



การพัฒนาวิธีการวิเคราะห์เชิงปริมาณวิตามินเอและวิตามินดีในซีรัมอย่างง่ายและรวดเร็ว โดยใช้เทคนิคโครมาโทกราฟีของเหลวร่วมกับแมสสเปกโตรเมตรี (LC-MS/MS)

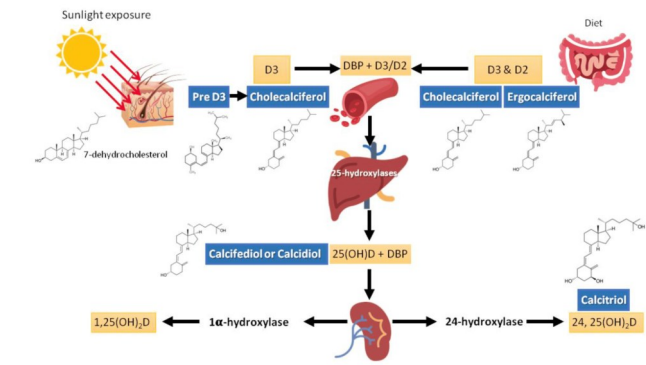
ผู้จัดทำ: ไพบุลย์ พรหมณี, จิรภิญญา เสี่ยมไครต่วน, สิริรัตน์ สิทธิรัตนตรีกุล, จิตนภา วรณิกุล, นรมล จิตต์สมหมาย

บทนำ

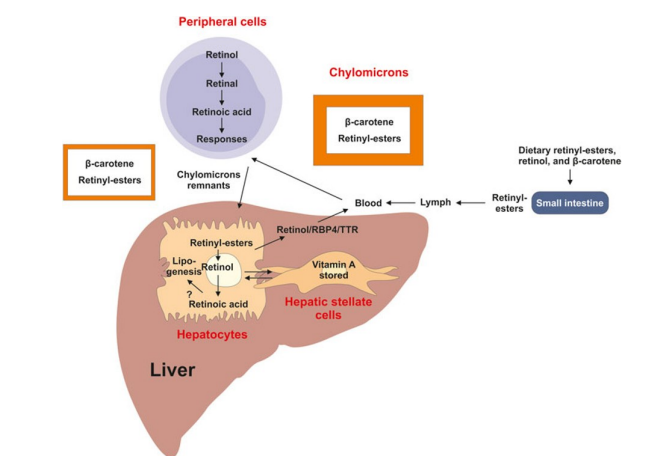
วิตามินเอและวิตามินดี เป็นวิตามินที่มีความสำคัญต่อสุขภาพในหลายด้าน วิตามินดีมีบทบาทหลักในการช่วยดูดซึมแคลเซียมและฟอสฟอรัสเข้าสู่ร่างกาย ซึ่งจำเป็นต่อการเสริมสร้างกระดูกและฟันให้แข็งแรง อีกทั้งยังช่วยลดความเสี่ยงของโรคกระดูกพรุน โดยเฉพาะในวัยผู้ใหญ่และผู้สูงอายุ นอกจากนี้ วิตามินดียังเกี่ยวข้องกับระบบภูมิคุ้มกัน และมีงานวิจัยบางส่วนชี้ให้เห็นว่าอาจช่วยลดการอักเสบภายในร่างกาย

ขณะที่วิตามินเอ มีบทบาทสำคัญต่อสุขภาพดวงตา โดยเฉพาะการมองเห็นในที่มืด ช่วยป้องกันภาวะตาบอดกลางคืน อีกทั้งยังมีส่วนในการซ่อมแซมเนื้อเยื่อผิวหนัง ส่งเสริมให้ผิวพรรณเรียบเนียน ลดการเกิดสิว และสนับสนุนการทำงานของระบบภูมิคุ้มกัน ทำให้ร่างกายสามารถต้านทานเชื้อโรคได้ดีขึ้น การตรวจวัดระดับวิตามินเอและวิตามินดีในร่างกายจึงมีความสำคัญต่อการวินิจฉัยทางการแพทย์อย่างยิ่ง

ด้วยเหตุนี้ ทางเราจึงได้พัฒนาวิธีการตรวจวัดปริมาณวิตามินดีในรูปแบบของ 25-Hydroxyvitamin D₂/D₃ และวิตามินเอในซีรัม โดยใช้เทคนิคลิควิดโครมาโทกราฟี-แมสสเปกโตรเมตรี (LC-MS/MS) ซึ่งเป็นเทคนิคการวิเคราะห์ขั้นสูงที่ได้รับการยอมรับอย่างกว้างขวางในด้านความไว (Sensitivity) และความจำเพาะ (Specificity) ทำให้สามารถให้ผลวิเคราะห์ที่แม่นยำ น่าเชื่อถือ และมีความถูกต้องสูง ส่งผลให้กระบวนการวินิจฉัยทางการแพทย์มีประสิทธิภาพมากยิ่งขึ้น



รูปที่ 1 เมตาบอลิซึมของวิตามินดี โดยจะตรวจวัดวิตามินดีรูปของ 25-Hydroxyvitamin D โดย LC-MS จะตรวจวัดทั้ง D₂ และ D₃



รูปที่ 2 เมตาบอลิซึมของวิตามินเอ โดยจะตรวจวัดวิตามินเอในรูปแบบของ Retinol

พารามิเตอร์ของ LC

Analytical Column	Accucore™ C18 (2.1x100mm) 2.6µm
Column temperature	40 °C
Mobile phase	A: 0.1% Formic acid in H ₂ O B: 0.1% Formic acid in Methanol
Data acquisition mode	Selected ion monitoring (SRM)

พารามิเตอร์ของ Mass Spectrometer

Ion source type	APCI
vaporizer temperature	350 °C
Ion Transfer tube Temp	325 °C
Spray voltage	4800 V
Sheath gas and auxiliary	45 and 5
Collision gas (argon) pressure	1.5 mTorr.

ข้อมูล SRM transition และ Collision Energy

Compound	Precursor (m/z)	Product (m/z)	CE(V)
25-Hydroxyvitamin D2	395.3	269.2	19
		377.3	14
25-Hydroxyvitamin D3	383.2	257.2	13
		365.3	12
Retinol	269.2	83.0	15
		93.0	15
25-Hydroxyvitamin D3-d6 (ISTD)	389.3	263.3	11

ขั้นตอนการเตรียมตัวอย่าง

เตรียมตัวอย่างโดยการตกตะกอนโปรตีน โดยใช้ตัวอย่างเป็นซีรัมปริมาณ 100 µL และ ISTD ปริมาณ 5 µL เติมน้ำสำหรับตกตะกอนโปรตีนปริมาณ 40 µL ผสมให้เข้ากันแล้วนำไปปั่นที่ 4,000 g เป็นเวลา 10 นาที หลังจากนั้น จากนั้น ดูดเอาส่วนใสปริมาตร 100 µL ใส่ขวดตัวอย่าง เพื่อนำไปวิเคราะห์ด้วย LC-MS โดยฉีดตัวอย่างปริมาณ 5 µL ฉีดเข้าสู่ระบบ

A: โครมาโตแกรมของ Retinol มี Rt= 5.45 Min

B: โครมาโตแกรมของ 25-(OH)D2 มี Rt: 5.31 Min

C: โครมาโตแกรมของ 25-(OH)D3 มี Rt: 5.27 Min

D: โครมาโตแกรมของ ISTD (25-Hydroxyvitamin D3-d6) มี Rt: 5.26 Min

ซีรัม 100 µL + ISTD 5 µL +
Protein Precipitant 40 µL



Vortex



ปั่นที่ 4,000 g เป็นเวลา 10 นาที

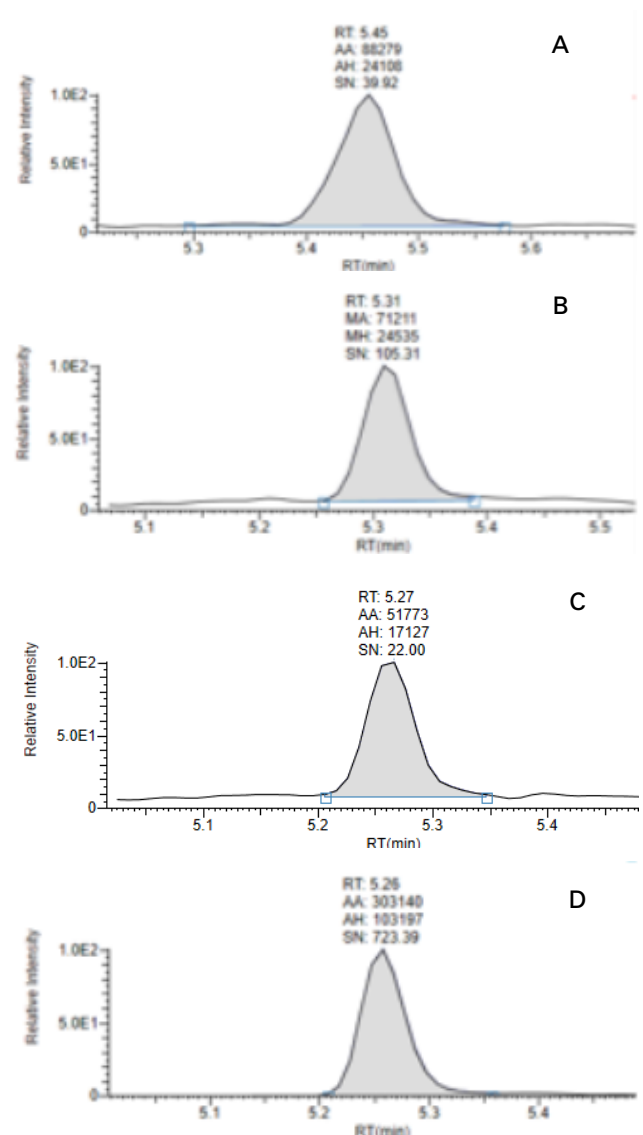


ดูดส่วนใสปริมาณ 100 µl ใส่ขวดตัวอย่าง

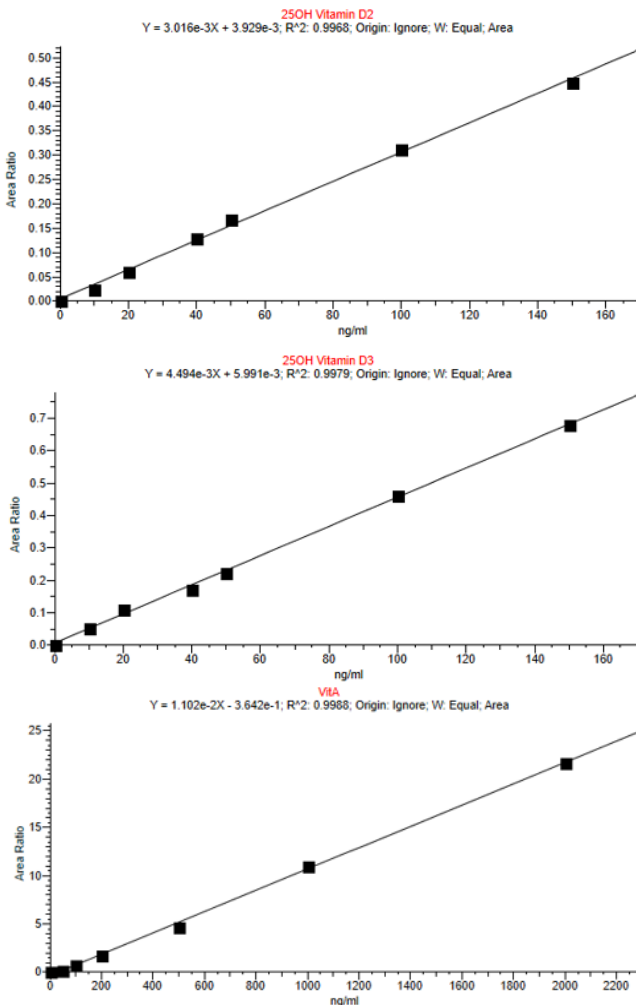


ฉีดตัวอย่างเข้า LC-MS ปริมาณ 5 µL

ผลโครมาโตแกรม



เส้นกราฟมาตรฐาน



สรุปผลการวิเคราะห์

การพัฒนาเทคนิคการตรวจวัดปริมาณวิตามินเอ และ วิตามินดีในซีรัมด้วยเทคนิค LC-MS/MS สำหรับใช้ภายใน ห้องปฏิบัติการ ช่วยลดต้นทุนการทดสอบได้อย่างมีประสิทธิภาพ โดยสามารถวัดสารทั้งสามชนิดได้พร้อมกัน โดยใช้ตัวอย่างซีรัม เพียง 100 µL และเตรียมตัวอย่างด้วยวิธีการตกตะกอนโปรตีนซึ่ง ง่ายและรวดเร็ว ใช้เวลาในการวิเคราะห์ตัวอย่างเพียง 6 นาที

ขอขอบคุณ

Scientific and Technological Research Equipment Centre
Chulalongkorn University (STREC)

เอกสารอ้างอิง

- <https://www.mdpi.com/2218-1989/11/4/255>
- https://www.frontiersin.org/files/Articles/1186336/fphar-14-1186336-HTML/image_m/fphar-14-1186336-g002.jpg
- https://www.frontiersin.org/files/Articles/1186336/fphar-14-1186336-HTML/image_m/fphar-14-1186336-g002.jpg

ติดตามแอปพลิเคชันอื่น ๆ ได้ที่ <https://www.scispec.co.th>

**Sci
Spec**

บริษัท ชายนี สเปค จำกัด
10 ซอยกาญจนาภิเษก ซอย 0010 แยกสอง
เขตบางแค กทม. 10160
โทร 02 454 8533



scispec



@scispec

**thermo
scientific**

Authorized Distributor

ISSUED: