การตรวจสอบความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์ปริมาณคอลลาเจนด้วยการวิเคราะห์โดยการวัดสี

Method Validation of Collagen Content by Colorimetric Analysis

วิไลลักษณ์ สุกใส (WilailakSuksai)* สุธาสินี ทัพพสารพงศ์ (Suthasinee Thapphasarapong)**

บทคัดย่อ

การศึกษาครั้งนี้เป็นการตรวจสอบความถูกต้องของวิธีและเปรียบเทียบการวิเคราะห์ปริมาณคอลลาเจนด้วยการวิเคราะห์โดยการวัดสี 2 วิธี คือ วิธีซีเรียสเรดและวิธีไฮดรอกซีโพรลีน และทำการวิเคราะห์ตัวอย่างผลิตภัณฑ์เครื่องดื่มผสมคอลลาเจนจำนวน 9 ยี่ห้อ สำหรับวิธีไฮดรอกซีโพรลีนได้ทำการเปรียบเทียบการเตรียมตัวอย่าง 2 วิธี คือ ใช้หม้อนึ่งอัดไอน้ำ ที่ 121 องศาเซลเซียส นาน 20 นาที และใช้ตู้อบลมร้อน ที่ 120 องศาเซลเซียส นาน 24 ชั่วโมง และวิเคราะห์ความแตกต่างด้วยสถิติ ANOVA ผลการทดลองพบว่าวิธีซีเรียสเรดและวิธีไฮดรอกซีโพรลีนมีความเป็นเส้นตรงในช่วงความเข้มข้น 4-25 และ 1-5 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ โดยวิธีไฮดรอกซีโพรลีนให้ความไวสูงกว่าเมื่อเปรียบเทียบการวิเคราะห์ปริมาณคอลลาเจนของทั้ง 2 วิธีและการย่อยตัวอย่างก่อนการวิเคราะห์ด้วยวิธีไฮดรอกซีโพรลีนไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($p>0.05$) แต่การใช้หม้อนึ่งอัดไอน้ำจะใช้เวลาในการเตรียมตัวอย่างน้อยกว่า

ABSTRACT

This study focused on method validation and comparison of collagen content analysis by colorimetric analysis using sirius red assay and hydroxyproline assay. The nine different brands of collagen containing drinks were determined. For hydroxyproline assay, the samples preparation were hydrolyzed by 2 methods: autoclave at 121°C, 20 min or hot air oven at 120°C, 24 h. The results were analyzed statistically by ANOVA. The results showed that the linearity range of sirius red assay and hydroxyproline assay were 4-25 and 1-5 µg/ml, respectively but hydroxyproline assay provided more sensitivity than sirius red assay. The collagen content analysis of products by two colorimetric methods and different sample preparation methods of hydroxyproline assay showed no significantly difference ($p> 0.05$). However, hydrolysis by autoclave need shorter time.

คำสำคัญ: การตรวจสอบความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์ การวิเคราะห์โดยการวัดสี คอลลาเจน

Key Words: Method validation, Colorimetric Analysis, Collagen

** นักศึกษาหลักสูตรวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาเภสัชเคมีและผลิตภัณฑ์ธรรมชาติ คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น*

*** ผู้ช่วยศาสตราจารย์ สาขาเภสัชศาสตร์ คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น*

บทนำ

ปัจจุบันคอลลาเจนถูกนำมาใช้ประโยชน์อย่างแพร่หลาย เช่น ผสมในเครื่องดื่ม หรือผลิตภัณฑ์รูปแบบอื่นๆเพื่อเป็นอาหารเสริมผสมคอลลาเจน เนื่องจากต้องการสรรพคุณในการเสริมความงามของผิวพรรณ คอลลาเจนเป็นโปรตีนที่พบในร่างกายร้อยละ 20-30 (Lareu *et al*., 2010; Lin &Kuan, 2010) โดยพบว่าคอลลาเจนทั้งหมดมี 26 ชนิด แต่ที่พบมากคือ คอลลาเจนชนิดที่ 1 พบในส่วนต่างๆ ของร่างกาย เช่น ผิวหนัง เส้นเอ็น กระดูก และกระดูกอ่อน (Taskiran *et al*., 1999) โครงสร้างของคอลลาเจนเป็นสายพอลิเปปไทด์ 3 สาย เชื่อมต่อกันด้วยพันธะไฮโดรเจน มีโครงสร้างทั่วไป คือ Gly-Xaa-Yaa โดยมีตำแหน่ง Xaa คือ โพรลีน (ร้อยละ 12) และตำแหน่ง Yaa คือ ไฮดรอกซีโพรลีน (ร้อยละ 13.5) (Lin &Kuan, 2010) การวิเคราะห์ปริมาณคอลลาเจนมีหลายวิธี เช่น วิธี high performance liquid chromatography (HPLC) (Biondi *et al*., 1997) วิธี immunoassays (Jones *et al*., 2010) พบว่าวิธีเหล่านี้มีความจำเพาะแต่ก็มีค่าใช้จ่ายสูง และมีขั้นตอนในการทดสอบที่ซับซ้อน ต้องอาศัยเครื่องมือราคาแพง ซึ่งวิธีวิเคราะห์แบบง่ายวิธีหนึ่งก็คือการวิเคราะห์โดยการวัดสี ซึ่งแบ่งออกเป็น 2 วิธี ได้แก่ วิธีซีเรียสเรดเป็นการวิเคราะห์ปริมาณคอลลาเจนโดยตรงซึ่งอาศัยการทำปฏิกิริยาของสีย้อมที่มีหมู่กรดซัลโฟนิกกับหมู่อะมิโนของคอลลาเจนและเกิดการจับกันอย่างจำเพาะระหว่างสีย้อมกับพันธะเปปไทด์ของคอลลาเจนตามความยาวของโครงสร้าง และวิธีไฮดรอกซีโพรลีน (AOAC, 2000) เป็นการวิเคราะห์ปริมาณไฮดรอกซีโพรลีนซึ่งเป็นส่วนประกอบในคอลลาเจนโดยโมเลกุลของคอลลาเจนจะถูกไฮโดรไลซ์ให้เป็นหน่วยย่อยของกรดอะมิโน จากนั้นไฮดรอกซีโพรลีนจะถูกออกซิไดซ์ด้วยคลอรามีนทีและ 4-(Dimethylamino) benzaldehyde (DMAB) ทำให้เกิดสีของสารประกอบเชิงซ้อนและวัดความเข้มที่เกิดขึ้น (Hofman *et al*., 2011) เนื่องจากไฮดรอกซีโพรลีนเป็นองค์ประกอบเฉพาะที่พบในคอลลาเจน ดังนั้นการหาปริมาณไฮดรอกซีโพรลีนจึงถูกนำมาใช้เพื่อคำนวณหาปริมาณคอลลาเจนได้อย่างถูกต้องแม่นยำ และมีความจำเพาะสูง (Lareu *et al*., 2010) ซึ่งการเตรียมคอลลาเจนให้อยู่ในรูปกรดอะมิโนมีหลายวิธี เช่น การย่อยด้วยกรดร่วมกับความร้อน และการย่อยด้วยเปปซินร่วมกับความร้อน (Thitipramote & Rawkdkuen, 2011; Singh *et al*., 2011) ในงานวิจัยนี้จึงเป็นการตรวจสอบความถูกต้องของการวิเคราะห์โดยการวัดสีทั้ง 2 วิธีเพื่อนำมาประยุกต์ในการควบคุมคุณภาพของผลิตภัณฑ์เครื่องดื่มผสมคอลลาเจนที่จำหน่ายในท้องตลาดต่อไป

วัตถุประสงค์การวิจัย

1. เพื่อตรวจสอบความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์ปริมาณคอลลาเจนด้วยการวิเคราะห์โดยการวัดสี
2. เพื่อเปรียบเทียบวิธีไฮดรอกซีโพรลีนและวิธีซีเรียสเรด

วิธีการวิจัย

1. สารเคมีและอุปกรณ์

Chloramine Trihydrate, 4-(dimethylamino) benzaldehyde, Collagen human, Trans-4-Hydroxyproline-L-proline, Direct Red 80, Picric acid (Sigma-Aldrich, USA), Autoclave (Wise Clave, Germany)

2. วิธีการเตรียมสารละลายมาตรฐาน และตัวอย่าง

2.1 วิธีซีเรียสเรด (Taskiran *et al*., 1999)

2.1.1 เตรียมสารละลายมาตรฐาน

เตรียมสารละลายมาตรฐานคอลลาเจนที่ความเข้มข้น 4-25 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ใน 0.5 โมลาร์ของกรดอะซีติก และเตรียม Dye solution จากกรดพิคริกผสมกับสี Direct red ปริมาณ 0.02 กรัม ในน้ำ 30 มิลลิลิตร

2.1.2 เตรียมตัวอย่าง

เตรียมเครื่องดื่มผสมคอลลาเจนทั้ง 9 ยี่ห้อให้มีความเข้มข้น 35 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ใน 0.5 โมลาร์ของกรดอะซีติก

2.2 วิธีไฮดรอกซีโพรลีน (Lin &Kuan, 2010)

2.2.1 เตรียมสารละลายมาตรฐาน

เตรียมสารละลายไฮดรอกซีโพรลีนปริมาณ 0.001 กรัม ให้มีความเข้มข้น 1-5 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ใน 50 มิลลิโมลาร์ของอะซีเตตบัฟเฟอร์ pH 3.5 เตรียมสารละลาย 0.056 โมลลาร์ของคลอรามีนที ใน 50 เปอร์เซ็นต์ เอ็น-โพรพานอลเตรียมสารละลาย Ehrlich's reagent จาก 1 โมลาร์ ของ 4-(dimethylamino)benzaldehyde ในสารละลายผสมของเอ็น-โพรพานอล ต่อกรดเปอร์คลอริก (2:1 โดยปริมาตร)

2.2.2 เตรียมตัวอย่าง

เก็บตัวอย่างผลิตภัณฑ์เครื่องดื่มผสมคอลลาเจนชนิดน้ำที่จำหน่ายในท้องตลาด จังหวัดขอนแก่น โดยคัดเลือกเครื่องดื่มผสมคอลลาเจนที่มีราคาไม่เกิน 100 บาท จำนวน 9 ยี่ห้อ

เตรียมตัวอย่างสองวิธีแรกเตรียมตัวอย่างเครื่องดื่มผสมคอลลาเจน จำนวน 9 ยี่ห้อที่มีความเข้มข้น 35 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ใน 50 มิลลิโมลาร์ของอะซีเตตบัฟเฟอร์ pH 3.5 จากนั้นเติม 2 นอร์มอลของโซเดียมไฮดรอกไซด์ปริมาณ 20 ไมโครลิตร ให้ความร้อนโดยใช้หม้อนึ่งอัดไอน้ำ ที่ 121 องศาเซลเซียส นาน 20 นาที (Lin and Kuan, 2010) วิธีที่สองเตรียมตัวอย่างที่ความเข้มข้น 35 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ใน 6 นอร์มอลของกรดไฮโดรคลอริก นำไปให้ความร้อนโดยใช้ตู้อบลมร้อน ที่ 120 องศาเซลเซียส นาน 24 ชั่วโมง (Hofman *et al*., 2011)

3. การวิเคราะห์คอลลาเจน

3.1 วิธีซีเรียสเรด (Taskiran *et al*., 1999)

ปิเปต 100 ไมโครลิตรของสารละลายมาตรฐานคอลลาเจนที่ความเข้มข้น 4-25 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และตัวอย่างที่ความเข้มข้น 35 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร มาเติม dye solution 1,000 ไมโครลิตร Sonicate 30 นาที และปั่นเหวี่ยงที่ 12,000g นาน 5 นาที 1 รอบ นำตะกอนไปเติม 1,000 ไมโครลิตร ของ 0.1 โมลาร์ของกรดไฮโดรคลอริก แล้วปั่นเหวี่ยงที่ 12,000g นาน 5 นาที 1 รอบ นำตะกอนไปเติม 1,000 ไมโครลิตร ของ 0.5 นอร์มอลของโซเดียมไฮดรอกไซด์และวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 540 นาโนเมตร คำนวณหาปริมาณคอลลาเจนโดยเทียบกับกราฟมาตรฐานของสารละลายมาตรฐานคอลลาเจน

3.2 วิธีไฮดรอกซีโพรลีน (Lin &Kuan, 2010)

ปิเปต10 ไมโครลิตร ของสารละลายมาตรฐานไฮดรอกซีโพรลีนที่ความเข้มข้น 1-5 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และตัวอย่างที่ความเข้มข้น 35 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ลงในไมโครเพลต จากนั้นเติม 90 ไมโครลิตร ของคลอรามีนที ทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง นาน 25 นาที เติม 100 ไมโครลิตร ของ Ehrlich's reagent อุ่นที่ 65 องศาเซลเซียส นาน 20 นาที วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 550 นาโนเมตร คำนวณหาปริมาณคอลลาเจนโดยเทียบกับกราฟมาตรฐานของสารละลายมาตรฐานไฮดรอกซีโพรลีนและวิเคราะห์ข้อมูลด้วยสถิติ ANOVA

4. การตรวจสอบความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์

4.1 การทดสอบความเป็นเส้นตรงและพิสัย (linearity and range)

การวิเคราะห์ด้วยวิธีซีเรียสเรดจากสารละลายมาตรฐานคอลลาเจนในช่วงความเข้มข้น 4-25 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร 5 ระดับความเข้มข้นๆ ละ 3 ซ้ำ และสำหรับการวิเคราะห์ด้วยวิธีไฮดรอกซีโพรลีนจากสารละลายมาตรฐานไฮดรอกซีโพรลีนในช่วงความเข้มข้น 1-5 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร 5 ระดับความเข้มข้นๆ ละ 3 ซ้ำ นำค่าที่ได้มาสร้างกราฟเส้นตรงและคำนวณค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ (correlation coefficient : r) โดย r >0.99

4.2 การทดสอบขีดจำกัดของการตรวจพบ (limit of detection, LOD) และการทดสอบขีดจำกัดของการวัดเชิงปริมาณ (limit of quantitation, LOQ)

เตรียมน้ำปราศจากไอออนและโซเดียมไฮดรอกไซด์มาวิเคราะห์ด้วยวิธีซีเรียสเรดและวิธีไฮดรอกซีโพรลีน ตามลำดับ จากนั้นทดสอบขีดจำกัดของการตรวจพบ โดยคำนวณจากสูตร LOD = 3SD และทดสอบขีดจำกัดของการวัดเชิงปริมาณ โดยคำนวณจากสูตร LOQ = 10SD

4.3 การทดสอบความเที่ยง (precision)

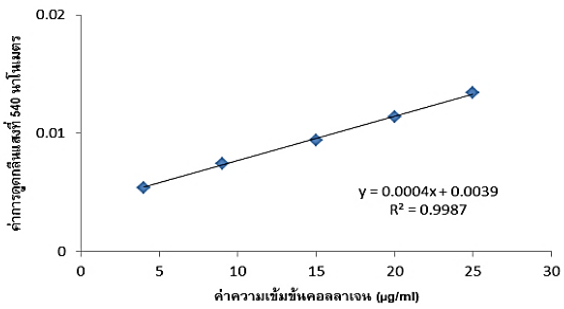
เตรียมสารละลายมาตรฐานคอลลาเจนหรือสารละลายมาตรฐานไฮดรอกซีโพรลีน 5 ระดับความเข้มข้นๆ ละ 3 ซ้ำจากนั้นนำไปวิเคราะห์ด้วยวิธีซีเรียสเรดหรือวิธีไฮดรอกซีโพรลีน ตามลำดับ เพื่อศึกษาการทดลองซ้ำในช่วงวันเดียวกัน (intra-day) และการทดลองซ้ำต่างวัน (inter-day) และรายงานผลในรูปของร้อยละค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ (relative of standard deviation, %RSD) โดย% RSD < 2

4.4 การทดสอบความแม่น (accuracy)

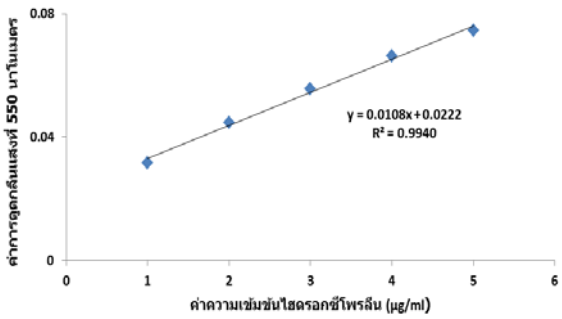
เตรียมสารละลายมาตรฐานคอลลาเจนความเข้มข้น 8, 16, 24 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และความเข้มข้น 10, 25, 35 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ความเข้มข้นละ 3 ซ้ำ จากนั้นวิเคราะห์ด้วยวิธีซีเรียสเรดและวิธีไฮดรอกซีโพรลีน ตามลำดับ และคำนวณหาร้อยละการกลับคืน (%recovery) โดยนำปริมาณคอลลาเจนคูณร้อยหารด้วยความเข้มข้นเริ่มต้น มีเกณฑ์การยอมรับอยู่ระหว่าง 90 ถึง 110 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์ที่วัดได้ค่าใกล้เคียงกับค่าที่แท้จริงมากที่สุดแสดงว่าการวิเคราะห์นั้นมีความถูกต้องสูง

ผลการวิจัย

การตรวจสอบความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์ปริมาณคอลลาเจนด้วยการวิเคราะห์โดยวิธีซีเรียสเรดและวิธีไฮดรอกซีโพรลีน เพื่อแสดงถึงความสามารถของวิธีวิเคราะห์ที่สามารถนำไปใช้ได้ โดยประกอบด้วย การทดสอบความเป็นเส้นตรงและพิสัย (linearity and range) (รูปที่ 1 และรูปที่ 2) การทดสอบขีดจำกัดของการตรวจพบ (limit of detection, LOD) และการทดสอบขีดจำกัดของการวัดเชิงปริมาณ (limit of quantitation, LOQ) การทดสอบความเที่ยง (precision) ของการทดลองซ้ำในช่วงวันเดียวกัน(intra-day) และการทดลองซ้ำต่างวัน(inter-day) การทดสอบความแม่น (accuracy) ตามลำดับ ได้ผลการตรวจสอบความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์แสดงดังตารางที่ 1



รูปที่ 1 กราฟสารละลายมาตรฐานคอลลาเจน



รูปที่ 2 กราฟสารละลายมาตรฐานไฮดรอกซีโพรลีน

จากการตรวจสอบความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์ปริมาณคอลลาเจนทั้ง 2 วิธีพบว่ามีความถูกต้องแม่นยำและมีความไวในระดับไมโครกรัม เมื่อนำวิธีวิเคราะห์ที่ผ่านการตรวจสอบความถูกต้องมาวิเคราะห์และเปรียบเทียบปริมาณคอลลาเจนในเครื่องดื่มผสมคอลลาเจนชนิดน้ำจำนวน 9 ยี่ห้อ ผลการทดลองแสดงดังตารางที่ 2 และรูปที่ 3

จากการวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ (one-way ANOVA) ผลการวิเคราะห์ของทั้ง 2 วิธี พบว่าทั้ง 2 วิธี ให้ผลการวิเคราะห์ปริมาณคอลลาเจนไม่แตกต่างกัน ($p>0.05$)

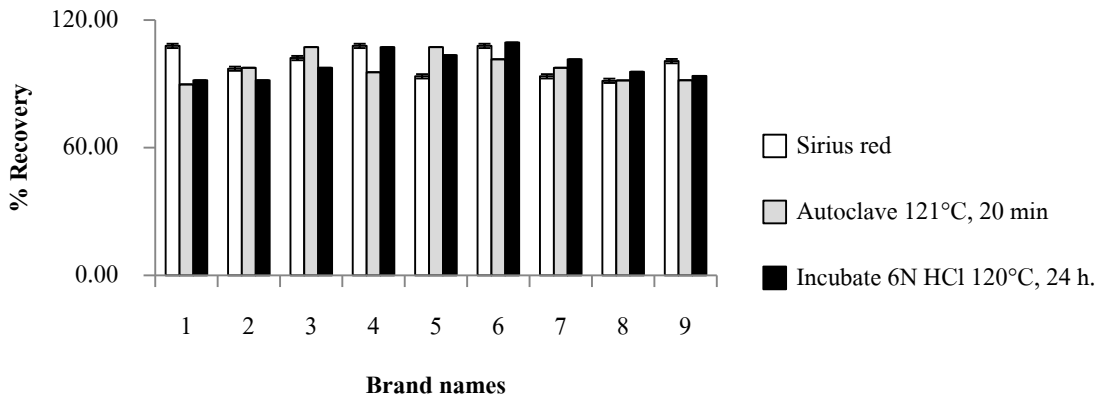
ตารางที่ 1 ผลการตรวจสอบความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์ปริมาณคอลลาเจนด้วยการวิเคราะห์โดยวิธีซีเรียสเรดและวิธีไฮดรอกซีโพรลีน

Parameters	Sirius red assay	Hydroxyproline assay
Linearity		
- linear equation	Y = 0.0004X + 0.0039	Y = 0.0108X + 0.0222
- coefficient of determination (r^2)	0.9987	0.9940
LOD (µg/ml)	0.7	0.2
LOQ (µg/ml)	2.5	0.9
Precision (% RSD)		
- Intra-day	0.0-1.0[a]	0.0-2.0[b]
- Inter-day	0.0-0.3[a]	0.4-1.1[b]
Accuracy (% recovery)	93.7 - 108.3[c]	94.8 - 101.6[d]
		101.5 - 109.3[e]

[a]ช่วงความเข้มข้น 4-25 µg/ml, [b] ช่วงความเข้มข้น 1-5 µg/ml, [c]วิธีซีเรียสเรด, [d]ใช้หม้อนึ่งอัดไอน้ำ, [e]ใช้ตู้อบลมร้อน

ตารางที่ 2 ผลการวิเคราะห์ปริมาณคอลลาเจนด้วยวิธีซีเรียสเรดและวิธีไฮดรอกซีโพรลีนในเครื่องดื่มผสมคอลลาเจนชนิดน้ำจำนวน 9 ยี่ห้อ (n=3)

Brand names	Sirius red assay			Hydroxyproline assay					
				Autoclave			Hot air oven		
	collgen±SD (µg/ml)	food label (mg/ml)	%recovery	collagen±SD (µg/ml)	food label (mg/ml)	%recovery	collagen±SD (µg/ml)	food label (mg/ml)	%recovery
1	37.7±0.0	40.0	107.8	31.4±0.0	40.0	89.7	32.1±0.0	40.0	91.7
2	34.0±0.0	11.1	97.1	34.1±0.0	11.1	97.5	32.1±0.0	11.1	91.7
3	35.7±0.0	2.7	102.1	37.5±0.0	2.7	107.3	34.1±0.0	2.7	97.5
4	37.7±0.0	111.1	107.8	33.4±0.0	111.1	95.4	37.5±0.0	111.1	107.3
5	32.7±0.0	2.0	93.5	37.5±0.0	2.0	107.3	36.2±0.0	2.0	103.4
6	37.7±0.0	4.8	107.8	35.5±0.0	4.8	101.6	38.3±0.0	4.8	109.4
7	32.7±0.0	10.0	93.5	34.1±0.0	10.0	97.5	35.5±0.0	10.0	101.6
8	32.0±0.0	45.4	91.4	32.0±0.0	45.4	91.6	33.4±0.0	45.4	95.6
9	35.2±0.0	119.0	100.7	32.1±0.0	119.0	91.7	32.8±0.0	119.0	93.7



รูปที่ 3 กราฟร้อยละการกลับคืน (% recovery) ปริมาณคอลลาเจนในเครื่องดื่มผสมคอลลาเจนชนิดน้ำจำนวน 9 ยี่ห้อ

อภิปรายและสรุปผลการวิจัย

การตรวจสอบความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์ทั้ง 2 วิธี พบว่ามีความถูกต้องแม่นยำ โดยวิธีไฮดรอกซีโพรลีนมีความไวสูงกว่าวิธีซีเรียสเรดข้อดีของวิธีซีเรียสเรดคือ มีความจำเพาะต่อโครงสร้างคอลลาเจนชนิดที่ 1 ถึง 4 และเป็นวิธีที่ง่ายไม่ต้องมีการย่อยตัวอย่างก่อนการวิเคราะห์ แต่มีข้อเสียคือ อาจจะเกิดการรบกวนจากโปรตีนอื่นที่ไม่ใช่คอลลาเจน และวิธีนี้ไม่สามารถแยกชนิดของคอลลาเจนได้ (Taskiran *et al.*, 1997) ส่วนวิธีไฮดรอกซีโพรลีนต้องมีการย่อยตัวอย่างก่อน ในการเตรียมตัวอย่างทั้ง 2 วิธีพบว่าการใช้หม้อนึ่งอัดไอน้ำและการใช้ตู้อบลมร้อนให้ปริมาณคอลลาเจนไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ เนื่องจากไฮดรอกซีโพรลีนถูกย่อยด้วยความร้อนให้อยู่ในรูปกรดอะมิโนได้เช่นกัน ซึ่งในการเตรียมตัวอย่างโดยใช้หม้อนึ่งอัดไอน้ำจะใช้เวลาน้อยกว่าวิธีใช้ตู้อบลมร้อน และจากตัวอย่างทุกชนิดพบว่ามีปริมาณคอลลาเจนไม่เกิน 10 กรัม ซึ่งปริมาณคอลลาเจนไฮโดรไลเซทที่ควรบริโภคกำหนดให้ไม่เกิน 10 กรัมต่อวัน (Food and drug administration, 1999) ข้อดีของวิธีไฮดรอกซีโพรลีนคือ มีความไวที่สูง ทำได้ง่าย ต้นทุนต่ำ และสามารถวัดปริมาณรวมของคอลลาเจนได้ทุกชนิดแต่มีข้อเสียเช่นเดียวกับวิธีแรกคือ ไม่สามารถแยกชนิดของคอลลาเจนได้

ดังนั้นผู้วิเคราะห์จึงสามารถเลือกใช้วิธีวิเคราะห์วิธีใดก็ได้ตามความเหมาะสมและความพร้อมของห้องปฏิบัติการ อย่างไรก็ตามในการวิเคราะห์ปริมาณคอลลาเจนด้วยการวัดสีโดยเฉพาะวิธีไฮดรอกซีโพรลีน ดังนั้นควรมีการพัฒนาวิธีการเตรียมตัวอย่างที่เหมาะสมกับผลิตภัณฑ์แต่ละประเภท ซึ่งจะทำให้สามารถนำมาประยุกต์ใช้วิเคราะห์ปริมาณคอลลาเจนในตัวอย่างประเภทอื่นได้ เช่น ผลิตภัณฑ์ผสมคอลลาเจนชนิดผง หรือชนิดเม็ดหรือสารสกัดคอลลาเจนจากธรรมชาติอื่นๆต่อไป และควรทำการเปรียบเทียบกับวิธีมาตรฐาน เช่น อิมมูโนแอสเสย์ หรือ LC-MS/MS เพื่อเป็นการยืนยันผลการวิเคราะห์เพิ่มเติมอีกด้วย

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณโครงการบ่มเพาะนักวิจัยเพื่อให้สร้างผลงานวิจัยในระดับนานาชาติ ประจำปี 2556 มหาวิทยาลัยขอนแก่น ที่ได้สนับสนุนทุนวิจัย และขอขอบคุณคณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่นที่เอื้อเฟื้อสถานที่และเครื่องมือในการทำวิจัย ทำให้งานวิจัยนี้สำเร็จไปได้ด้วยดี

เอกสารอ้างอิง

AOAC. 2000. Official methods of analysis of AOAC international. 17th ed. Maryland: USA.

Biondi, P.A., Chiesa, L.M., and Storelli, M.R. 1997. A new procedure for the specific high-performance liquid chromatographic determination of hydroxyproline. Journal of Chromatographic Science. 35: 509-512.

Food and drug Administration. 1999. Food. Retrieved March 7, 2014, from http://www.fda.gov/Food/GuidanceRegulation/RetailFoodProtection/FoodCode/ucm054587.htm.

Hofman, K., Hall, B., Cleaver, H.,and Marshall, S. 2011. High-throughput quantification of hydroxyproline for determination of collagen. Analytical Biochemistry. 417: 289–291.

Jones, B., Bucks, C., Wilkinson, P., Pratta, M., Farrell, F., and Sivakumar, P. 2010. Development of cell-based immunoassays to measure type I collagen in cultured fibroblasts. The International Journal of Biochemistry and Cell Biology. 42: 1808–1815.

Lareu, R.R., Zeugolis, D.I., Abu-Rub, M., Pandit, A., and Raghunath, M. 2010. Essential modification of the Sircol Collagen Assay for the accurate quantification of collagen content in complex protein solutions. Acta Biomaterialia. 6: 3146–3151.

Lin, Y.K., and Kuan, C.Y. 2010. Development of 4-hydroxyproline analysis kit and its application to collagen quantification. Food Chemistry. 119: 1271-1277.

Singh, P., Benjakul, S., Maqsood, S. and Kishimura, H. 2011. Isolation and characterization of collagen extracted from the skin of striped catfish (*Pangasianodon hypophthalmus*). Food Chemistry. 124: 97–105.

Taskiran, D., Taskiran, E., Yercan, H., and Kutay, F.Z. 1997. Quantification of total collagen in rabbit tendon by the Sirius Red Method. Turkish Journal of Medical Sciences. 29: 7-9.

Thitipramote, N. and Rawkdkuen, S. 2011. Histological structure and chemical composition of the farmed giant catfish's skin. Journal of the Microscopy Society of Thailand. 4(2): 89-93.