะห์ GABA ข้างต้นความเข้มข้นละ 10 ซ้ำ วิเคราะห์ unspiked sample *(ข้าวกล้องงอก)* ตามวิธีการวิเคราะห์ GABA แล้วหาค่าเฉลี่ย คำนวณร้อยละการคืนกลับจาก

$$\text{ร้อยละการคืนกลับ} = \frac{(C1 - C2) \times 100}{C3}$$

โดยที่ C1 คือ ปริมาณ GABA ที่วิเคราะห์ได้จาก spiked sample *(μg/g)* C2 คือ ค่าเฉลี่ยปริมาณ GABA ที่วิเคราะห์ได้จาก unspiked sample *(μg/g)* C3 คือ ปริมาณ GABA ที่เติมลงไป *(μg/g)* นำร้อยละการคืนกลับที่ได้มาเปรียบเทียบกับเกณฑ์การยอมรับของ The AOAC Manual for the peer Verified Methods Program *(1993)*

5.3 ความเที่ยง

เตรียม spiked sample *(ข้าวกล้องงอก)* ให้มีความเข้มข้นระดับต่างๆ ในช่วงการวัด 3 ระดับ และวิเคราะห์ตามวิธีการวิเคราะห์ GABA ข้างต้นความเข้มข้นละ 10 ซ้ำ วิเคราะห์ unspiked sample *(ข้าวกล้องงอก)* ตามวิธีการวิเคราะห์ GABA แล้วหาค่าเฉลี่ย หาปริมาณ GABA ที่วิเคราะห์ได้จริงจาก การนำค่าจาก spiked sample ลบด้วย ค่าเฉลี่ยของ unspiked sample คำนวณหาค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน *(standard deviation ; SD)* ของแต่ละความเข้มข้น และคำนวณหาค่าร้อยละของค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ *(Relative Standard Deviation ; %RSD)* ของแต่ละความเข้มข้นจาก %RSD = *(SD x 100)* / ค่าเฉลี่ยปริมาณ GABA ที่วิเคราะห์ได้จริง คำนวณหาค่า Expected %RSD ของแต่ละความเข้มข้นจาก Horwitz Equation

$$\text{Expected } \%RSD = 2^{(1-0.5\log C)} = 2C^{-0.1505}$$

เมื่อ C เป็น Concentration ratio คำนวณหาค่า HORRAT หรือ Horwitz ratio จาก

$$HORRAT = \%RSD_{lab} \ / \ \%RSD_{expected}$$

เปรียบเทียบค่า HORRAT ที่คำนวณได้กับเกณฑ์การยอมรับจาก Table 2

5.4 ขีดจำกัดของการตรวจพบ *(LOD)* และขีดจำกัดของการวัดเชิงปริมาณ *(LOQ)*

เตรียม spiked sample *(ข้าวกล้องงอก)* ให้มีความเข้มข้นระดับต่างๆ ในช่วงการวัด 3 ระดับ และวิเคราะห์ตามวิธีการวิเคราะห์ GABA ข้างต้นความเข้มข้นละ 10 ซ้ำ วิเคราะห์ unspiked sample *(ข้าวกล้องงอก)* ตามวิธีการวิเคราะห์ GABA แล้วหาค่าเฉลี่ยปริมาณ GABA ที่วิเคราะห์ได้จริงโดยนำค่าจาก spiked sample ลบด้วย ค่าเฉลี่ยของ unspiked sample คำนวณหาค่าเฉลี่ยของ GABA ที่วิเคราะห์ได้จริงและค่าความเบี่ยงเบนมาตรฐาน ของแต่ละความเข้มข้นสร้างกราฟการกระจายระหว่างค่าเฉลี่ยกับค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน โดยให้ค่าเฉลี่ยเป็นแกน X และค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานเป็นแกน Y ลากเส้นกราฟตัดแกน Y จุดตัดคือ S_b *(ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานของความเข้มข้นศูนย์)* คำนวณค่า LOD และ LOQ จาก

$$LOD = 3S_b \quad LOQ = 10S_b$$

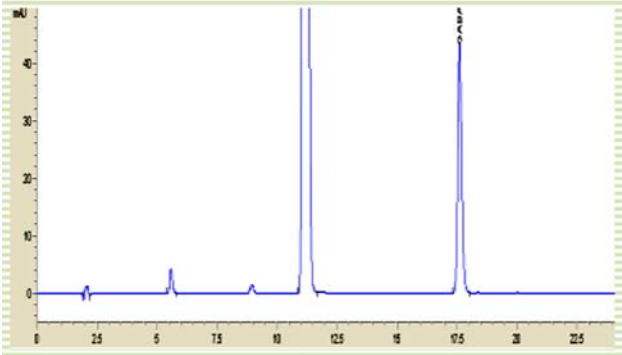

Figure 3. HPLC Chromatogram of GABA Standard Working Solution at the concentration of 50 ug/ml. System that can identify the peak based on retention time about 17.6 minute

ผลการทดลองและวิจารณ์

1. วิเคราะห์สารละลายมาตรฐาน GABA แต่ละความเข้มข้น ความเข้มข้นละ 3 ซ้ำ ด้วยเทคนิค pre-column derivatization RP-HPLC นำพื้นที่ใต้กราฟแต่ละความเข้มข้น มาสร้างกราฟ ระหว่างปริมาณความเข้มข้น *(ug/ml , แกน x)* และ พื้นที่ใต้กราฟแกน y เพื่อหาความสัมพันธ์เชิงเส้นตรง และพิสูจน์ความสัมพันธ์เชิงเส้นตรง โดยใช้ค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ r = 0.999 ซึ่งอยู่ในเกณฑ์การยอมรับ คือ ≥ 0.995 แสดงว่า ที่ระดับความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐาน GABA 1-50 µg/ml มีความเป็นเส้นตรงที่อยู่ในเกณฑ์ยอมรับ ดัง Table 1 และ Figure 4 พบว่า

การเตรียมอนุพันธ์สาร GABA เพื่อเปลี่ยนแปลงกลุ่มสารสำคัญในโครงสร้าง *(เปลี่ยนหมู่ฟังก์ชั่น)* เพื่อให้คุณสมบัติของสารเหมาะสมต่อการวิเคราะห์ โดยการปรับเปลี่ยนส่วนโครงสร้างที่เรียกว่า primary amine ของ GABA ด้วย Dasyl-Cl ก่อนสารอนุพันธ์ที่ได้มีค่าการดูดกลืนแสงสูงสุด ที่ 465 นาโนเมตร จึงสามารถแยกและวัดปริมาณได้ด้วยเทคนิครีเวอร์เฟส HPLC *(Reverse phase HPLC)* โดยเทียบกับสารมาตรฐาน GABA ที่แยกได้ที่เวลา *(Retention time)* เดียวกัน เห็นได้ว่าการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างนี้เป็นการเพิ่มความสามารถในการตรวจวัดและยังเพิ่มเสถียรภาพของสาร GABA อีกด้วย

ปัจจัยสำคัญที่จะต้องมีการพิจารณาก่อนการทำอนุพันธ์คือ การเลือกใช้สารอนุพันธ์ และความเสถียรของอนุพันธ์ที่เกิดขึ้นต่อการย่อย *(hydrolysis, solvolysis)* และการสลายตัวที่อุณหภูมิการวิเคราะห์ *(thermal decomposition pre-column derivatization)* ข้อดีของการวิเคราะห์ที่นำมาใช้ สารที่แยกในคอลัมน์ไม่ใช่สารตัวเดิม แต่เป็นอนุพันธ์ที่เกิดจากปฏิกิริยา ความเร็วของปฏิกิริยาไม่มีผลต่อการแยกและปฏิกิริยาอาจเกิดที่อุณหภูมิสูงหรือต่ำก็ได้เพราะเป็นการเตรียมตัวอย่างก่อนฉีดเข้าคอลัมน์ ข้อควรระวังสารเคมีที่เหลือจากปฏิกิริยาหรือสารอื่นที่เกิดจากปฏิกิริยาจะต้องถูกกำจัดออกได้โดยง่าย ปฏิกิริยาการเกิดอนุพันธ์สามารถเตรียมแบบ manual หรือ automate ได้ถ้ามีอนุพันธ์เกิดขึ้นหลายตัวจากปฏิกิริยา หากมีตัวอย่างจำนวนมากจะเสียเวลาในการเตรียมตัวอย่าง และอาจเกิดความผิดพลาดได้ จากการนำพาสารปนเปื้อนเข้าสู่ระบบ และอาจมีการสูญเสียสารตัวอย่างเนื่องจากเกิดปฏิกิริยาที่ไม่สมบูรณ์ หรือปฏิกิริยาที่ผิดไปจากที่ต้องการ ปฏิกิริยาข้างเคียงที่ไม่ต้องการจากหรือสารตัวอย่างเสื่อมลง *(Degradation)* ทำให้เสียเวลาในการเกิดอนุพันธ์และจากขั้นตอนที่ซับซ้อนย่อมลดความแม่นยำในการวิเคราะห์ลงได้

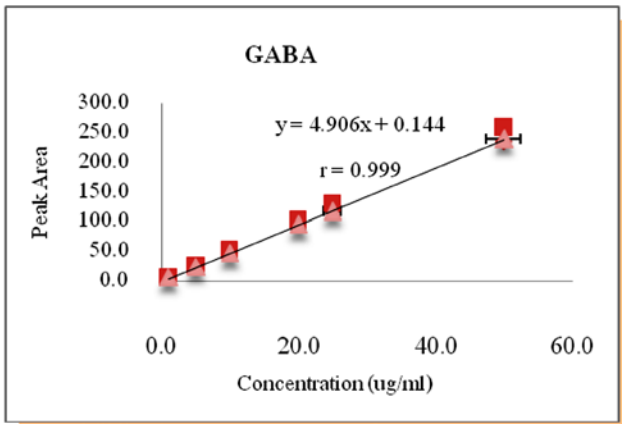

Figure 4 Standard Curve of GABA

Table 1 Peak area of GABA Standard Solution in various concentration

Standard solution	Peak Area				SD	% RSD
concentration GABA (µg/mL)	test 1	test 2	test 3	Average		
1.00	5.0729	5.9509	6.1260	5.7166	0.5643	9.87
5.00	23.8983	26.5451	23.4078	24.6171	1.6876	6.86
10.00	47.1795	52.7431	46.4104	48.7777	3.4556	7.08
20.00	95.7376	103.5445	94.6218	97.9680	4.8615	4.96
25.00	118.3999	132.1380	117.3254	122.6211	8.2594	6.74
50.00	235.8604	261.4455	239.8436	245.7165	13.7665	5.60

Table 2 The results of Accuracy and Precision

Replication *(n=10)*	GABA content in germinated rice *(Spiked standard solution at 1, 20 และ 50 μg/ml)*		
	8 μg/g *(% Recovery)*	160 μg/g *(% Recovery)*	400 μg/g *(% Recovery)*
1.	7.29 *(91.32)*	145.65 *(91.05)*	389.56 *(97.67)*
2.	6.62 *(82.98)*	145.67 *(91.26)*	384.04 *(96.06)*
3.	6.84 *(85.65)*	146.26 *(91.66)*	392.58 *(98.20)*
4.	7.98 *(99.95)*	157.21 *(98.40)*	401.62 *(99.95)*
5.	8.47 *(106.12)*	156.70 *(98.01)*	399.70 *(100.57)*
6.	8.28 *(103.81)*	155.62 *(97.34)*	390.10 *(100.10)*
7.	8.65 *(108.38)*	162.76 *(101.85)*	392.30 *(97.71)*
8.	8.62 *(107.90)*	156.04 *(97.76)*	388.42 *(98.23)*
9.	8.37 *(104.93)*	154.69 *(96.85)*	385.94 *(97.40)*
10.	8.68 *(108.78)*	155.72 *(97.43)*	392.79 *(96.75)*
average	7.98 *(99.98 ± 9.76)*	153.63 *(96.16 ± 3.61)*	391.70 *(98.42 ± 1.49)*
SD	0.7786	5.7948	5.5225
$\%RSD_{(lab)}$	9.7569	3.7719	1.4099
$\%RSD_{(expected)}$ $(2C^{-0.1505})$	11.7024	7.4984	6.5132
HORRAT = $\%RSD_{(lab)} / \%RSD_{(expected)}$	0.83	0.50	0.22

2. เติมสารมาตรฐานให้อยู่ในระดับความเข้มข้น ต่ำ กลาง และสูง ได้แก่ 1, 20 และ 50 μg/mL ของช่วงการวัดแล้วคำนวณร้อยละของการคืนกลับ เฉลี่ยเท่ากับ 99.98, 96.16 และ 98.42 ตามลำดับ ซึ่งเป็นไปตามเกณฑ์การยอมรับของ AOAC คือ อยู่ระหว่าง 80-110 ดังนั้น วิธีการวิเคราะห์ GABA นี้จะให้ผลการวิเคราะห์ที่มีความถูกต้อง ในช่วง 8-400 μg/g หรือ 0.8-40 mg/100g

จาก Table 2 พบค่า HORRAT น้อยกว่า 2 *(เกณฑ์การยอมรับของ AOAC, Codex และ EU)* ทุกระดับความเข้มข้น ดังนั้นวิธีการวิเคราะห์ GABA นี้จะให้ผลการวิเคราะห์ที่มีความเที่ยงตรง ในช่วง 8-400 μg/g หรือ 0.8-40 mg/100g เมื่อนำมาสร้างกราฟเส้นตรงระหว่างความเข้มข้น *(แกน x)* และค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานจะได้สมการเส้นตรง y=0.011x + 1.9953 จากสมการพบค่า Sb *(ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานของความเข้มข้นศูนย์)* เท่ากับ 1.9953 เมื่อนำมา คำนวณหาค่า LOD และ LOQ จะได้ค่า

LOD = 3 x 1.9953 = 5.9859 μg/g

LOQ = 10 x 1.9953 = 19.9530 μg/g

จะเห็นได้ว่า ค่า LOQ ที่คำนวณได้สูงกว่า 8 μg/g ซึ่งไม่สนับสนุนกับข้อมูลที่ได้ทำการทดลองแล้วว่า ที่จุดต่ำสุดของช่วงการวัด คือ 1 μg/g *(ปริมาณ GABA เท่ากับ 8 μg/g หรือ 0.8 mg/100g)* มีความแม่นและความเที่ยงตรง ค่า LOQ ที่ได้จากการคำนวณสูง เนื่องจาก ารหาค่า Sb ที่เกิดจากจุดตัดที่แกน y นั้นได้จากสมการที่ขาดความสัมพันธ์เชิงเส้นตรง ดังนั้น การจะคำนวณค่า LOD และ LOQ จากความสัมพันธ์เชิงเส้นตรงจำเป็นที่จะต้องเพิ่มการทำซ้ำที่ความเข้มข้นต่ำกว่า 1 μg/g 2-3 ระดับความเข้มข้น ซึ่งจะทำให้ค่า Sb ลดลง ค่า LOQ ที่คำนวณได้จะต่ำลงด้วย จากนั้น จึงจะทำการยืนยันอีกครั้งว่า LOQ ที่คำนวณได้เป็น LOQ ที่น่าเชื่อถือและยอมรับได้ด้วยการหาความแม่นและความเที่ยงที่จุดนั้นๆ อย่างไรก็ตาม จากผลการพิสูจน์ในข้างต้นที่จุดสุดท้ายของช่วงการวัดนั้นมีความแม่นและความเที่ยงตรง *(table 2)* จึงถือให้ค่า LOQ ของการวิเคราะห์ GABA วิธีนี้เท่ากับ 8 μg/g

สรุปผลการทดลอง

การศึกษาเพื่อพิสูจน์ความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์ปริมาณ GABA ในข้าวกล้องงอกนี้ ได้ทำการศึกษาเฉพาะส่วนที่เป็นเมล็ดข้าว ทั้งนี้ การศึกษาไม่ครอบคลุม ผลิตภัณฑ์ข้าวกล้องชนิด ต่างๆ ที่ผ่านกระบวนการแปรรูป และการปรุงรส เช่นผลิตภัณฑ์จำพวกขนม อาหารจากข้าวกล้องงอกพร้อมบริโภคและผลิตภัณฑ์เครื่องดื่มจากข้าวกล้อง ที่มีจำหน่ายตามท้องตลาดทั้งนี้การศึกษาความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์ให้เหมาะสมและใช้ได้กับผลิตภัณฑ์ข้าวกล้องงอกที่หลากหลายยังคงต้องให้ความสำคัญเนื่องจากในผลิตภัณฑ์ที่แตกต่างกัน มีผลให้ประสิทธิผลของวิธีวิเคราะห์แตกต่างกันโดยเกิดจากการปนเปื้อนจากสารรบกวน *(Interference)* ซึ่งเป็นตัวแปรสำคัญและส่งผลกระทบต่อการแปลผล ลักษณะของตัวอย่างที่แตกต่างกันออกไปนี้ส่งผลต่อทั้งการวิเคราะห์เชิงคุณภาพและเชิงปริมาณของสารด้วยเทคนิค pre-column derivatization RP-HPLC การปรับปรุงขั้นตอนการสกัด แยกให้บริสุทธิ์ และได้ร้อยละการคืนกลับอยู่ในเกณฑ์ที่ยอมรับได้ ทำให้ผลการวิเคราะห์ปริมาณสารGABAในผลิตภัณฑ์มีความน่าเชื่อถือ แต่ถึงอย่างไร การเลือกวิธีสร้างอนุพันธ์เพื่อวิเคราะห์หาปริมาณ *(Quantitative)* ต้องมั่นใจว่าเกิดปฏิกิริยาขึ้นอย่างสมบูรณ์ ไม่มีสารเจือปน *(Impurities)* การเกิดอนุพันธ์เป็นวิธีที่ช่วยในการแก้ปัญหาในการแยกสาร *(Separation)* และการตรวจวัด *(Detection)* ได้ดี

การตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีการวิเคราะห์ GABA ประกอบด้วย 4 ขั้นตอน ได้แก่ การพิสูจน์ช่วงการวัด และความเป็นเส้นตรง ความถูกต้อง ความเที่ยงตรง ขีดจำกัดของการตรวจพบ และขีดจำกัดของการวัดเชิงปริมาณ พบว่า ช่วงของการวิเคราะห์ที่มีความเป็นเส้นตรง ความถูกต้องและความเที่ยงตรง คือ 0.8-40 mg/100g ร้อยละการคืนกลับเท่ากับ 99.98 LOD เท่ากับ 0.60 mg/100g และ LOQ เท่ากับ 0.80 mg/100g ผลการตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์ปริมาณ GABA ในข้าวกล้องงอก เป็นไปตามเกณฑ์การยอมรับ AOAC *(AOAC , 1993)*

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้ได้รับทุนอุดหนุนจาก โครงการบริการวิชาการแก่ชุมชนภายใต้งบประมาณ โครงการเกษตรยุทธศาสตร์ เพื่อการพัฒนาหมวดเงินอุดหนุนประจำปี พ.ศ. 2553 มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์เรื่องการพัฒนาสมรรถนะศูนย์บริการประกันคุณภาพอาหารเพื่อรองรับสถานการณ์ด้านอาหารสุขภาพและด้านความปลอดภัยทางอาหารของประเทศและการส่งออก

เอกสารอ้างอิง

Fisher GH, Arias I, Quesada I, D'Aniello S, Errico F, Di Fiore MM, et al. 2001.A fast and sensitive method for measuring picomole levels of total free amino acids in very small amounts of biological tissues. **Amino Acids** . 20:163-173.

Fuerst P, Pollack TA, Graser TA, Godel H, Stehle P. 1990. Appraisal of four pre-column derivatization methods for the high-performance liquid chromatographic determination of free amino acids in biological materials. **J Chromatogr.** 499:557-569.

Chang JY, Knecht R, Braun DG. 1983 . Amino acid analysis in the picomole range by precolumn derivatization and high-performance liquid chromatography. Methods Enzymol . 91:41-48.

Jansen EHJM, Van den berg RH, Both-Miedema R, Doorn L. 1991. Advantages and limitations of pre-column derivatization of amino acids with dabsyl chloride. **J. Chromatogr** . 553:123-133.

Krause I, Bockhardt A, Neckermann H, Henle T, Klostermeyer H. 1995. Simultaneous determination of amino acids and biogenic amines by reversed-phase high-performance liquid chromatography of the dabsyl derivatives. **J Chromatogr A.** 715:67-79.

Sarwar G, Botting HG. 1993. Evaluation of liquid chromatographic analysis of nutritionally important amino acids in food and physiological samples. **J Chromatogr B** . 615:1-22.

The AOAC Manual for the peer Verified Methods Program, Manual on policies and procedures, Arlington, VA, Nov. 1993

The fitness for purpose of analytical methods. 1998. A laboratory guide to method validation and related topics, EURACHEM Guide, December

Tadashi Abe, Yoshiatsu Kurozumi, Wen-Bin Yao and Toshuhiko Ubaka. 1998. High-performance liquid chromatographic determination of β-alanine, β-aminoisobutyric acid and γ-aminobutyric acid in tissue extracts and urine of normal and *(aminooxy)* acetate-treated rats. J Chromatogr B. 712 : 43-49.

Vendrell J, Aviles FX. 1986. Complete amino acid analysis of proteins by dabsyl derivatization and reversed-phase liquid chromatography. J Chromatogr. 358:401-413.

Watanabe A, Semba J, Kurumaji A, Kumashiro S, Toru M. 1992. Measurement of glutamate, aspartate and glycine and its potential precursors in human brain using high-performance liquid chromatography by pre-colum on derivatization with diethylaminoazobenzene sulphonylchloride [Short Communication]. J Chromatogr. 583:241-245.