

# การพัฒนาวิธีการที่ง่ายและรวดเร็วสำหรับตรวจวัดปริมาณวิตามินดีในเซรัมด้วยเทคนิค Liquid Chromatography-High Resolution & Accurate Mass Spectrometry (LC-HRAMS)

ผู้จัดทำ : ไพบูลย์ พรหมณี, สิริรัตน์ สิทธิรัตนตรีกุล, จิรภิญญา เลี่ยมไครต่วน, นิรมล จิตต์สมหมาย, จิตนภา วรนิติกุล

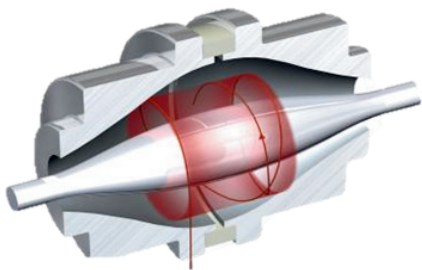
## บทนำ

วิตามินดีเป็นสารอาหารที่มีความสำคัญต่อสุขภาพในหลายด้าน โดยมีบทบาทหลักในการช่วยดูดซึมแคลเซียมและฟอสฟอรัสเข้าสู่ร่างกาย ซึ่งจำเป็นต่อการเสริมสร้างกระดูกและฟันให้แข็งแรง อีกทั้งยังช่วยลดความเสี่ยงของโรคกระดูกพรุน โดยเฉพาะในวัยผู้ใหญ่และผู้สูงอายุ นอกจากนี้ วิตามินดียังมีความเกี่ยวข้องกับระบบภูมิคุ้มกัน และมีงานวิจัยบางส่วนที่ชี้ให้เห็นว่าวิตามินดีอาจมีส่วนช่วยลดการอักเสบภายในร่างกายได้

เพื่อการตรวจวิเคราะห์ดังกล่าวจึงได้พัฒนาวิธีตรวจวัดปริมาณวิตามินดีในรูปของ 25-Hydroxyvitamin D2 และ 25-Hydroxyvitamin D3 ในซีรัม โดยใช้เทคนิคลิควิดโครมาโทกราฟีต่อฟ่งแมสสเปกโตรมิเตอร์ความละเอียดสูง (LC-HRAMS) ซึ่งเป็นเทคนิคการวิเคราะห์ขั้นสูงที่ได้รับการยอมรับอย่างกว้างขวางในด้านความไว (Sensitivity) และ ความจำเพาะ (Specificity) ทำให้ได้ผลการวิเคราะห์ที่แม่นยำถูกต้องและน่าเชื่อถือส่งผลให้กระบวนการวินิจฉัยทางการแพทย์มีประสิทธิภาพ



Orbitrap Mass Spectrometer



Orbitrap

รูปที่ 1 แสดงแมสสเปกโตรมิเตอร์ความละเอียดและแม่นยำสูง (HRAMS) วิเคราะห์มวลด้วยเทคโนโลยี Orbitrap

## LC Conditions

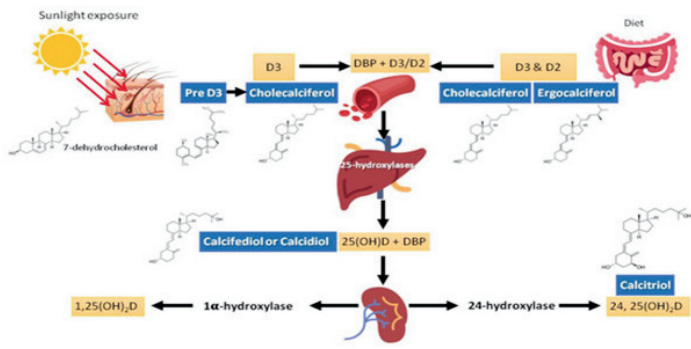
Analytical Column	Accucore™ Hypersil Gold (2.1x100mm) 3µm
Column	40 °C
Mobile phase	A: 0.1% Formic acid in H2O B: 0.1% Formic acid in Methanol
Data acquisition	Product Ion Scan

## MS Conditions

Ion source type	APCI
vaporizer temperature	350 Celcius
Ion Transfer tube Temp	325 Celcius
Pos Ion Discharge	4
Neg Ion Discharge	10
Sheath gas, auxiliary and Sweep gas (Arb)	45, 5 and 1 (arbitrary units),

## การเตรียมตัวอย่าง

เตรียมตัวอย่างโดยการตกตะกอนโปรตีน (Protein Precipitation) ใช้ตัวอย่างเป็นเซรัมปริมาณ 100 µL และสาร Internal standard ปริมาณ 10 µL เติมสารสำหรับตกตะกอนโปรตีนปริมาณ 90 µL ผสมให้เข้ากัน แล้วนำไปปั่นที่ความเร็ว 4000xg เป็นเวลา 10 นาที หลังจากนั้น จากนั้นดูดเอาส่วนใสปริมาตร 100 µL ใส่ในขวดที่มี insert glass สำหรับเครื่อง LC-HRAMS ฉีดตัวอย่างปริมาณ 10 µL ฉีดเข้าสู่ระบบ LC-HRAMS ผลิตภัณฑ์ Thermo Scientific รุ่น OE120 จากประเทศสหรัฐอเมริกา

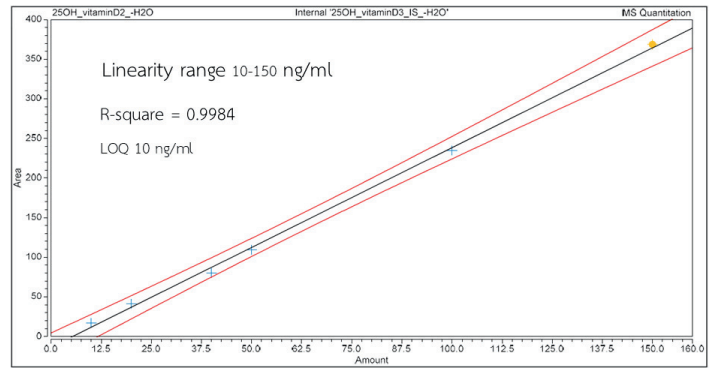
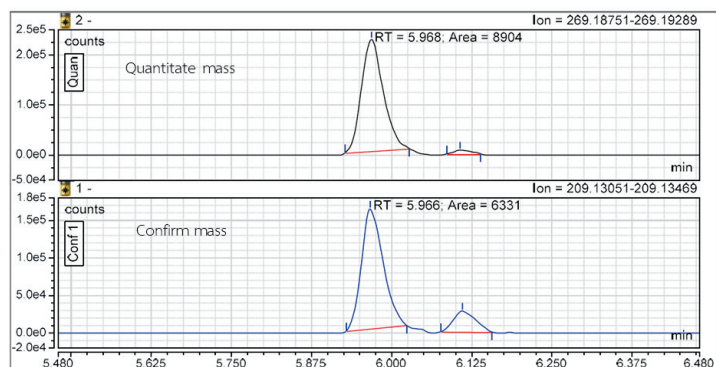
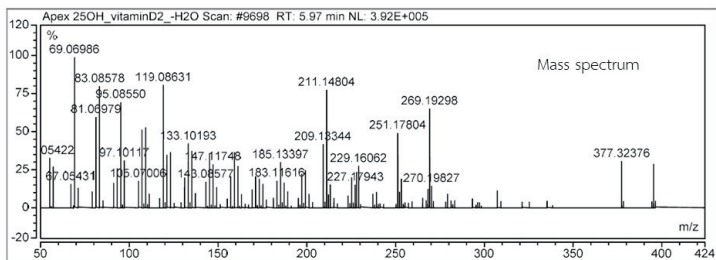


กลไกของวิตามินดีในร่างกาย โดยจะตรวจวัดวิตามินดีรูปแบบของ  
25-Hydroxyvitamin vitamin D2/D3

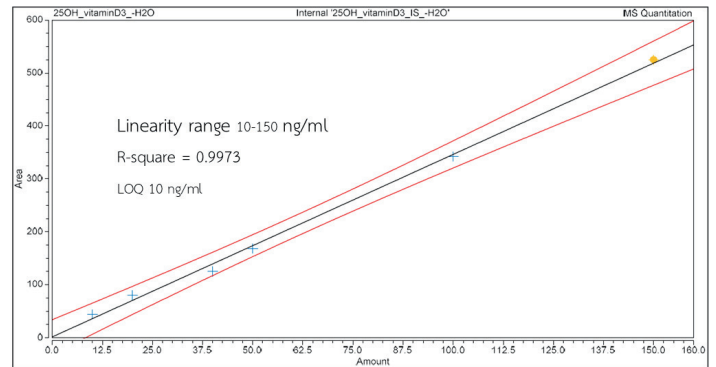
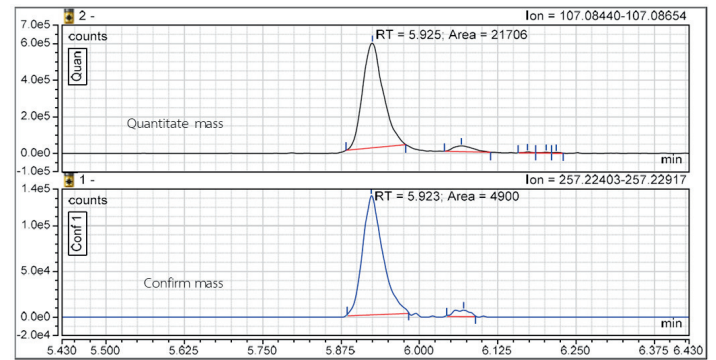
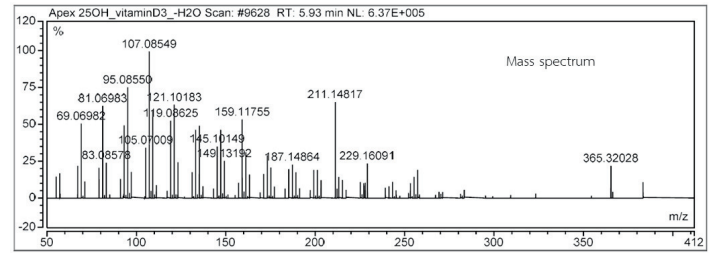
<https://www.mdpi.com/2218-1989/11/4/255>



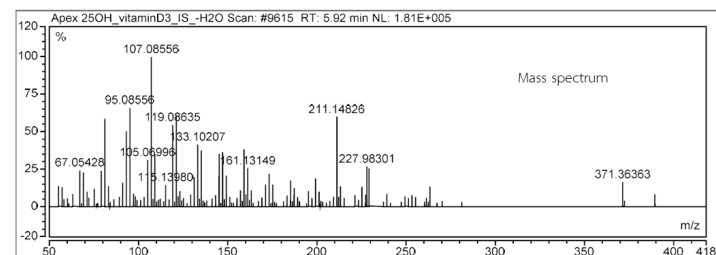
รูปที่ 3 แสดง Mass spectrum (Product ion), Chromatogram และ Calibration curve ของ 25-OH Vitamin D2

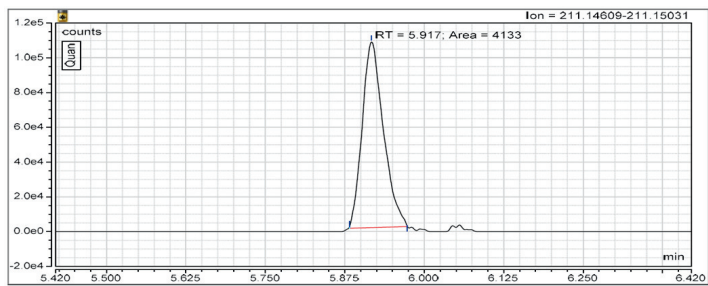


รูปที่ 4 แสดง Mass spectrum (Product ion), Chromatogram และ calibration curve ของ 25-OH Vitamin D3



รูปที่ 5 Mass spectrum (Product ion), Chromatogram และ Calibration curve ของ 25-OH Vitamin D2





## สรุปผลการวิเคราะห์

สามารถพัฒนาเทคนิคการตรวจวัดปริมาณวิตามินดีในเซรัมด้วยเทคนิค  
ลิควิดโครมาโทกราฟีแมสสเปกโตรมิเตอร์ความละเอียดสูง (LC-HRAMS)  
สำหรับใช้ภายในห้องปฏิบัติการ (in-house method) ช่วยลดต้นทุนการ  
ทดสอบและใช้ตัวอย่างเซรัมน้อยเพียง 100  $\mu$ L โดยเตรียมตัวอย่างด้วยวิธีการ  
ตกตะกอนโปรตีนซึ่งง่ายและรวดเร็ว ใช้เวลาในการรันตัวอย่างเพียง 10 นาที  
(Retention time) ผลการทดลองสามารถหาค่าได้ที่ความเข้มข้น 10 ng/ml  
และ Linearity อยู่ในช่วง 10 ng/ml ถึง 150 ng/ml โดยที่ค่า R-  
square > 0.99 การทดลองครั้งนี้ทำให้การตรวจวัดปริมาณวิตามินดีในเซรัม  
เป็นไปอย่างสะดวก รวดเร็ว และมีประสิทธิภาพ ส่งผลให้การวินิจฉัยทางการ  
แพทย์แม่นยำขึ้น รวดเร็วขึ้น และลดผลกระทบต่อผู้ป่วยได้อย่างมาก

ขอขอบคุณ: ภาควิชาวิศวกรรมเคมี คณะวิศวกรรมศาสตร์ มหาวิทยาลัย  
บูรพา



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

thermo  
scientific

Authorized Distributor



scispec



@scispec



[www.scispec.co.th](https://www.scispec.co.th)