

การวิเคราะห์และเปรียบเทียบปริมาณน้ำตาลกลูโคส ฟรุคโตส และซูโครสในน้ำผลไม้โดยเทคนิค qNMR และ HPLC

ศิริวรรณ พงศ์พุกษาพัฒนา¹, ทรงสุตา พรหมทอง¹, มงคล ประวัติบริสุทธิ² และ สุภาพร ชินผา^{1,*}

¹สำนักเครื่องมือวิทยาศาสตร์และการทดสอบ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ วิทยาเขตหาดใหญ่ อำเภอหาดใหญ่ จังหวัดสงขลา 90110

²บูรเกอร์ สวิสเซอร์แลนด์ เอจี เขตสาทร กรุงเทพมหานคร 10120

*อีเมลของผู้ประพันธ์บรรณกิจ: supaporn.chi@psu.ac.th

บทคัดย่อ

การศึกษานี้มีวัตถุประสงค์เพื่อวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลกลูโคส ฟรุคโตส และซูโครส โดยประยุกต์ใช้เทคนิคการวิเคราะห์เชิงปริมาณด้วยนิวเคลียร์แมกเนติกเรโซแนนซ์ (Quantitative Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy: qNMR) ซึ่งใช้ทั้งวิธีมาตรฐานภายนอก (External Standard) และวิธีมาตรฐานภายใน (Internal Standard) เพื่อตรวจสอบความถูกต้องแม่นยำ และเปรียบเทียบผลการวิเคราะห์กับเทคนิคโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง (High Performance Liquid Chromatography: HPLC) ในตัวอย่างน้ำผลไม้ ผลการวิเคราะห์ด้วยเทคนิค qNMR และเทคนิค HPLC ด้วยสถิติ Bland-Altman plot พบว่า ปริมาณน้ำตาลทั้งสามชนิด มีความสอดคล้องกันในช่วงขอบเขต Limits of Agreement $\pm 1.96SD$ ซึ่งอยู่ในระดับที่ยอมรับได้ และเมื่อพิจารณาความแม่นยำ (Precision) ด้วยค่าสถิติ %RSD พบว่า เทคนิค qNMR วิธีมาตรฐานภายในมีความแม่นยำที่สุด มีช่วงค่า %RSD เท่ากับ 0.03 - 2.56% รองลงมา คือ เทคนิค HPLC มีช่วงค่า %RSD เท่ากับ 0.11 - 3.26% และเทคนิค qNMR วิธีมาตรฐานภายนอก มีช่วงค่า %RSD เท่ากับ 0.29 - 2.77% ตามลำดับ บ่งชี้ว่าทั้งเทคนิค qNMR และเทคนิค HPLC มีความสอดคล้องกันอย่างมีนัยสำคัญ นอกจากนี้การใช้เทคนิค qNMR มีการเตรียมตัวอย่างที่ง่ายกว่าไม่ต้องกำหนดกราฟมาตรฐาน ลดขั้นตอนการทำงานและลดระยะเวลาในการวิเคราะห์อย่างมากเมื่อเทียบกับเทคนิค HPLC รวมถึงสามารถวิเคราะห์ตัวอย่างได้ภายในขั้นตอนเดียว จึงช่วยเพิ่มประสิทธิภาพและความสะดวกในการควบคุมคุณภาพของปริมาณน้ำตาลทั้ง 3 ชนิด ในผลิตภัณฑ์น้ำผลไม้ได้

คำสำคัญ: qNMR, HPLC; น้ำตาลกลูโคส; น้ำตาลฟรุคโตส; น้ำตาลซูโครส; น้ำผลไม้; การวิเคราะห์เชิงปริมาณ; มาตรฐานภายใน; มาตรฐานภายนอก

Comparative Analysis of Glucose, Fructose and Sucrose in Fruit Juice Using Quantitative NMR and HPLC Techniques

Siriwan Pongprueksapattana¹, Songsuda Promthong¹,
Mongkhon Prawatborisut², and Supaporn Chinpha^{1,*}

¹*Office of Scientific Instrument and Testing, Prince of Songkla University, Hatyai Campus, Songkhla 90110, Thailand*

²*Bruker Switzerland AG. Sathon, Bangkok 10120, Thailand*

*Corresponding author's e-mail: supaporn.chi@psu.ac.th

Abstract

This study aimed to quantitatively determine glucose, fructose, and sucrose using quantitative nuclear magnetic resonance spectroscopy (qNMR) employing both external and internal standard approaches. The analytical performance of the qNMR methods was evaluated in terms of accuracy and precision and compared with that of high-performance liquid chromatography (HPLC) in fruit juice samples. The results, assessed using Bland-Altman analysis, demonstrated excellent agreement between qNMR and HPLC, with limits of agreement ($\pm 1.96SD$) falling within acceptable ranges. In terms of precision, expressed as %RSD, the qNMR internal standard method exhibited the highest precision (%RSD 0.03 - 2.56%), followed by HPLC (%RSD 0.11 - 3.26%) and the qNMR external standard method (%RSD 0.29 - 2.77%), respectively. These findings confirm that qNMR and HPLC yield statistically consistent results. Moreover, the qNMR technique offers practical advantages, including simplified sample preparation, the elimination of calibration curve requirements, and significantly reduced analysis time compared to HPLC. Given its capability to simultaneously quantify multiple sugars in a single step, qNMR represents an efficient and convenient analytical tool for routine quality control of glucose, fructose, and sucrose in fruit juice products.

Keywords: qNMR; HPLC; Sucrose; Glucose; Fructose; Fruit Juice; Quantitative Analysis; Internal Standard; External Standard

บทนำ

เครื่องนิวเคลียร์แมกเนติกเรโซแนนซ์สเปกโตรมิเตอร์ (NMR) เป็นเครื่องมือโครงสร้างสารสังเคราะห์ ระบุโครงสร้างสารที่แยกได้จากสารสกัด วิเคราะห์สารผสมได้ ระบุความบริสุทธิ์ของสาร วิเคราะห์เชิงปริมาณได้ ปัจจุบัน สเปกโตรสโกปีเชิงปริมาณ NMR (Quantitative Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy: qNMR) เป็นเทคนิคหนึ่งของเครื่องนิวเคลียร์แมกเนติกเรโซแนนซ์สเปกโตรมิเตอร์ ถูกนำมาทดสอบวิเคราะห์เชิงปริมาณ (Yang et al., 2020) ของสารประกอบอินทรีย์ โดยใช้คลื่นแม่เหล็กไฟฟ้านิวเคลียร์ ให้ผลการทดสอบในรูปของสเปกตรัมโปรตอน (^1H -NMR Spectrum) แล้วอินทิเกรตสัดส่วนของพื้นที่ใต้กราฟของสเปกตรัมโปรตอน เนื่องจากความเข้มของสัญญาณแปรผันตามจำนวนโปรตอน จึงสามารถวิเคราะห์เชิงปริมาณจากสเปกตรัมได้ เทคนิค qNMR มีข้อได้เปรียบต่างจากเทคนิคโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง (High-Performance Liquid Chromatography: HPLC) คือ เทคนิค qNMR มีขั้นตอนการเตรียมตัวอย่างไม่ยุ่งยาก ไม่ต้องใช้สารมาตรฐานอ้างอิงบริสุทธิ์ของสารทดสอบ เพียงมีสารมาตรฐานอ้างอิงภายในที่ทราบค่าความบริสุทธิ์ ก็สามารถคำนวณได้ แต่เทคนิค HPLC ต้องใช้สารมาตรฐานบริสุทธิ์สูงเพื่อสร้างกราฟสารมาตรฐาน เทคนิค qNMR ใช้สัญญาณโปรตอนมีลักษณะเฉพาะของสารสามารถยืนยันโครงสร้างและตรวจสอบสิ่งเจือปนได้ในเวลาเดียวกัน แต่เทคนิค HPLC ต้องอาศัยการแยกและตรวจจับด้วยตัวตรวจวัดชนิด Refractive Index Detector (RID) ซึ่งอาจไม่จำเพาะต่อโครงสร้าง เทคนิค qNMR ไม่ใช้ตัวทำละลายปริมาณมากและไม่มีตัวทำละลายเคลื่อนที่และแยกด้วยคอลัมน์ที่จำเพาะ ซึ่งสิ้นเปลือง รวมถึงเทคนิค qNMR มีความเร็วในการวิเคราะห์ หนึ่งการสแกนใช้เวลาเพียงไม่กี่นาที สามารถประเมินความบริสุทธิ์ได้ภายใน 13 นาที แต่เทคนิค HPLC ต้องใช้เวลาวิเคราะห์และแยกสารประกอบผ่านคอลัมน์นานกว่า (Zhang et al., 2021)

เทคนิค qNMR มีสองวิธีในการหาปริมาณโดยอาศัยวิธีมาตรฐานภายนอก (External standard) และวิธีมาตรฐานภายใน (Internal Standard) วิธีมาตรฐานภายนอก ใช้โปรแกรม ERETIC (Electronic Reference To Access *In Vivo* Concentrations) คำนวณปริมาณ โปรแกรมนี้เป็นโปรแกรมอัตโนมัติที่ถูกพัฒนาขึ้น โดยอาศัยการสร้างสัญญาณอ้างอิงในรูปแบบอิเล็กทรอนิกส์ ซึ่งส่งเข้าสู่เครื่อง NMR ผ่านคลื่นวิทยุ (Radiofrequency Pulses) ไม่จำเป็นต้องเติมสารประกอบมาตรฐานลงในตัวอย่างจริง (Akoka et al., 1999) โปรแกรม ERETIC จัดเป็นวิธีอ้างอิงภายนอกที่สามารถสอบเทียบ (Calibrate) และนำมาใช้เปรียบเทียบกับสัญญาณของตัวอย่างที่วัดแยกกันในสภาวะสารละลายที่แตกต่างได้อย่างแม่นยำ จุดเด่นของวิธีนี้คือความสามารถในการกำหนดปริมาณของสารเป้าหมายได้โดยไม่ต้องใช้สารมาตรฐานจริง ซึ่งช่วยลดขั้นตอนและความเสี่ยงจากการปนเปื้อน ทั้งนี้ การใช้งานโปรแกรม ERETIC จำเป็นต้องมีการติดตั้งฮาร์ดแวร์เฉพาะสำหรับการสร้างสัญญาณอิเล็กทรอนิกส์เข้าสู่ระบบ NMR อย่างเหมาะสม จากคุณสมบัติดังกล่าว ERETIC จึงได้รับการพิสูจน์แล้วว่าเป็นโปรแกรมที่มีประสิทธิภาพและเหมาะสมอย่างยิ่งสำหรับการประยุกต์ใช้ในงานวิเคราะห์เชิงปริมาณ (Choi et al., 2021) ส่วนวิธีมาตรฐานภายในใช้ในการวัดทั้งสารมาตรฐานและตัวอย่างในสารละลายเดียวกัน สารประกอบอ้างอิงที่มีความเข้มข้นที่ทราบน้ำหนักจะถูกละลายในสารละลายที่มีปริมาตรที่ทราบเพื่อวิเคราะห์เชิงปริมาณ สารประกอบอ้างอิงวิธีมาตรฐานภายในจำนวนหนึ่งที่นิยมถูกนำมาใช้สำหรับการวิเคราะห์ด้วยเทคนิค qNMR เช่น Tetramethylsilane (TMS) (Duangdee et al., 2019), 3-(trimethylsilyl)-1-Propanesulfonic Acid Sodium Salt (DSS) (Biswas et al., 2025) และ 3-(trimethylsilyl)propionic-2,2,3,3- d_4 Acid Sodium Salt (TSP) (Navarro et al., 2020) เป็นสารประกอบอ้างอิงภายในที่ใช้กันอย่างแพร่หลายสำหรับการอ้างอิงการเปลี่ยนแปลงทางเคมี ดังนั้น วิธีมาตรฐานภายในจึงมีความแม่นยำและความถูกต้องมากกว่าวิธีมาตรฐานภายนอก แต่เงื่อนไขที่สำคัญที่สุดสำหรับวิธีมาตรฐานภายในคือความสามารถในการละลายและปฏิสัมพันธ์ทางเคมี ไม่ทำปฏิกิริยากับสารวิเคราะห์ ควรเลือกสารมาตรฐานภายในอย่างระมัดระวัง (Weber et al., 2013)

น้ำตาลซึ่งโดยทั่วไปหมายถึงซูโครส (Sucrose) เป็นคาร์โบไฮเดรตชนิดละลายน้ำได้ตามธรรมชาติและไม่เป็นพิษ มีรสหวาน น้ำตาลหลักของน้ำตาลในผลิตภัณฑ์อาหารคือให้พลังงานและความหวาน น้ำตาลยังมีบทบาทสำคัญมาก

ในการถนอมอาหาร การหมัก สีและเนื้อสัมผัส น้ำตาลซูโครสอยู่ในกลุ่มไดแซคคาไรด์ เป็นน้ำตาลโมเลกุลคู่ ซึ่งประกอบด้วย น้ำตาลกลูโคสและน้ำตาลฟรุกโตส กล่าวคือ น้ำตาลกลูโคส (Glucose) น้ำตาลฟรุกโตส (Fructose) เป็นน้ำตาลอยู่ในกลุ่มมอนอแซคคาไรด์ น้ำตาลมีอยู่หลายชนิดมาจากแหล่งต่าง ๆ เช่น ผลไม้ ผัก น้ำผึ้ง สารให้ความหวานจากข้าวโพด น้ำตาลอ้อย น้ำตาลทรายแดง (Lupu et al., 2025)

โดยทั่วไปเทคนิค HPLC เป็นวิธีมาตรฐานที่ใช้กันอย่างแพร่หลายในการวิเคราะห์น้ำตาลในผลิตภัณฑ์ต่าง ๆ (Akyuz et al., 2021) แต่การวิเคราะห์ปริมาณด้วยเทคนิค HPLC จำเป็นต้องมีขั้นตอนการเตรียมตัวอย่าง เช่น การกรอง การเจือจาง และในบางกรณีต้องทำการดีโปรตีนด้วยตัวทำละลายอินทรีย์ เพื่อป้องกันการอุดตันของคอลัมน์ และต้องมีการกรองซ้ำก่อนฉีดเข้าสู่ระบบ ซึ่งขั้นตอนเหล่านี้อาจก่อให้เกิดการสูญเสียหรือการเปลี่ยนแปลงของน้ำตาลบางชนิดโดยเฉพาะซูโครสที่อาจเกิดการแตกตัวเป็นกลูโคสและฟรุกโตส ระหว่างการเตรียมตัวอย่าง (Magwaza et al., 2015) นอกจากนี้ การเจือจางที่ไม่แม่นยำส่งผลทำให้ค่าที่คำนวณได้สูงขึ้น อีกทั้งเทคนิค HPLC จำเป็นต้องเตรียมสารมาตรฐานเพื่อสร้างกราฟมาตรฐานในการคำนวณปริมาณน้ำตาลแต่ละชนิดซึ่งเป็นขั้นตอนที่ยุ่งยาก ในทางกลับกันในปัจจุบันเทคนิค q NMR สามารถวิเคราะห์หาปริมาณสารประกอบน้ำตาลในตัวอย่างน้ำผลไม้ได้โดยตรงหลังจากปั่นเหวี่ยงเพื่อกำจัดตะกอนแล้วนำมาละลายในตัวทำละลายที่เหมาะสม บรรจุในหลอด NMR และนำไปวิเคราะห์ได้ทันทีเพื่อนำผลข้อมูลสเปกตรัมไปคำนวณหาปริมาณน้ำตาลแต่ละชนิด (Marchetti et al., 2019) โดยไม่ต้องผ่านขั้นตอนแยกหรือกรอง ทำให้ลดความคลาดเคลื่อนจากการเตรียมตัวอย่างและให้ปริมาณน้ำตาลทั้งหมดในตัวอย่างได้แม่นยำกว่า (Bharti et al., 2012) ดังนั้น งานวิจัยนี้สนใจศึกษาการวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลทั้ง 3 ชนิดในน้ำผลไม้ โดยศึกษาด้วยวิธีอ้างอิงสารมาตรฐานภายนอกและวิธีอ้างอิงสารมาตรฐานภายในของเทคนิค q NMR โดยใช้เครื่อง NMR และเปรียบเทียบผลการวิเคราะห์กับเทคนิค HPLC เพื่อใช้เป็นทางเลือกในการควบคุมคุณภาพของน้ำตาลในน้ำผลไม้

วัตถุประสงค์การวิจัย

1. เพื่อศึกษาวิธีการวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลกลูโคส น้ำตาลฟรุกโตส และน้ำตาลซูโครสในตัวอย่างน้ำผลไม้ด้วยเทคนิค q NMR วิธีมาตรฐานภายนอกและวิธีมาตรฐานภายใน
2. เพื่อเปรียบเทียบผลการวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลกลูโคส น้ำตาลฟรุกโตส และน้ำตาลซูโครสในตัวอย่างน้ำผลไม้ระหว่างเทคนิค q NMR และเทคนิค HPLC

ระเบียบวิธีวิจัย

สารเคมี

การทดสอบด้วยเทคนิค q NMR ใช้สารมาตรฐานกรดเบนโซอิก 99.5% (Sigma-Aldrich, United States) ใช้เป็นสารมาตรฐานภายนอก สารมาตรฐาน 3-(trimethylsilyl)propionic-2,2,3,3- d_4 Acid Sodium Salt (TSP) ใช้เป็นสารมาตรฐานภายใน (Zeochem AG, Switzerland) สารละลายดีออกซิเจน (D₂O, 99.9%D) และสารละลายไดเมทิลซัลฟอกไซด์- d_6 (Dimethyl Sulfoxide- d_6 , 99.8%D) (Merck, Germany) ในส่วนของการทดสอบด้วยเทคนิค HPLC ใช้สารมาตรฐานน้ำตาลกลูโคสความบริสุทธิ์ 99.5% น้ำตาลฟรุกโตสความบริสุทธิ์ 99.5% และน้ำตาลซูโครสความบริสุทธิ์ 99.0% (Sigma-Aldrich, United States) และตัวทำละลายน้ำ

เครื่องมือที่ใช้ในการวิจัย

1. เครื่องนิวเคลียร์แมกเนติกเรโซแนนซ์สเปกโตรมิเตอร์ (NMR Spectrometer) รุ่น AVANCE NEO ขนาด 500 เมกะเฮิร์ตซ์ พร้อมหัววัด Cryoprodigy Probe ขนาด 5 มิลลิเมตร (Bruker, Germany) หลอด NMR เส้นผ่าน

ศูนย์กลาง 5 มิลลิเมตร ใช้พารามิเตอร์ Noesygppr1d Pulse ซึ่งเป็นการทดสอบ Water Suppression $^1\text{H-NMR}$ จำนวน 16 สแกน ใช้ค่า Relaxation Delay (D1) 36 วินาที จากพารามิเตอร์ t1r1d Pulse ทดสอบค่าการคลายตัว (The Value of the Delay, D7) ได้เท่ากับ 3.5 วินาที จากนั้นคำนวณสมการ $D1 = D7 \times 1.44 \times 7$ โดยพารามิเตอร์ทั้งหมดมาจากไลบรารีของ Bruker คำนวณผลการวิเคราะห์ผ่านโปรแกรม ERETIC (Electronic to Access In Vivo Concentration) (Choi et al., 2021) ผ่านซอฟต์แวร์ TopSpin รุ่น 4.1.3

2. เครื่องโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง (HPLC) รุ่น Chromaster CM -5000 (Hitachi, Japan) คอลัมน์ที่ใช้คือ RezexTM RCM-Monosaccharide Ca^{+2} (8%) ขนาด 300×7.8 มิลลิเมตร ตัวตรวจวัดชนิด RID ซึ่งเป็นวิธีมาตรฐานที่ได้รับความนิยมในการวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลในน้ำผลไม้ โดยสภาวะอุณหภูมิคอลัมน์และอุณหภูมิตัวตรวจวัดชนิด RID เท่ากับ 60 องศาเซลเซียส และ 50 องศาเซลเซียส ตามลำดับ ใช้น้ำเป็นตัวทำละลายเคลื่อนที่ (Mobile phase) โดยมีอัตราไหลของสารตัวพา 0.5 มิลลิลิตร/นาที ปริมาตรฉีด 5 ไมโครลิตร และระยะเวลาเก็บข้อมูล 35 นาที (Jayaprakash et al., 2016)

ข้อมูลผลการวิเคราะห์ที่ได้จากทั้งสองเทคนิค ถูกนำไปวิเคราะห์ทางสถิติ Bland-Altman Plot (Bland & Altman, 1999) โดยวิเคราะห์เปรียบเทียบความสอดคล้องกันของสองวิธีการวิเคราะห์ทั้ง 2 วิธี แสดงข้อมูลในรูปของกราฟที่แสดงความเบี่ยงเบนของการวัด และประเมินความสม่ำเสมอของวิธีการวิเคราะห์

การเตรียมตัวอย่างและสารมาตรฐาน

ตัวอย่างน้ำผลไม้ ถูกสุ่มจากร้านสะดวกซื้อภายในมหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ อำเภอหาดใหญ่ ซึ่งเป็นตัวแทนของน้ำผลไม้ที่ผู้บริโภคนิยม จำนวน 9 ตัวอย่าง (A - I) การศึกษาหาปริมาณน้ำตาลด้วยเทคนิค $q\text{NMR}$ และเทคนิค HPLC โดยทดสอบเปรียบเทียบตัวอย่างละ 3 ซ้ำ โดยมีขั้นตอนการเตรียมและวิเคราะห์ ดังนี้

1. เตรียมตัวอย่างน้ำผลไม้โดยนำตัวอย่างน้ำผลไม้ปริมาตร 20 มิลลิลิตร ปั่นเหวี่ยงด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที เวลา 10 นาที แล้วถ่ายสารละลายใส่ลงในหลอดพลาสติกขนาด 50 มิลลิลิตร เพื่อวิเคราะห์ด้วยเทคนิค $q\text{NMR}$

สำหรับการวิเคราะห์ด้วยเทคนิค $q\text{NMR}$ วิธีมาตรฐานภายใน เตรียมโดยปิเปตตัวอย่างน้ำผลไม้ส่วนใส 0.200 มิลลิลิตร ที่บรรจุสารมาตรฐาน 5.509 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร TSP- d_4 ปริมาตร 0.020 มิลลิลิตร ผสมกับสารละลาย D_2O 0.780 มิลลิลิตร ให้เข้ากัน จากนั้นปิเปตสารละลายที่เตรียมได้ปริมาตร 0.600 มิลลิลิตร ลงในหลอด NMR

สำหรับการวิเคราะห์ด้วยเทคนิค $q\text{NMR}$ วิธีมาตรฐานภายนอก การเตรียมสารมาตรฐาน เตรียมโดยชั่งสารมาตรฐานกรดเบนโซอิกน้ำหนัก 10 มิลลิกรัม ละลายในสารละลายไดเมทิลซัลฟอกไซด์- d_6 1.0 มิลลิลิตร ปิเปตสารละลายมาตรฐานที่เตรียมได้ ปริมาตร 0.600 มิลลิลิตร ใส่ในหลอด NMR

2. สำหรับการวิเคราะห์ด้วยเทคนิค HPLC เตรียมสารละลายมาตรฐานน้ำตาล โดยการชั่งน้ำหนักสารมาตรฐานกลูโคส ฟรุคโตส ซูโครส อย่างแม่นยำ 1.0 กรัม และละลายในน้ำ 10.0 มิลลิลิตร จะได้ Stock Standard ความเข้มข้น 100,000 มิลลิกรัมต่อลิตร กรองผ่านเมมเบรนขนาด 0.2 ไมครอน เตรียมกราฟมาตรฐานโดยเจือจาง Stock Standard 100,000 มิลลิกรัมต่อลิตร ให้ได้ความเข้มข้น 1,000 มิลลิกรัมต่อลิตร 2,000 มิลลิกรัมต่อลิตร 5,000 มิลลิกรัมต่อลิตร 10,000 มิลลิกรัมต่อลิตร 15,000 มิลลิกรัมต่อลิตร 20,000 มิลลิกรัมต่อลิตร และ 25,000 มิลลิกรัมต่อลิตร ด้วยน้ำ และนำไปวิเคราะห์ด้วยเทคนิค HPLC เพื่อกำหนดกราฟมาตรฐาน (Calibration Curve)

เตรียมตัวอย่างน้ำผลไม้โดยนำตัวอย่างน้ำผลไม้ปริมาตร 20 มิลลิลิตร ปั่นเหวี่ยงด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที เวลา 10 นาที แล้วถ่ายสารละลายใส่ลงในหลอดพลาสติกขนาด 50 มิลลิลิตร กรองสารละลายใส่ผ่านในลอนเมมเบรนขนาดรูพรุน 0.22 ไมครอน เจือจางตัวอย่างให้มีความเข้มข้นอยู่ในช่วงกราฟมาตรฐาน

การวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลในตัวอย่างน้ำผลไม้

การวิเคราะห์ด้วยเทคนิค q NMR วิธีมาตรฐานภายนอก

ในการวิเคราะห์เชิงปริมาณด้วยเทคนิค q NMR ต้องการทราบว่าในตัวอย่างมีสารเป้าหมาย เช่น กลูโคส ฟรุคโตส ซูโครส มีปริมาณเท่าไร โดยทั่วไปต้องใช้ สารมาตรฐานภายใน (Internal Standard) เพื่อเปรียบเทียบพื้นที่สัญญาณ (Integral) ระหว่างสารมาตรฐานกับสารเป้าหมาย ไม่ต้องเติมสารมาตรฐานลงไปในตัวอย่างไม่พอเพราะอาจปนเปื้อน หรือเตรียมยุ่งยาก จึงมีทางเลือกคือใช้สัญญาณมาตรฐานจำลองจากระบบอิเล็กทรอนิกส์แทน ซึ่งเรียกว่า โปรแกรม ERETIC หลักการคำนวณปริมาณน้ำตาลด้วยโปรแกรม ERETIC กำหนดสัญญาณอ้างอิงจำลอง เช่น ที่ค่าเคมีลชิฟต์ 0 ppm หรือจุดที่ไม่ซ้อนทับสัญญาณของน้ำตาล ผู้วิเคราะห์จะสอบเทียบสัญญาณ ERETIC โดยใช้สารมาตรฐานที่มีความเข้มข้นทราบค่าก่อน 1 ครั้ง เพื่อสร้างความสัมพันธ์ระหว่าง พื้นที่พีคสัญญาณ ของ ERETIC กับ จำนวนโมลของสาร จากนั้น นำสเปกตรัมของตัวอย่างน้ำผลไม้มาเทียบสัญญาณน้ำตาล เช่น กลูโคส หรือ ฟรุคโตส กับ สัญญาณ ERETIC โปรแกรมจะคำนวณ ความเข้มข้นของน้ำตาล เช่น มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร หรือ กรัมต่อลิตร โดยใช้สูตรที่ได้จากการสอบเทียบ กล่าวง่าย ๆ คือ โปรแกรมจะ จำลองมาตรฐานภายในเสมือน แล้วคำนวณความเข้มข้นของน้ำตาลจากสัญญาณเทคนิค NMR ของตัวอย่างจริง

ผลการวิเคราะห์น้ำตาลในตัวอย่างน้ำผลไม้คำนวณผ่านโปรแกรม ERETIC เปรียบเทียบกับสารมาตรฐาน เบนโซอิกที่ทดสอบด้วยเทคนิค q NMR ที่อุณหภูมิและสภาวะเดียวกันกับตัวอย่างน้ำผลไม้ โดยคำนวณภายในเครื่องผ่านสมการดังนี้

$$\text{ERETIC} = \frac{A_{\text{ERETIC}}}{A_{\text{BEN}}} * \text{BEN}$$

โดยที่ BEN คือ ความเข้มข้นของกรดเบนโซอิก

A_{BEN} คือ พื้นที่พีคของสัญญาณกรดเบนโซอิก

A_{ERETIC} คือ พื้นที่พีคของสัญญาณ ERETIC

หลังจากการสอบเทียบสัญญาณ ERETIC แล้ว สามารถวัดความเข้มข้นของสารประกอบอื่น ๆ ได้โดยใช้สมการดังนี้

$$\text{compound} = K[\text{ERETIC}] * \frac{A_{\text{compound}}}{A_{\text{ERETIC}}}$$

โดยที่ A_{compound} คือ พื้นที่พีคของสารประกอบ

K คือ จำนวนโปรตอนในพีคที่สนใจและน้ำหนักโมเลกุลของสารนั้น

การวิเคราะห์ด้วยเทคนิค q NMR วิธีมาตรฐานภายใน

คำนวณเปรียบเทียบค่าอินทิกรัลในตำแหน่งค่า Chemical Shift ของน้ำตาลทั้ง 3 ชนิด กับค่าอินทิกรัลของ สารมาตรฐาน TSP- d_4 ที่เติมในตัวอย่าง โดยคำนวณตามสมการ (Sakar et al., 2021)

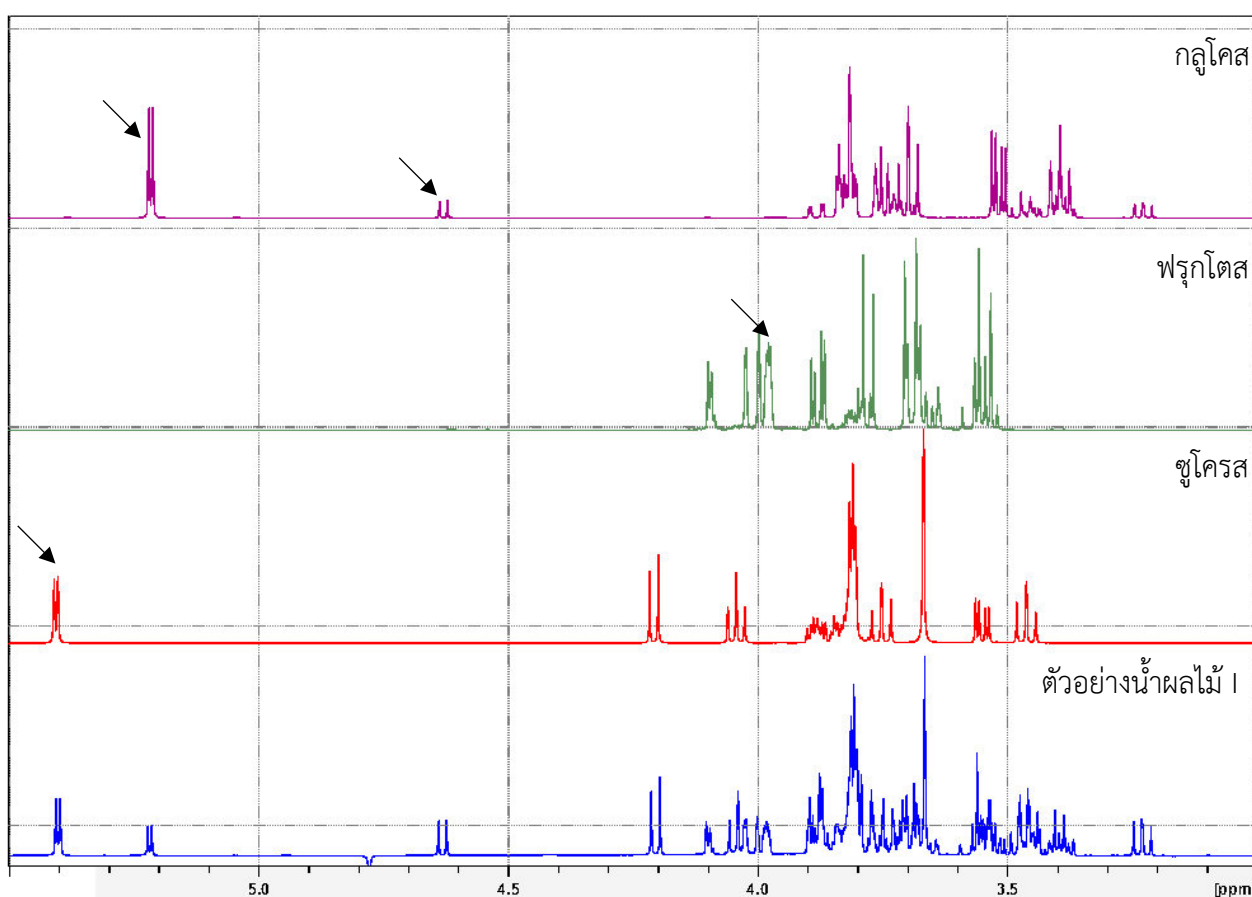
$$W_{\text{sample}} = \frac{I_{\text{sample}}}{I_{\text{std}}} \times \frac{N_{\text{std}}}{N_{\text{sample}}} \times \frac{M_{\text{wx}}}{M_{\text{wstd}}} \times W_{\text{std}}$$

โดยที่	N_{std}	คือ จำนวนโปรตอนของสารมาตรฐาน TSP-d ₄
	I_{std}	คือ ค่าอินทิเกรตของสารมาตรฐาน TSP-d ₄
	N_{sample}	คือ จำนวนโปรตอนของน้ำตาลในน้ำผลไม้
	I_{sample}	คือ ค่าอินทิเกรตของน้ำตาลในน้ำผลไม้
	Mw_X	คือ มวลโมเลกุลของน้ำตาล
	Mw_{std}	คือ สารมาตรฐาน TSP-d ₄
	W_{std}	คือ ความเข้มข้นของสารมาตรฐาน TSP-d ₄
	W_{sample}	คือ แทนความเข้มข้นของตัวอย่างน้ำตาลที่วิเคราะห์ได้

ผลการวิจัย

ผลการศึกษาสัญญาณสเปกตรัมโปรตอนของน้ำตาล

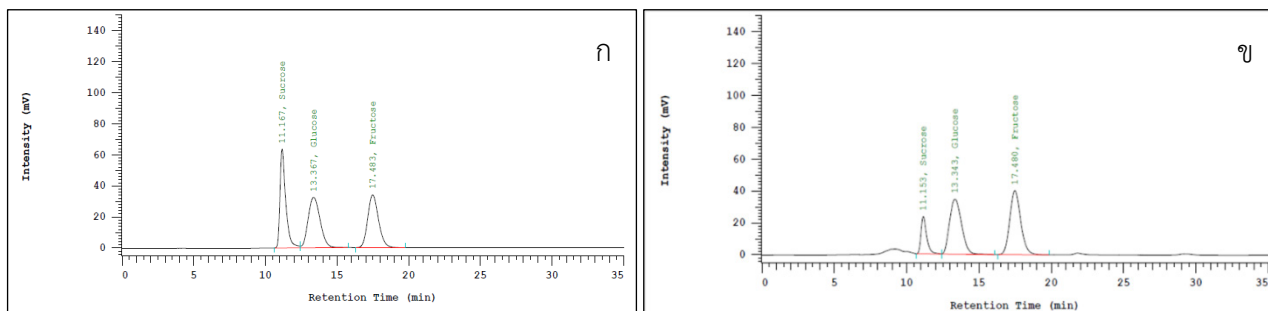
ในการศึกษา ^1H NMR สเปกตรัมของน้ำตาลทั้งสามชนิดในตัวอย่างน้ำผลไม้ ปรากฏสัญญาณโปรตอนบริเวณอะโนเมอริกของแอลฟาไกลูโคสและเบต้าไกลูโคสที่ค่าเคมีคัลชิฟต์ 5.2 ppm และ 4.6 ppm ตามลำดับ นอกจากนี้ ยังพบสัญญาณโปรตอนที่ค่าเคมีคัลชิฟต์ 4.0 ppm ซึ่งเป็นสัญญาณของน้ำตาลฟรุคโตส และสัญญาณโปรตอนที่ค่าเคมีคัลชิฟต์ 5.4 ppm ของน้ำตาลซูโครส โดยเลือกใช้สัญญาณดังกล่าวในการวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลแต่ละชนิด เนื่องจากสัญญาณปรากฏในตำแหน่งที่ไม่ซ้อนทับกับสัญญาณของสารประกอบอินทรีย์อื่นภายในสเปกตรัม และสัญญาณมีลักษณะคมชัด (Navarro et al., 2020) ดังแสดงในภาพที่ 1



ภาพที่ 1 สเปกตรัมโปรตอนของ กลูโคส ฟรุคโตส ซูโครส และตัวอย่างน้ำผลไม้

ผลโครมาโทแกรมของน้ำตาลและผลการวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลในน้ำผลไม้ด้วยเทคนิค HPLC

ในการวิเคราะห์ด้วยเทคนิค HPLC แสดงดังภาพที่ 2 พบว่า โครมาโทแกรมของสารมาตรฐานและตัวอย่างแสดงลักษณะที่ชัดเจนและสามารถระบุชนิดน้ำตาลได้อย่างถูกต้อง สามารถแยกน้ำตาลแต่ละชนิดได้อย่างมีประสิทธิภาพ และผลการวิเคราะห์ พบว่า ปริมาณน้ำตาลทั้งสามชนิดในตัวอย่างน้ำผลไม้จำนวน 9 ตัวอย่าง มีค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ (%RSD) ของการวิเคราะห์ซ้ำภายในตัวอย่างเดียวกันอยู่ในช่วง 0.11 - 3.26% แสดงถึงความแม่นยำของวิธีในระดับที่เหมาะสมสำหรับการประยุกต์ใช้ในงานวิเคราะห์ทางห้องปฏิบัติการ แสดงดังตารางที่ 1



ภาพที่ 2 โครมาโทแกรมของสารมาตรฐานกลูโคส ฟรุคโตส และซูโครส ที่ความเข้มข้น 10,000 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร^ก และโครมาโทแกรมของกลูโคส ฟรุคโตส และซูโครส ในตัวอย่างน้ำผลไม้^ข

ตารางที่ 1 ผลการวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลกลูโคส ฟรุคโตส และซูโครสในตัวอย่างน้ำผลไม้ด้วยเทคนิค HPLC และ ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ (%RSD)

ตัวอย่าง น้ำผลไม้	เทคนิค HPLC					
	กลูโคส (mg/mL)	%RSD	ฟรุคโตส (mg/mL)	%RSD	ซูโครส (mg/mL)	%RSD
A	29.45 ± 0.27	0.91	26.75 ± 0.11	0.40	1.60 ± 0.02	1.08
B	29.31 ± 0.25	0.86	25.45 ± 0.03	0.11	1.50 ± 0.04	2.79
C	29.41 ± 0.15	0.51	25.74 ± 0.10	0.40	1.46 ± 0.04	2.46
D	29.11 ± 0.15	0.51	25.20 ± 0.06	0.24	1.35 ± 0.00	0.35
E	18.86 ± 0.56	2.94	37.04 ± 0.22	0.60	6.36 ± 0.04	0.62
F	30.92 ± 0.46	1.50	34.99 ± 0.48	1.37	20.13 ± 0.27	1.33
G	10.21 ± 0.33	3.26	11.47 ± 0.11	0.99	19.12 ± 0.21	1.08
H	14.47 ± 0.32	2.19	18.75 ± 0.14	0.77	13.06 ± 0.08	0.62
I	15.09 ± 0.38	2.51	14.62 ± 0.15	1.04	23.37 ± 0.30	1.28

ผลการวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลในน้ำผลไม้ด้วยเทคนิค qNMR วิธีมาตรฐานภายนอก

การวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลกลูโคส ฟรุคโตส และซูโครสในตัวอย่างน้ำผลไม้ด้วยเทคนิค qNMR วิธีมาตรฐานภายนอก โดยเปรียบเทียบพื้นที่ใต้พีคของสารมาตรฐานกรดเบนโซอิก ที่ทราบความเข้มข้นที่แน่นอน ซึ่งวิเคราะห์ภายใต้สภาวะเดียวกันกับตัวอย่างน้ำผลไม้ ผลการวิเคราะห์ พบว่า ปริมาณน้ำตาลทั้งสามชนิดในตัวอย่างน้ำผลไม้จำนวน 9 ตัวอย่าง มีค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ (%RSD) ของการวิเคราะห์ซ้ำภายในตัวอย่างเดียวกันอยู่ในช่วง 0.29 - 2.77% แสดงถึงความแม่นยำของวิธีในระดับที่เหมาะสมสำหรับการประยุกต์ใช้ในงานวิเคราะห์ทางห้องปฏิบัติการ แสดงดังตารางที่ 2

ตารางที่ 2 ผลการวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลกลูโคส ฟรุคโตส และซูโครสในตัวอย่างน้ำผลไม้ด้วยเทคนิค q NMR วิธีมาตรฐานภายนอก และ ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ (%RSD)

ตัวอย่าง น้ำผลไม้	เทคนิค q NMR วิธีมาตรฐานภายนอก					
	กลูโคส (mg/mL)	%RSD	ฟรุคโตส (mg/mL)	%RSD	ซูโครส (mg/mL)	%RSD
A	16.98 $\pm$ 0.08	0.45	14.57 $\pm$ 0.08	0.52	1.68 $\pm$ 0.03	1.71
B	17.23 $\pm$ 0.46	2.70	14.10 $\pm$ 0.39	2.77	1.83 $\pm$ 0.03	1.50
C	17.03 $\pm$ 0.12	0.68	14.05 $\pm$ 0.10	0.71	1.68 $\pm$ 0.06	1.46
D	16.28 $\pm$ 0.08	0.47	13.37 $\pm$ 0.08	0.57	1.68 $\pm$ 0.03	1.35
E	11.95 $\pm$ 0.13	1.11	20.72 $\pm$ 0.13	0.61	5.83 $\pm$ 0.06	0.99
F	15.77 $\pm$ 0.08	0.48	21.97 $\pm$ 0.08	0.35	15.08 $\pm$ 0.08	0.51
G	5.92 $\pm$ 0.03	0.49	6.68 $\pm$ 0.06	0.86	14.32 $\pm$ 0.08	0.53
H	8.47 $\pm$ 0.23	2.66	9.88 $\pm$ 0.03	0.29	9.85 $\pm$ 0.20	2.03
I	8.85 $\pm$ 0.15	1.69	8.22 $\pm$ 0.06	0.70	17.20 $\pm$ 0.13	0.77

ผลการวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลในน้ำผลไม้ด้วยเทคนิค q NMR วิธีมาตรฐานภายใน

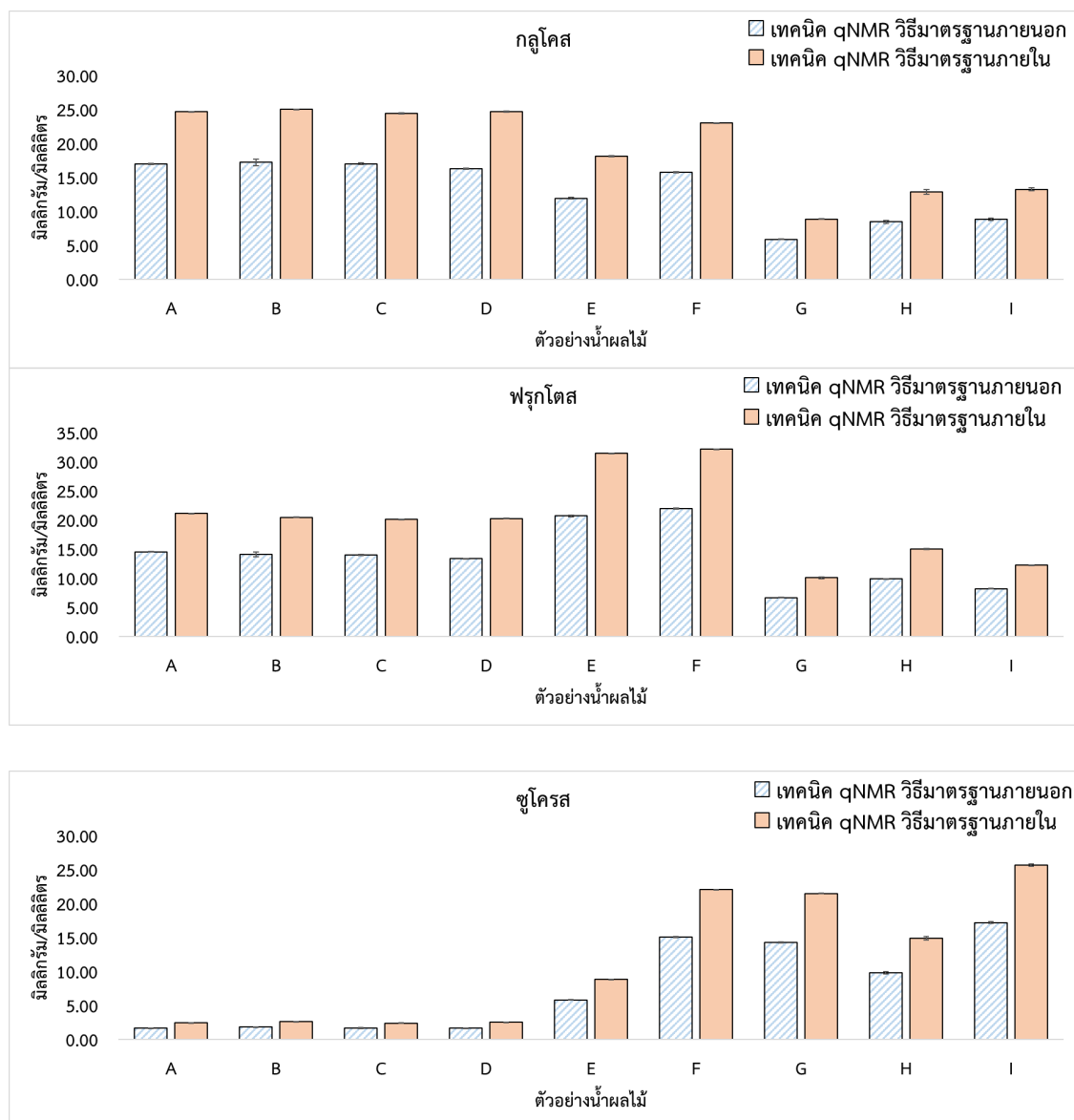
การวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลกลูโคส ฟรุคโตส และซูโครสในตัวอย่างน้ำผลไม้ด้วยเทคนิค q NMR วิธีมาตรฐานภายใน ทำโดยการเติมสาร TSP- d_4 ที่ทราบความเข้มข้นที่แน่นอนในตัวอย่างน้ำผลไม้ เนื่องจากเป็นสารที่ไม่ให้สัญญาณโปรตอนของสาร TSP- d_4 ซ้อนทับกับสัญญาณของน้ำตาลทั้งสามชนิดในสเปกตรัมโปรตอน และสามารถละลายได้ดีในตัวทำละลาย D_2O ซึ่งใช้เป็นสารละลายในการวิเคราะห์ ผลการวิเคราะห์ พบว่า เทคนิค q NMR วิธีมาตรฐานภายใน ให้ค่าปริมาณน้ำตาล ดังตารางที่ 3 โดยมีค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ (%RSD) ของการวิเคราะห์ซ้ำในตัวอย่างเดียวกันอยู่ในช่วง 0.03 - 2.56% ซึ่งอยู่ในระดับที่ยอมรับได้ในทางวิเคราะห์และแสดงให้เห็นถึงความแม่นยำของวิธีการ

ตารางที่ 3 ผลการวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลกลูโคส ฟรุคโตส และซูโครสในตัวอย่างน้ำผลไม้ด้วยเทคนิค q NMR วิธีมาตรฐานภายใน และ ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ (%RSD)

ตัวอย่าง น้ำผลไม้	เทคนิค q NMR วิธีมาตรฐานภายใน					
	กลูโคส (mg/mL)	%RSD	ฟรุคโตส (mg/mL)	%RSD	ซูโครส (mg/mL)	%RSD
A	24.68 $\pm$ 0.02	0.06	21.14 $\pm$ 0.01	0.03	2.45 $\pm$ 0.01	0.47
B	25.03 $\pm$ 0.03	0.10	20.48 $\pm$ 0.02	0.10	2.67 $\pm$ 0.01	0.22
C	24.46 $\pm$ 0.07	0.27	20.16 $\pm$ 0.02	0.09	2.41 $\pm$ 0.05	2.04
D	24.70 $\pm$ 0.05	0.21	20.29 $\pm$ 0.01	0.03	2.54 $\pm$ 0.03	1.27
E	18.14 $\pm$ 0.12	0.64	31.46 $\pm$ 0.05	0.16	8.83 $\pm$ 0.05	0.56
F	23.06 $\pm$ 0.03	0.11	32.17 $\pm$ 0.02	0.05	22.09 $\pm$ 0.02	0.10
G	8.89 $\pm$ 0.03	0.36	10.11 $\pm$ 0.14	1.43	21.51 $\pm$ 0.05	0.23
H	12.89 $\pm$ 0.33	2.56	15.03 $\pm$ 0.06	0.37	14.94 $\pm$ 0.28	1.88
I	13.25 $\pm$ 0.21	1.61	12.25 $\pm$ 0.05	0.42	25.69 $\pm$ 0.18	0.69

ผลการศึกษาเปรียบเทียบการวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลในน้ำผลไม้ระหว่างเทคนิค q NMR วิธีมาตรฐานภายนอก และวิธีมาตรฐานภายใน

จากภาพที่ 3 ซึ่งแสดงผลการวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลในน้ำผลไม้ 9 ตัวอย่าง (A - I) ด้วยเทคนิค q NMR โดยเปรียบเทียบระหว่างวิธีมาตรฐานภายนอกและวิธีมาตรฐานภายใน สำหรับน้ำตาลแต่ละชนิด ได้แก่ กลูโคส ฟรุคโตส และซูโครส



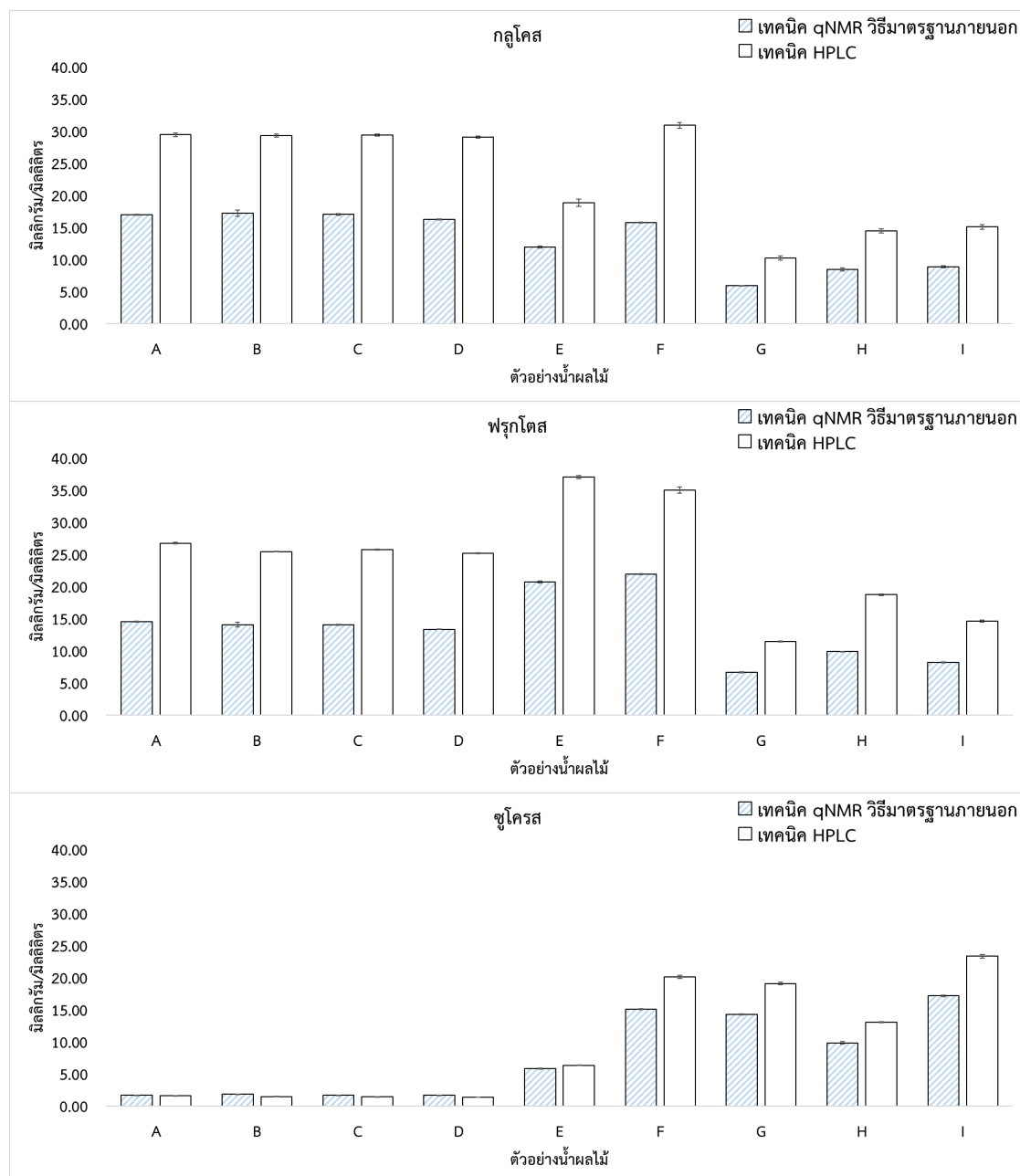
ภาพที่ 3 ผลการเปรียบเทียบการวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลในน้ำผลไม้ระหว่างเทคนิค qNMR วิธีมาตรฐานภายนอก และวิธีมาตรฐานภายใน

ผลการทดสอบของกลูโคสด้วยวิธีมาตรฐานภายในให้ค่าความเข้มข้นของกลูโคสสูงกว่าวิธีมาตรฐานภายนอกอย่างชัดเจนในทุกตัวอย่าง โดยเฉพาะตัวอย่าง A - F บ่งบอกว่า วิธีมาตรฐานภายนอกให้ค่ากลูโคสต่ำกว่าความเป็นจริง ซึ่งอาจเกิดจากความไม่เสถียรของสภาพแวดล้อมหรือความคลาดเคลื่อนของการวัด ในส่วนของฟรุกโตส มีลักษณะความแตกต่างคล้ายกับกลูโคส โดยค่าที่ได้จากวิธีมาตรฐานภายในสูงกว่าทุกตัวอย่าง โดยตัวอย่าง E และ F แสดงผลต่างชัดเจนที่สุด คือวิธีมาตรฐานภายในมีค่ามากกว่าวิธีมาตรฐานภายนอก แนวโน้มนี้สอดคล้องกับสมมติฐานว่าการใช้ วิธีมาตรฐานภายในควบคุมตัวแปรได้ดีกว่า เป็นเช่นนี้เนื่องจากวิธีมาตรฐานภายใน สารมาตรฐานอ้างอิงถูกเติมลงในสารละลายเดียวกันกับสารตัวอย่าง ทำให้มีสภาวะเดียวกันทั้งหมด ได้แก่ ความเข้มข้นแม่เหล็ก อุณหภูมิ ปริมาตรจริงของตัวอย่างในหลอด NMR ความแม่นยำของการซิงน้ำหนั การตั้งค่าพารามิเตอร์การเก็บสัญญาณ (Pulse Delay, Relaxation Time) ดังนั้น สัญญาณของสารมาตรฐานและสารตัวอย่างจะได้รับผลกระทบจาก ตัวแปร

ภายนอก เหมือนกัน ทำให้อัตราส่วนของสัญญาณ นำมาใช้คำนวณความเข้มข้นได้อย่างแม่นยำกว่ามาก ในทางตรงข้าม วิธีมาตรฐานภายนอก จะทำการวัดสารมาตรฐาน แยกกันคนละหลอดกับตัวอย่าง ส่งผลให้เกิดความคลาดเคลื่อนจากปริมาตรตัวอย่างที่ไม่เท่ากัน การตั้งค่าพารามิเตอร์เครื่องที่อาจต่างกันเล็กน้อย ความแตกต่างของสภาพแม่เหล็กในแต่ละหลอด ซึ่งทั้งหมดนี้มีผลต่อค่าความแม่นยำต่ำกว่าวิธีมาตรฐานภายใน (Cullen et al., 2013) และซูโครสมีความแตกต่างระหว่างวิธีมาตรฐานภายในและวิธีมาตรฐานภายนอก ซึ่งเห็นได้ชัดในตัวอย่าง E - I ที่มีปริมาณซูโครสสูง ให้ผลต่างสูงมาก ส่วนตัวอย่าง A - D มีความแตกต่างน้อย เนื่องจากมีปริมาณซูโครสโดยรวมต่ำ โดยรวมเทคนิควิธีมาตรฐานภายในให้ค่าความเข้มข้นน้ำตาล สูงกว่าวิธีมาตรฐานภายนอกอย่างมีนัยสำคัญในทุกกลุ่มน้ำตาล โดยมีความแตกต่างชัดเจนยิ่งขึ้นในตัวอย่างที่มีปริมาณน้ำตาลสูง ซึ่งชี้ให้เห็นว่าเทคนิค วิธีมาตรฐานภายนอกอาจมีข้อจำกัดในการควบคุมความถูกต้อง โดยเฉพาะเมื่อความเข้มข้นเปลี่ยนแปลงในช่วงกว้าง เนื่องจากสภาวะการวัดของสารมาตรฐาน และตัวอย่างไม่เหมือนกัน ส่งผลให้การคำนวณปริมาณอาจมีความคลาดเคลื่อนจากผลของความแตกต่างทางกายภาพ และเคมีของสารละลาย เช่น ความหนืด ความเข้มข้นของโปรตอน และเวลาดังสมมูลของสปิน (T_1 Relaxation) นอกจากนี้ความผิดพลาดในการเตรียมสารมาตรฐานยังอาจส่งผลต่อค่าที่วัดได้ โดยทั่วไปวิธีมาตรฐานภายนอกจึงมีแนวโน้มให้ค่าที่ต่ำกว่าความเป็นจริง และมีความแม่นยำน้อยกว่าวิธีมาตรฐานภายในที่สามารถควบคุมตัวแปรภายในระบบได้ดีกว่า วิธีนี้อาจไม่สามารถให้ผลลัพธ์ที่แม่นยำเท่าวิธีมาตรฐานภายในเนื่องจากข้อเสียของวิธีมาตรฐานภายนอกคือ ความถูกต้องอาจลดลงเมื่อความเข้มข้นของน้ำตาลเปลี่ยนแปลงในช่วงกว้าง และไม่สามารถปรับค่าผลลัพธ์ในตัวอย่างได้เท่าวิธีมาตรฐานภายใน (Ravaglia et al., 2024)

ผลการศึกษาเปรียบเทียบการวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลในน้ำผลไม้ระหว่างเทคนิค q NMR วิธีมาตรฐานภายนอก และเทคนิค HPLC

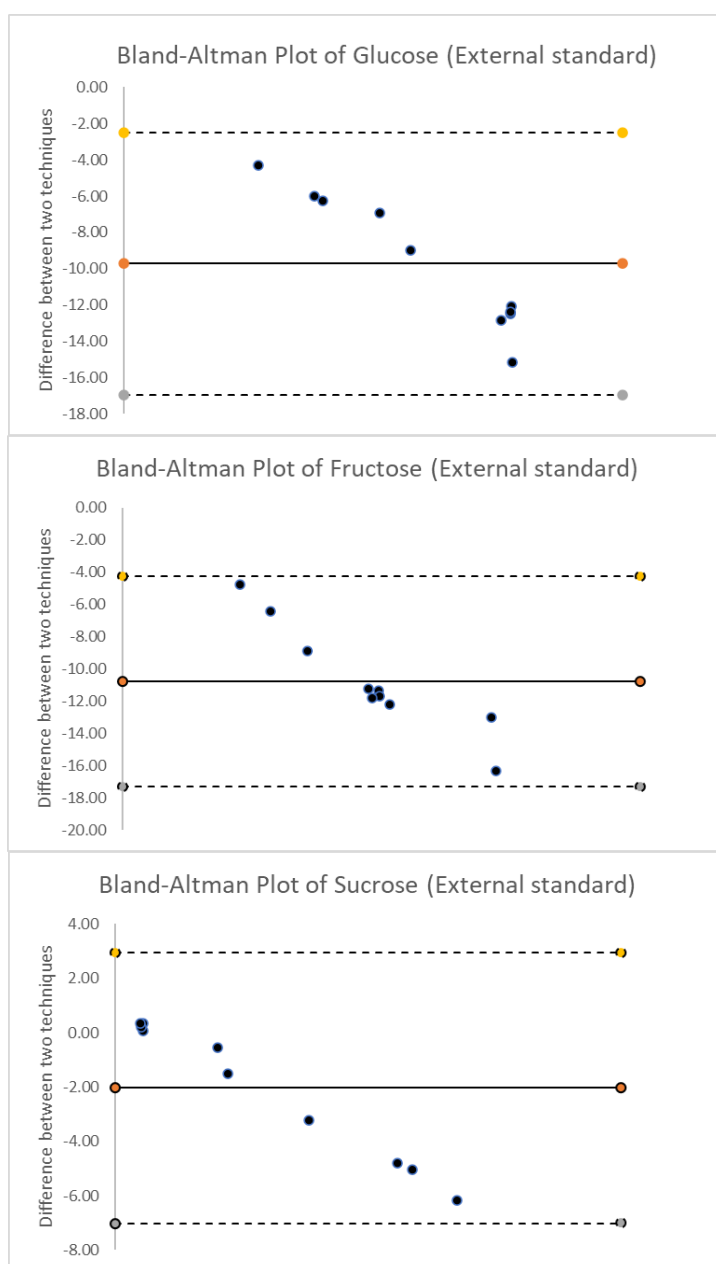
เมื่อวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลในน้ำผลไม้ด้วยเทคนิค q NMR วิธีมาตรฐานภายนอก ให้ผลการวิเคราะห์ที่มีค่าต่ำกว่าเทคนิค HPLC อย่างเห็นได้ชัดทุกตัวอย่าง โดยแสดงผลการวิเคราะห์เชิงปริมาณจากทั้งสองวิธี พบว่า มีความแตกต่างระหว่างค่าที่ได้จากแต่ละเทคนิค ค่าที่ได้จากเทคนิค HPLC มีแนวโน้มสูงกว่าค่าที่ได้จากเทคนิค q NMR อาจเกิดจาก หลักการตรวจวัดแตกต่างกัน โดยเทคนิค HPLC วัดสัญญาณจากการดูดกลืนแสงของโมเลกุล โดยน้ำตาลที่ตรวจวัดด้วย RID ซึ่งมักตอบสนองกับความเข้มข้นสูงมาก แต่เทคนิค q NMR ได้จากจำนวนโปรตอนของสารในสภาพโมเลกุล ซึ่งขึ้นอยู่กับค่าอินทิกรัลและการคลายตัวของสปิน ในทางปฏิบัติ สัญญาณจากเทคนิค HPLC มีความไวสูงกว่า ทำให้ค่าที่วัดได้มีแนวโน้มสูงกว่า q NMR โดยเฉพาะในสารที่มีความเข้มข้นต่ำ อย่างไรก็ตาม ค่าความแตกต่างดังกล่าว ยังอยู่ในขอบเขตที่ยอมรับได้เชิงวิเคราะห์ แสดงให้เห็นว่าวิธี q NMR ยังสามารถใช้แทนเทคนิค HPLC ได้อย่างมีประสิทธิภาพ แสดงดังภาพที่ 4



ภาพที่ 4 ผลการเปรียบเทียบการวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลในน้ำผลไม้ระหว่างเทคนิค *q*NMR วิธีมาตรฐานภายนอก และเทคนิค HPLC

นำข้อมูลมาวิเคราะห์ความสอดคล้องเชิงระบบโดยใช้สถิติ Bland-Altman Plot หาก Mean Difference ใกล้เคียงกับ 0 และค่าความแตกต่างส่วนใหญ่ตกอยู่ในช่วง ± 1.96 SD บ่งชี้ว่าเทคนิค *q*NMR และเทคนิค HPLC ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เพื่อประเมินว่าความแตกต่างของเครื่องมือ พบว่า ค่าความแตกต่างระหว่างผลจากเทคนิค *q*NMR วิธีมาตรฐานภายนอกและเทคนิค HPLC ส่วนใหญ่อยู่ใกล้ค่าศูนย์ แสดงให้เห็นถึงความสอดคล้องกันของทั้งสองเทคนิคในระดับที่น่าพอใจ ความแตกต่างยังอยู่ภายในขอบเขต Limits of Agreement และไม่พบค่าผิดปกติ Outlier ผลในช่วงที่ยอมรับ และไม่แสดงแนวโน้มของความเบี่ยงเบนเชิงระบบอย่างมีนัยสำคัญ ผลการวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลในน้ำผลไม้จากเทคนิค *q*NMR วิธีมาตรฐานภายนอกและเทคนิค HPLC ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ จุดข้อมูลทั้งหมดมีแนวโน้มกระจายตัวอยู่ด้านล่างของเส้นค่าเฉลี่ยศูนย์ (Mean Difference

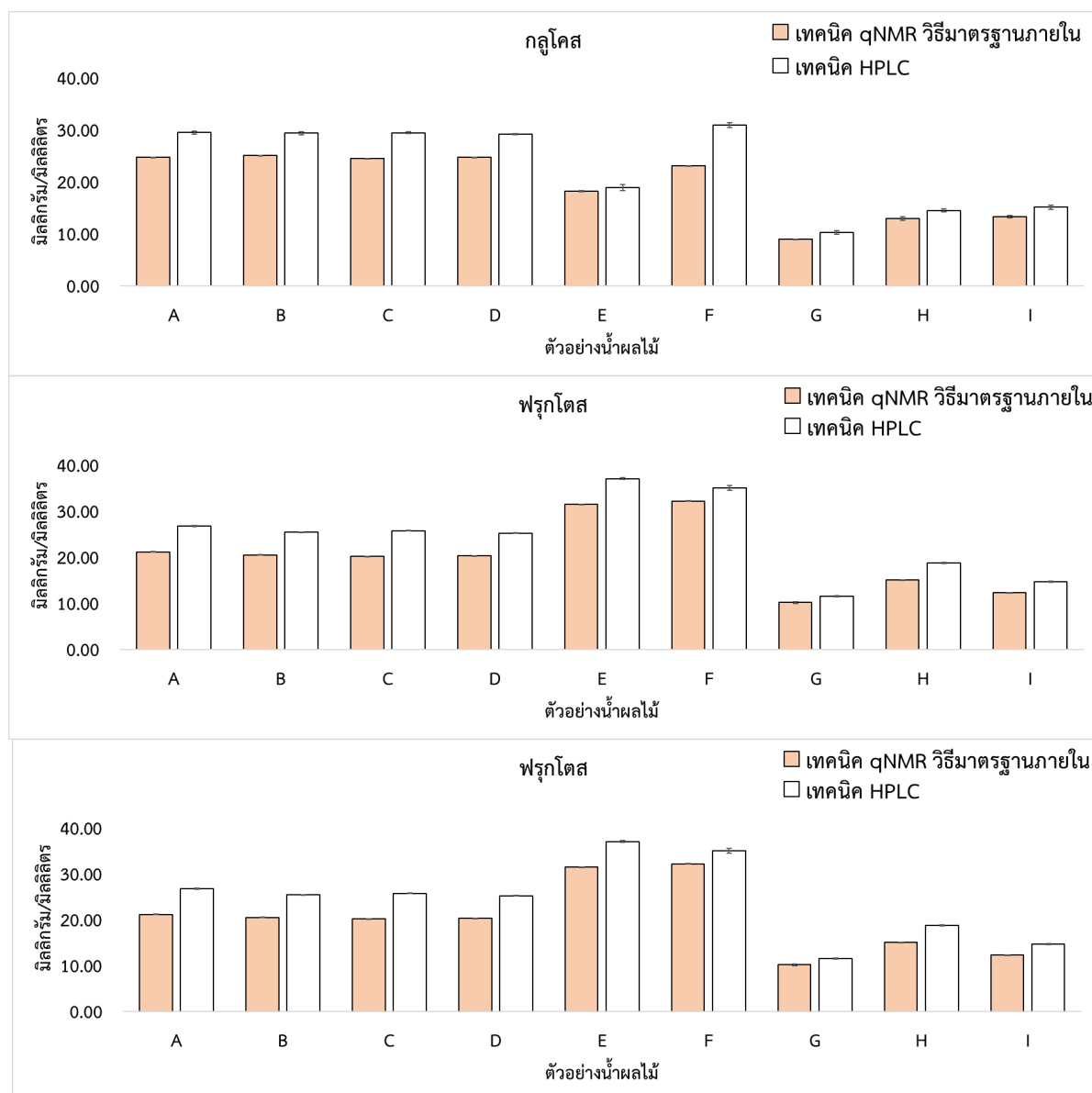
= 0) ซึ่งหมายความว่าค่าที่ได้จากเทคนิค q NMR มีแนวโน้มต่ำกว่าค่าที่ได้จากเทคนิค HPLC ในทุกกรณี แม้จะอยู่ภายในช่วงขอบเขตความสอดคล้อง ลักษณะของกราฟที่จุดข้อมูลกระจายตัวในทิศทางเดียวกัน แสดงถึงการมีความเบี่ยงเบนเชิงระบบระหว่างเทคนิคทั้งสอง ซึ่งอาจบ่งชี้ว่าความแตกต่างไม่ได้เกิดจากความไม่แม่นยำของเทคนิค แต่เกิดจากลักษณะของวิธีวิเคราะห์ โดยเทคนิค q NMR มีแนวโน้มให้ค่าต่ำกว่า อาจเกิดจากการวัดสัญญาณไม่สมบูรณ์จากการซ้อนทับของสัญญาณน้ำตาลหลายชนิดทำให้การรวมพื้นที่ต่ำกว่า การเตรียมความเข้มข้นของสารมาตรฐานที่นำมาเปรียบเทียบ การตั้งค่าพารามิเตอร์ของเทคนิค NMR การเตรียมสารมาตรฐาน ตลอดจนสถานะเมทริกซ์ของตัวอย่าง ความแตกต่างเหล่านี้มีแนวโน้มไปในทิศทางเดียวกัน อย่างไรก็ตามค่าความแตกต่างทั้งหมดอยู่ภายในช่วงขีดจำกัดความสอดคล้อง ซึ่งบ่งชี้ว่าวิธีเทคนิค q NMR ยังคงให้ผลที่สอดคล้องและสามารถใช้แทนเทคนิค HPLC ได้ในเชิงวิเคราะห์ แสดงดังภาพที่ 5



ภาพที่ 5 สถิติ Bland-Altman Plot ระหว่างเทคนิค q NMR วิธีมาตรฐานภายนอกและเทคนิค HPLC

ผลการศึกษาเปรียบเทียบการวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลในน้ำผลไม้ระหว่างเทคนิค qNMR วิธีมาตรฐานภายในและเทคนิค HPLC

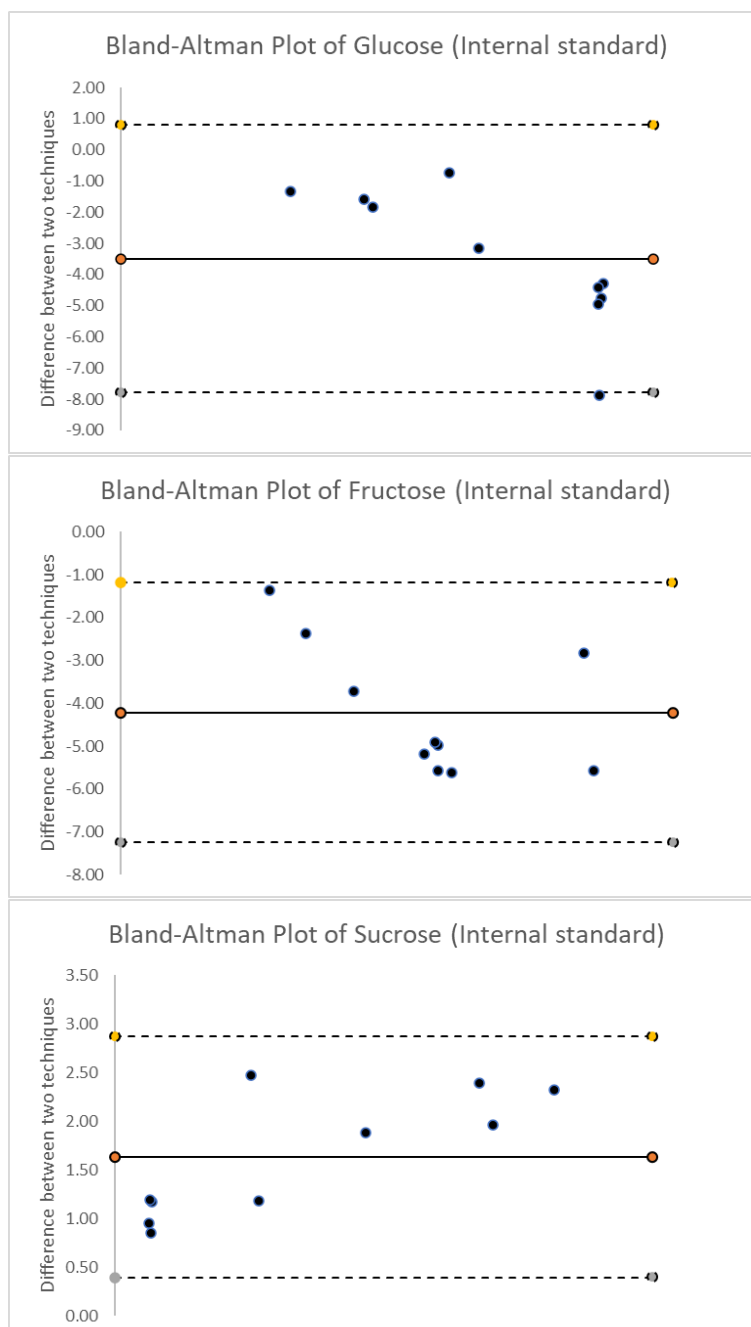
จากภาพที่ 6 ซึ่งแสดงผลการเปรียบเทียบการวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลในน้ำผลไม้ 9 ตัวอย่าง (A - I) ด้วยเทคนิค qNMR วิธีมาตรฐานภายใน และเทคนิค HPLC สำหรับน้ำตาล 3 ชนิด ได้แก่ กลูโคส ฟรุกโตส และซูโครส



ภาพที่ 6 ผลการเปรียบเทียบการวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลในน้ำผลไม้ระหว่างเทคนิค qNMR วิธีมาตรฐานภายใน และเทคนิค HPLC

ผลการวิเคราะห์ พบว่า กลูโคสให้ค่าที่ได้จากเทคนิค HPLC สูงกว่าเทคนิค qNMR วิธีมาตรฐานภายในทุกตัวอย่าง ผลแตกต่างกันเล็กน้อย โดยเฉพาะในตัวอย่าง A - E ที่ค่าของทั้งสองวิธีใกล้เคียงกัน ส่วนตัวอย่าง G, H, I มีความต่างเพิ่มขึ้นเล็กน้อย แต่ยังคงอยู่ในแนวโน้มที่สัมพันธ์กัน ส่วนผลการวิเคราะห์ปริมาณฟรุกโตสเหมือนกับกลูโคส คือ ค่าที่ได้จากเทคนิค HPLC สูงกว่าค่าที่ได้จากเทคนิค qNMR วิธีมาตรฐานภายในแทบทุกตัวอย่าง ตัวอย่าง E และ F มีความต่างค่อนข้างมาก โดยเทคนิค HPLC ให้ค่าสูงกว่า แม้ว่าเทคนิค HPLC ให้ค่าสูงกว่า แต่กราฟแสดงความสัมพันธ์ของแนวโน้มระหว่างทั้งสองเทคนิคบ่งบอกผลอย่างสอดคล้องกัน และผลการวิเคราะห์ของซูโครสมี

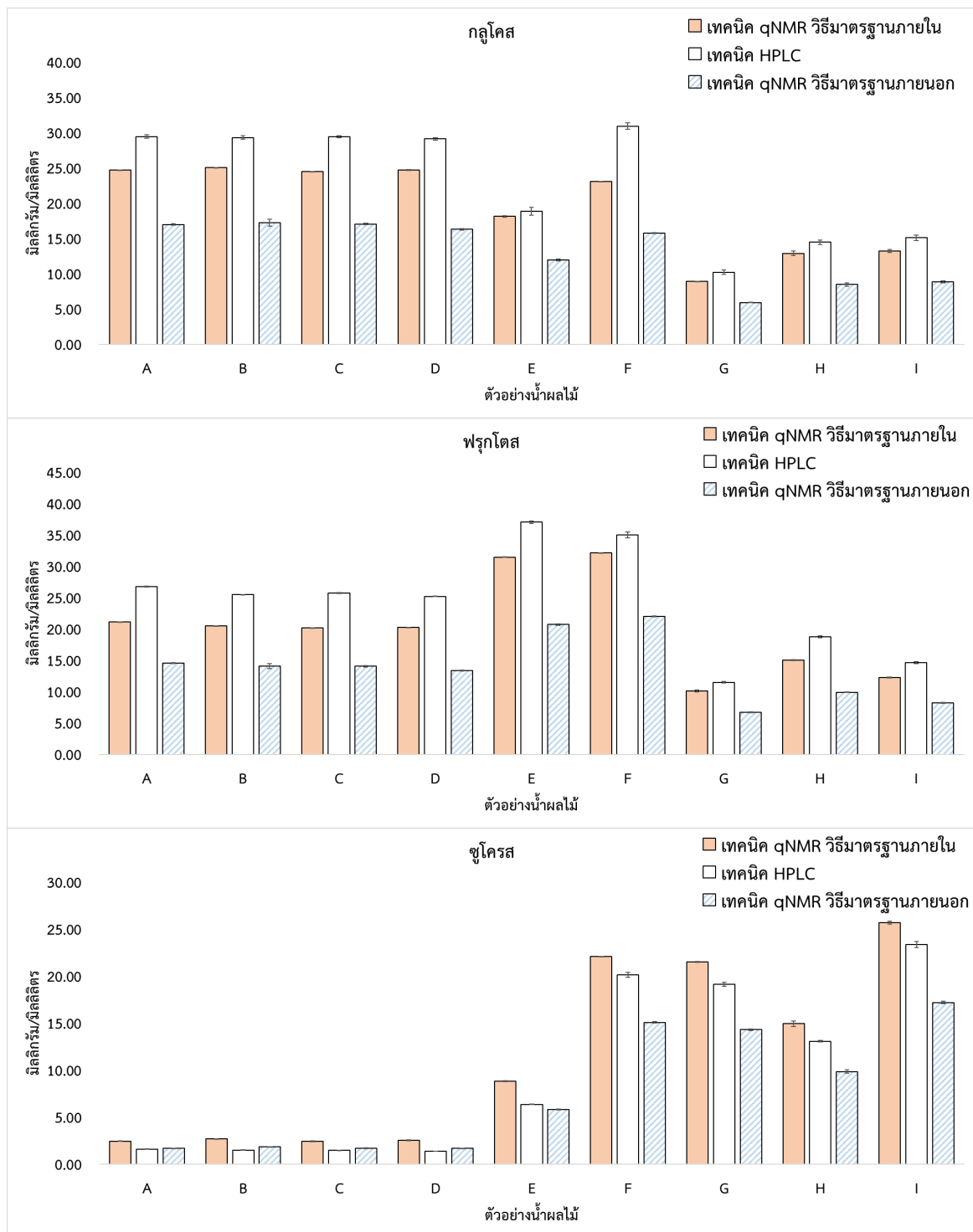
แนวโน้มคล้ายกันกับกลูโคสและฟรุคโตส คือ เทคนิค HPLC ให้ค่าปริมาณมากกว่าเล็กน้อย โดยเฉพาะในตัวอย่าง E - I ที่มีซูโครสสูง ความแตกต่างระหว่างเทคนิคมีความชัดเจนมากขึ้น ส่วนตัวอย่าง A - D ซึ่งมีซูโครสต่ำ จึงมีความแตกต่างระหว่างวิธีน้อยมาก แม้ว่าเทคนิค q NMR วิธีมาตรฐานภายใน จะให้ค่าปริมาณน้ำตาลต่ำกว่า HPLC แต่แนวโน้มผลลัพธ์สอดคล้องกันในทุกตัวอย่าง ความแตกต่างที่พบอยู่ในระดับที่ยอมรับได้เชิงสถิติ จากข้อมูลของ Bland-Altman Plot ดังภาพที่ 7



ภาพที่ 7 สถิติ Bland-Altman Plot ระหว่างเทคนิค q NMR วิธีมาตรฐานภายในและเทคนิค HPLC

ผลการศึกษาเปรียบเทียบการวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลในน้ำผลไม้ระหว่างเทคนิค qNMR วิธีมาตรฐานภายใน เทคนิค qNMR วิธีมาตรฐานภายนอก และเทคนิค HPLC

จากภาพที่ 8 แสดงผลการวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลกลูโคส ฟรุคโตส และซูโครส ในตัวอย่าง A ถึง I โดยเปรียบเทียบทั้ง 3 วิธี ได้แก่ เทคนิค qNMR วิธีมาตรฐานภายใน เทคนิค qNMR วิธีมาตรฐานภายนอก และเทคนิค HPLC



ภาพที่ 8 ผลการศึกษาเปรียบเทียบการวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลในน้ำผลไม้ระหว่างเทคนิค qNMR วิธีมาตรฐานภายใน เทคนิค qNMR วิธีมาตรฐานภายนอก และเทคนิค HPLC

ผลการวิเคราะห์ปริมาณกลูโคส ค่าที่ได้จากเทคนิค HPLC สูงกว่าเทคนิค q NMR ทั้งวิธีมาตรฐานภายในและวิธีมาตรฐานภายนอก โดยเฉพาะเทคนิค q NMR วิธีมาตรฐานภายใน ค่าใกล้เคียงกับเทคนิค HPLC มากกว่าเทคนิค q NMR วิธีมาตรฐานภายนอก และเทคนิค q NMR วิธีมาตรฐานภายนอก มีแนวโน้มให้ค่าต่ำที่สุดในตัวอย่าง A, C, D และ E สำหรับผลการวิเคราะห์ฟรุกโตส มีแนวโน้มใกล้เคียงกับกลูโคส โดยเทคนิค HPLC ให้ค่าค่อนข้างสูงกว่าเทคนิค q NMR วิธีมาตรฐานภายใน ยังให้ค่าที่ใกล้เคียงกับเทคนิค HPLC มากกว่าเทคนิค q NMR วิธีมาตรฐานภายนอกและเทคนิค q NMR วิธีมาตรฐานภายนอกให้ค่าน้อยกว่าทุกตัวอย่าง สำหรับผลการวิเคราะห์ซูโครส พบปริมาณน้ำตาลซูโครส โดยรวมในแต่ละตัวอย่างต่ำกว่าน้ำตาลอื่น ๆ และเทคนิค q NMR วิธีมาตรฐานภายใน ให้ค่าที่ใกล้เคียงเทคนิค HPLC มากกว่าเทคนิค q NMR วิธีมาตรฐานภายนอก อีกทั้งความแตกต่างระหว่างวิธีค่อนข้างชัดในตัวอย่าง F - I ที่มีปริมาณน้ำตาลสูง โดยรวมเทคนิค q NMR วิธีมาตรฐานภายในมีแนวโน้มให้ผลลัพธ์ใกล้เคียงกับเทคนิค HPLC มากที่สุด และเทคนิค q NMR วิธีมาตรฐานภายนอกมีความเบี่ยงเบนต่ำกว่าทั้ง 2 วิธี โดยเฉพาะตัวอย่างที่มีปริมาณน้ำตาลสูง ข้อมูลนี้แสดงให้เห็นถึงความแม่นยำของเทคนิค HPLC และความเชื่อถือได้ของเทคนิค q NMR วิธีมาตรฐานภายในเมื่อใช้ในการวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลในตัวอย่างอาหารหรือน้ำผลไม้

อภิปรายผล

จากการศึกษาสเปกตรัม $^1\text{H-NMR}$ ของสารมาตรฐานน้ำตาลสามชนิด ได้แก่ กลูโคส ฟรุกโตส และซูโครส พบว่า แต่ละสารมีตำแหน่งสัญญาณเคมีเฉพาะตัวในช่วง ppm ที่ไม่ซ้อนทับกันมากนัก โดยเฉพาะตำแหน่งของโปรตอนอะโนเมอริก ซึ่งสามารถใช้แยกแยะและวิเคราะห์ปริมาณได้อย่างแม่นยำ (Bharti et al., 2012) ทั้งนี้เมื่อเปรียบเทียบกับสเปกตรัมของน้ำผลไม้ พบว่า สัญญาณของน้ำตาลทั้งสามชนิดสามารถสังเกตได้ชัดเจน แสดงให้เห็นถึงศักยภาพของเทคนิค q NMR ในการวิเคราะห์เชิงโครงสร้างและเชิงปริมาณของน้ำตาลในสารผสมที่ซับซ้อน (Diehl et al., 2020)

สำหรับการวิเคราะห์ด้วยเทคนิค q NMR วิธีมาตรฐานภายนอก คือสารมาตรฐานไม่ถูกเติมลงในสารตัวอย่างโดยตรง (Simmler et al., 2014) พบว่า ผลการวิเคราะห์ค่าความเข้มข้นของน้ำตาลต่ำกว่าการวิเคราะห์ด้วยเทคนิค HPLC อย่างมีนัยสำคัญในบางตัวอย่าง แม้ว่าค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ (%RSD) จะอยู่ในช่วงที่ยอมรับได้ คือ 0.29 - 2.77% แต่สาเหตุที่ผลลัพธ์ต่ำกว่านั้นอาจมาจากความไม่แน่นอนของการเตรียมตัวอย่างและสารมาตรฐานหรือข้อจำกัดของการเปรียบเทียบพื้นที่ใต้พีคในสารละลายต่างตัวอย่าง อย่างไรก็ตาม การวิเคราะห์ Bland-Altman Plot ระหว่างเทคนิค q NMR วิธีมาตรฐานภายนอก และเทคนิค HPLC พบว่า ค่าความแตกต่างของผลส่วนใหญ่อยู่ในช่วง ± 1.96 SD ของค่าความแตกต่างเฉลี่ย แสดงให้เห็นว่าทั้งสองเทคนิคมีความสอดคล้องกันในระดับที่ยอมรับได้ (Bland & Altman, 1999)

อย่างไรก็ตามการวิเคราะห์ด้วยเทคนิค q NMR วิธีมาตรฐานภายใน แสดงผลที่มีความใกล้เคียงกับการวิเคราะห์ด้วยเทคนิค HPLC มากกว่า โดยให้ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ ในช่วง %RSD 0.03 - 2.56% ซึ่งสะท้อนถึงความเสถียรของเทคนิค และการวิเคราะห์ Bland-Altman Plot ระหว่างเทคนิค q NMR วิธีมาตรฐานภายในและเทคนิค HPLC แสดงให้เห็นถึงระดับความสอดคล้องสูง ไม่มีค่าผิดปกติหรือ Outlier และความแตกต่างของค่าการวิเคราะห์อยู่ในขอบเขตที่ยอมรับได้ตามเกณฑ์เชิงสถิติ (Bland & Altman, 1999)

สำหรับการวิเคราะห์ด้วยเทคนิค HPLC พบว่า ผลการตรวจวัดน้ำตาลในตัวอย่างน้ำผลไม้ทั้ง 9 ตัวอย่าง มีความแม่นยำให้ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ ในช่วง %RSD 0.11 - 3.26% และสามารถแยกน้ำตาลแต่ละชนิดได้อย่างมีประสิทธิภาพ โครมาโทแกรมของสารมาตรฐานและตัวอย่าง แสดงลักษณะที่ชัดเจนและสามารถระบุชนิดน้ำตาลได้อย่างถูกต้อง ซึ่งสนับสนุนความน่าเชื่อถือของผลการวิเคราะห์ด้วยเทคนิค HPLC ซึ่งเป็นวิธีที่ยอมรับโดยทั่วไปในการวิเคราะห์น้ำตาลในอาหารและเครื่องดื่ม (Magwaza et al., 2015)

จากการเปรียบเทียบผลการวิเคราะห์ระหว่างเทคนิค q NMR วิธีมาตรฐานภายใน เทคนิค q NMR วิธีมาตรฐานภายนอกและเทคนิค HPLC พบว่า เทคนิค q NMR วิธีมาตรฐานภายใน ให้ผลที่มีความน่าเชื่อถือและใกล้เคียงเทคนิค HPLC มากที่สุด รองลงมาคือเทคนิค q NMR วิธีมาตรฐานภายนอก ที่มีความคลาดเคลื่อนเล็กน้อย แต่ยังอยู่ในระดับที่สามารถยอมรับได้สำหรับงานวิเคราะห์ในห้องปฏิบัติการ อาจเกิดจากเทคนิค q NMR วิธีมาตรฐานภายใน สารมาตรฐานถูกเติมลงในสารตัวอย่างโดยตรง ดังนั้น ตัวอย่างและสารมาตรฐานจะอยู่ในสภาวะเดียวกันทุกประการ ได้แก่ ความเข้มข้นแม่เหล็ก ระยะเวลาการคลายตัวของสปิน สภาพตัวทำละลาย ทำให้การคำนวณปริมาณจากเทคนิค q NMR วิธีมาตรฐานภายใน ให้ค่าที่สูงกว่าวิธีมาตรฐานภายนอก ซึ่งจะมีค่าใกล้เคียงกับค่าที่ได้จากเทคนิค HPLC มากกว่า ในขณะที่วิธีมาตรฐานภายนอก สภาวะการวัดของสารมาตรฐานและตัวอย่างไม่เหมือนกัน ส่งผลให้การคำนวณปริมาณอาจมีความคลาดเคลื่อนจากผลของความแตกต่างทางกายภาพและเคมีของสารละลาย เช่น ความหนืด ความเข้มข้นของโปรตอน และระยะเวลาการคลายตัวของโปรตอนในน้ำตาล (Fakhar et al., 2024) อีกทั้งเทคนิค q NMR เตรียมตัวอย่างง่าย ไม่มีการแยกด้วยโครมาโทกราฟี และไม่ทำลายตัวอย่าง จึงลดขั้นตอน การใช้ตัวทำละลาย เวลา ความซับซ้อนของวิธีการวิเคราะห์ เมื่อเทียบกับเทคนิค HPLC โดยเฉพาะในตัวอย่างที่สัญญาณไม่ทับกัน (Wang et al., 2021)

สรุปผลการวิจัย

ผลการศึกษาวิธีการวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลกลูโคส น้ำตาลฟรุคโตส และน้ำตาลซูโครสในตัวอย่างน้ำผลไม้ด้วยเทคนิค q NMR วิธีมาตรฐานภายนอกและวิธีมาตรฐานภายใน พบว่า เทคนิค q NMR วิธีมาตรฐานภายในแสดงศักยภาพที่ดีในด้านความแม่นยำ และมีความสะดวกในการเตรียมตัวอย่าง ส่วนผลการศึกษาเพื่อเปรียบเทียบผลการวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลกลูโคส น้ำตาลฟรุคโตส และน้ำตาลซูโครสในตัวอย่างน้ำผลไม้ระหว่างเทคนิค q NMR และเทคนิค HPLC โดยใช้สถิติ Bland-Altman Plot พบว่า ค่าความแตกต่างอยู่ในช่วง ± 1.96 SD ซึ่งเทคนิค HPLC ยังคงเป็นวิธีมาตรฐานมีความแม่นยำสูง แต่ใช้เวลานานในการวิเคราะห์หาปริมาณสารต่อ 1 ซ้ำ ใช้เวลา 35 นาที โดยวิเคราะห์ 3 ซ้ำและใช้เวลาวิเคราะห์สารมาตรฐาน 5 ความเข้มข้น คิดเป็น 280 นาที ในขณะที่เทคนิค q NMR ใช้เวลาเพียง 13 นาที ต่อ 1 ซ้ำ อีกทั้งข้อได้เปรียบสำคัญของเทคนิค q NMR วิธีมาตรฐานภายในเมื่อเทียบกับเทคนิค HPLC คือ เป็นการวัดโดยตรงเชิงปริมาณ ไม่ต้องใช้สารมาตรฐาน ไม่ต้องเสียเวลาในการกำหนดกราฟมาตรฐาน เทคนิค q NMR ให้ค่าโดยอาศัยความสัมพันธ์เชิงปริมาณของพื้นที่สัญญาณ รวมทั้งมีความถูกต้องของความบริสุทธิ์ของสารมาตรฐานอ้างอิงได้โดยตรง (Certified Reference Material) ผลจากเทคนิค q NMR สามารถอ้างอิงกลับปหาสารมาตรฐานได้ง่ายกว่า ในขณะที่เทคนิค HPLC จำเป็นต้องเจือจางสารมาตรฐานแต่ละความเข้มข้นเพื่อกำหนดกราฟมาตรฐานซึ่งอาจเกิดความผิดพลาดจากการเจือจาง และเทคนิค q NMR วัดพื้นที่สัญญาณเฉพาะของสาร ถ้าสัญญาณที่เลือกไม่ซ้อนทับกับสิ่งเจือปน แม้จะมีเกลือ น้ำ หรือสารที่ไม่ให้สัญญาณในโปรตอนก็并不会ทำให้ผลเบี่ยงเบน (Weber et al., 2013) และเมื่อพิจารณาความแม่นยำ (Precision) ประเมินจากค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์หรือ %RSD ของการวิเคราะห์ซ้ำในตัวอย่างเดียวกัน ยิ่งค่า %RSD ต่ำ ความเที่ยงตรงสูง พบว่า เทคนิค q NMR วิธีมาตรฐานภายใน มีช่วงค่า %RSD เท่ากับ 0.03 - 2.56% มีความแม่นยำที่สุดในสามวิธี ในขณะที่เทคนิค HPLC มีช่วงค่า %RSD เท่ากับ 0.11 - 3.26% และเทคนิค q NMR วิธีมาตรฐานภายนอก มีช่วงค่า %RSD เท่ากับ 0.29 - 2.77% สรุปเทคนิค q NMR วิธีมาตรฐานภายใน (TSP- d_4) ให้ค่าความแม่นยำดีที่สุด ทั้งสามเทคนิคมีค่า %RSD < 5% ซึ่งอยู่ในเกณฑ์ตามมาตรฐาน AOAC (Latimer, 2023)

การใช้เทคนิค q NMR วิธีมาตรฐานภายใน สามารถนำไปประยุกต์ใช้ในการวิเคราะห์น้ำตาลในเครื่องดื่มหรือผลิตภัณฑ์อาหารอื่น ๆ ได้ การใช้วิธีมาตรฐานภายในวิเคราะห์ด้วยเทคนิค q NMR ช่วยลดความคลาดเคลื่อนของผลลัพธ์ได้ดีขึ้นอย่างชัดเจน ทั้งในแง่ของการลดค่าความแตกต่างเฉลี่ย และการลดการกระจายตัวของค่าความแตกต่าง

รายตัวอย่าง ทั้งนี้ผลการศึกษานี้สนับสนุนว่าเทคนิค q NMR เป็นเทคนิคทางเลือกที่เหมาะสม โดยเฉพาะกรณีที่ต้องการความรวดเร็ว ความเรียบง่าย และสามารถวิเคราะห์ได้ทั้งเชิงปริมาณและโครงสร้างในคราวเดียวกัน

ข้อเสนอแนะการวิจัย

แม้ว่างานวิจัยนี้แสดงให้เห็นถึงศักยภาพของเทคนิค q NMR ในการวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลในน้ำผลไม้ได้อย่างมีประสิทธิภาพ แต่ยังมีข้อจำกัดบางประการที่ควรพิจารณาในการปรับปรุงเพื่อการศึกษาต่อไป เช่น ตัวอย่างน้ำผลไม้มีองค์ประกอบที่ซับซ้อน เช่น กรดอินทรีย์ วิตามิน หรือสารฟีนอลิก ซึ่งอาจก่อให้เกิดสัญญาณรบกวนหรือซ้อนทับกับสัญญาณของน้ำตาลบางชนิดได้ จึงควรพัฒนาขั้นตอนเตรียมตัวอย่างที่เหมาะสมมากขึ้น เช่น การกรองหรือการสกัดแบบเลือกเฉพาะ เพื่อแยกน้ำตาลออกจากเมทริกซ์ก่อนการวิเคราะห์ และมีข้อจำกัดของการใช้วิธีอ้างอิงมาตรฐานภายนอก อาจเกิดจากความไม่สม่ำเสมอในการเตรียมสารละลาย และการเปลี่ยนแปลงของปริมาตรอย่างเล็กน้อยส่งผลให้ผลการวิเคราะห์คลาดเคลื่อนได้ ควรปรับปรุงโดยใช้ การสอบเทียบแบบหลายระดับความเข้มข้น หรือเลือกใช้วิธีมาตรฐานภายในเป็นหลักในงานวิเคราะห์จริง

กิตติกรรมประกาศ

คณะผู้วิจัยขอขอบคุณผู้อำนวยการสำนักเครื่องมือวิทยาศาสตร์และการทดสอบ หัวหน้าฝ่ายบริการเครื่องมือวิจัยทางวิทยาศาสตร์ สำนักเครื่องมือวิทยาศาสตร์และการทดสอบ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ ที่สนับสนุนผู้วิจัยให้มีการปรับปรุงพัฒนางานอย่างต่อเนื่องด้วยหลักการโคเซ็นตามโครงการโคเซ็นที่ 5/68 ต่อยอดจากงานพัฒนาสู่งานวิจัย เพื่อพัฒนาศักยภาพของการทดสอบและบริการ อีกทั้งอำนวยความสะดวกในการใช้งานเครื่องมือวิจัยทางวิทยาศาสตร์ และขอขอบคุณ คุณมงคล ประวัติบริสุทธิ์ สำหรับการเป็นที่ปรึกษาด้าน q NMR ในการดำเนินงานวิจัยในครั้งนี้จนสำเร็จลุล่วงตามเป้าหมาย

การใช้ปัญญาประดิษฐ์ (Generative AI) ในต้นฉบับบทความ

ผู้เขียนใช้เครื่องมือปัญญาประดิษฐ์ (Generative AI) คือ ChatGPT ช่วยปรับปรุงข้อความ การตรวจแก้ภาษา การสรุปเนื้อหา การแปลภาษา ทั้งนี้ผู้เขียนได้ตรวจสอบความถูกต้อง ความครบถ้วน ความเหมาะสมของเนื้อหาด้วยตนเอง และเป็นผู้รับผิดชอบสูงสุดต่อเนื้อหาทั้งหมดของบทความที่ได้รับการตีพิมพ์ รวมถึงความถูกต้องของรายการอ้างอิงที่ปรากฏในเอกสารอ้างอิงท้ายบทความ

คำชี้แจงบทบาทผู้นิพนธ์ (CRediT Author Statement)

ศิริวรรณ พงศ์พฤษาพัฒนา: การตรวจสอบความถูกต้อง; การวิเคราะห์เชิงรูปแบบ; การดำเนินการวิจัย; การจัดการข้อมูล; การเขียนต้นฉบับบทความ; การทบทวนต้นฉบับบทความ; การสร้างภาพประกอบ; การกำกับดูแล; การประสานงานโครงการ. **ทรงสุตา พรหมทอง:** การคิดค้นแนวคิด; การออกแบบระเบียบวิธี; การตรวจสอบความถูกต้อง; การวิเคราะห์เชิงรูปแบบ; การดำเนินการวิจัย; การจัดการข้อมูล; การทบทวนต้นฉบับบทความ. **สุภาพร ชินผา:** การออกแบบระเบียบวิธี; การตรวจสอบความถูกต้อง; การวิเคราะห์เชิงรูปแบบ; การดำเนินการวิจัย.

เอกสารอ้างอิง

- Akoka, S., Barantin, L., & Trierweiler, M. (1999). Concentration measurement by proton NMR using the ERETIC method. *Analytical Chemistry*, 71, 2554-2557.
- Akyuz, E., Baskan, K. S., Tutem, E., & Apak, R. (2021). High performance liquid chromatographic method with post-column detection for quantification of reducing sugars in foods. *Journal of Chromatography A*, 1660, 462664.
- Bharti, S. K., & Roy, R. (2012). Quantitative ¹H NMR spectroscopy. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 35, 5-26.
- Biswas, A., Borse, B. B., & Chaudhari, S. R. (2025). Quantitative NMR analysis of sugars in natural sweeteners: Profiling in honey, Jaggery, date syrup, and coconut sugar. *Food Research International*, 199, 115358.
- Bland, J. M., & Altman, D. G. (1999). Measuring agreement in method comparison studies. *Statistical Methods in Medical Research*, 8(2), 135-160.
- Choi, K., Myoung, S., Seo, Y., & Ahn, S. (2021). Quantitative NMR as a versatile tool for the reference material preparation. *Magnetochemistry*, 7(1), 15.
- Cullen, C. H., Ray, G. J., & Szabo, C. M. (2013). A comparison of quantitative nuclear magnetic resonance methods: Internal, external, and electronic referencing. *Magnetic Resonance Chemistry*, 51(11), 705-713.
- Diehl, B., Holzgrabe, U., Monakhova, Y., & Schönberger, T. (2020). Quo Vadis qNMR? *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 177, 112847.
- Duangdee, N., Chamboonchu, N., Kongkiatpaiboon, S., & Prateeptongkum, S. (2019). Quantitative ¹H NMR spectroscopy for the determination of oxyresveratrol in *Artocarpus lacucha* heartwood. *Phytochemical Analysis*, 30(6), 617-622.
- Fakhar, H. I., Kasperek, A., Kolodziejewski, K., Grunin, L., Öztö, M. H., Hayat, M. Q., Janjua, H. A., & Kruk, D. (2024). Universal ¹H spin-lattice NMR relaxation features of sugar-a step towards quality markers. *Molecules*, 29(11), 2422.
- Jayaprakasha, G. K., & Patil, B. S. (2016). A metabolomics approach to identify and quantify the phytochemicals in watermelons by quantitative ¹H NMR. *Talanta*, 153, 268-277.
- Latimer, G.W. (2023). *Official methods of analysis of AOAC International* (22nd ed.). AOAC International.
- Lupu, D., Sammani, M.S., Palacio, E., Hancu, G., & Ferrer, L. (2025). Comprehensive honey analysis: A novel HPLC-DAD method for hydroxymethylfurfural quantification and quality evaluation via diastase activity and sugar profile determination. *Journal of Food Composition and Analysis*, 137, 106925.
- Magwaza, L. S., & Opara, U. L. (2015). Analytical methods for determination of sugars and sweetness of fresh and processed fruit and vegetables. *Scientia Horticulturae*, 184, 179-192.
- Marchetti, L., & Pellati, F., & Benvenuti, S., & Bertelli, D. (2019). Use of ¹H NMR to detect the percentage of pure fruit juices in blends. *Molecules*, 24(14), 2592.

- Navarro, Y., Soengas, R., Iglesias, M.J., & Ortiz, F. L. (2020). Use of NMR for the analysis and quantification of the sugar composition in fresh and store-bought fruit juices. *Journal of Chemical Education*, 97(3), 831-837.
- Ravaglia, L. M., Oliveira, P. D., Holzgrabe, U., & Alcantara, G. B. (2024). qNMR in natural products: practical approaches. What nobody tells you before starting your qNMR study! *Frontiers in Natural Products*, 3, 1416195.
- Sakarat, N., Prapamongpan, P., Sae-Lim, S., Saleepochn, T., Kongkathip, B., Kongkathip, N., Yakhampom, S., Wongprom, J., & Chuawong, P. (2021). A quick and convenient ^1H quantitative NMR method for determination of bioactive pyranocoumarins from *Clausena excavate*. *Phytochemistry Letters*, 45, 126-131.
- Simmler, C., Napolitano, J. G., McAlpine, J. B., Chen, S. N., & Pauli, G. F. (2014). Universal quantitative NMR analysis of complex natural samples. *Current Opinion in Biotechnology*, 25, 51-59.
- Wang, M., Wang, H., Zheng, H., Uhrin, D., Dewhurst, R. J., & Roehe, R. (2021). Comparison of HPLC and NMR for quantification of the main volatile fatty acids in rumen digesta. *Scientific Reports*, 11, 24337.
- Weber, M., Hellriegel, C., Rück, A., Sauermoser, R., & Wüthrich, J. (2013). Using high-performance quantitative NMR (HP-qNMR®) for certifying traceable and highly accurate purity values of organic reference materials with uncertainties <0.1 %. *Accreditation and Quality Assurance*, 18, 91-98.
- Yang, W. B., Wang, S. H., & Chen, Y. T. (2020). qNMR as a tool for determination of six common sugars in foods. *Applications of NMR Spectroscopy*, 8, 1-24.
- Zhang, Y. Y., Zhang, J., Zhang, W. X., Wang, Y., Wang, Y. H., Yang, Q. Y., & Wu, S. (2021). Quantitative ^1H nuclear magnetic resonance method for assessing the purity of dipotassium glycyrrhizinate. *Molecules*, 26(12), 3549.