# การพัฒนาวิธีการตรวจหาปริมาณน้ำตาลฟรุกโตส กลูโคส และซูโครส ในน้ำผึ้งด้วยเทคนิค LC-MS

ชัชวาลย์ โรจนทรัพย์ วิชุนันท์ ลีวรรณ์ วิภาดา สิริสมภพชัย สราวุธ ชูกระชั้น

## บทคัดย่อ

ค่าน้ำตาล ฟรุกโตส กลูโคส และซูโครสมีความสำคัญต่อน้ำผึ้ง เนื่องจากเป็นค่าที่บ่งชี้ได้ว่าน้ำผึ้งที่ได้มามีการผสมซูโครสลงไปในกระบวนการเลี้ยงผึ้งมีการปนเปื้อนหรือตกหล่นของซูโครสลงไปในรังผึ้ง โดยค่าน้ำตาลกลูโคสรวมกับน้ำตาลฟรุกโตสไม่น้อยกว่าร้อยละ 60 ของน้ำหนัก ส่วนน้ำตาลซูโครสต้องไม่เกินร้อยละ 5 ของน้ำหนัก หากค่าของน้ำตาลไม่เป็นไปตามมาตรฐานสินค้าเกษตร มกษ. 8003-2556 อาจเข้าเกณฑ์น้ำผึ้งผสมหรือเครื่องดื่มผสมน้ำผึ้ง ไม่ใช่น้ำผึ้งแท้และมีการจำหน่ายในราคาของน้ำผึ้งแท้ซึ่งมีราคาแพงกว่าเครื่องดื่มทั่วไป ดังนั้นการพัฒนาวิธีการตรวจหาปริมาณฟรุกโตส กลูโคส และซูโครสในน้ำผึ้งด้วยจึงมีความสำคัญอย่างยิ่ง เพื่อควบคุมคุณภาพของน้ำผึ้งให้เป็นไปตามเกณฑ์มาตรฐาน ในงานวิจัยนี้ได้พัฒนาเทคนิคการตรวจวัดโดยเทคนิคลิควิดโครมาโทกราฟี-แมสสเปกโทรเมตรี (LC-MS) ใช้แหล่งกำเนิดไอออน (ion source) แบบ electrospray ionization (ESI) ที่ตรวจวัดเป็นแบบไอออนลบ โดยกำหนด m/z ดังนี้ m/z ของฟรุกโตสและกลูโคสเท่ากับ 179 และ m/z ของซูโครสเท่ากับ 341 สภาวะการแยกสารประกอบด้วยคอลัมน์ AQS $NH_2$ ขนาด 4.6 X 150 มิลลิเมตร 5 ไมโครเมตร ใช้น้ำและอะซีโตไนไตรล์เป็นเฟสเคลื่อนที่ โดยมีระบบการแยกชนิดสัดส่วนแบบคงที่อัตราส่วน 25 ต่อ 75 อัตราการไหล 0.5 มิลลิลิตรต่อนาที เวลาที่ใช้ในการวิเคราะห์ทั้งหมด 20 นาที ซึ่งมีค่าความเป็นเส้นตรงอยู่ในช่วง 1-50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร วิธีที่ได้พัฒนาขึ้นนี้สามารถประยุกต์ใช้ในการวิเคราะห์หาปริมาณฟรุกโตส กลูโคส และซูโครสในน้ำผึ้ง โดยได้ทำการวิเคราะห์ตัวอย่างน้ำผึ้งจำนวน 10 ตัวอย่าง ผลที่ได้ปริมาณฟรุกโตสอยู่ในช่วง 31.22-40.53 เปอร์เซ็นต์ กลูโคสอยู่ในช่วง 28.69-32.83 เปอร์เซ็นต์ ฟรุกโตส และกลูโคสรวมกันอยู่ในช่วง 61.30-70.04 เปอร์เซ็นต์ และซูโครสอยู่ในช่วง 1.93-4.58 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งตัวอย่างทั้ง 10 ตัวอย่างเป็นไปตามเกณฑ์มาตรฐาน

**คำสำคัญ** : ฟรุกโตส, กลูโคส, ซูโครส, ลิควิดโครมาโทกราฟี-แมสสเปกโทรเมตรี

กลุ่มตรวจสอบคุณภาพเนื้อสัตว์และผลผลิตจากสัตว์ สำนักตรวจสอบคุณภาพสินค้าปศุสัตว์ กรมปศุสัตว์ ถ.ติวานนท์ ต.บางกะดี อ.เมือง จ.ปทุมธานี 12000; โทรศัพท์ 0-2967-9727

# Determination of fructose glucose and sucrose in honey by LC-MS

Chatchawan Rodjanasap Vichunan Leewan  Wiphada Sirisomphobchai Sarawut Chukachan

**Abstract**

The amount of fructose, glucose, and sucrose is important for evaluating the quality of honey. These values can indicate whether the honey has been mixed with sucrose during the beekeeping process, contaminated, or if sucrose has inadvertently entered the honeycomb. The combined fructose and glucose content must be at least 60 percent by weight, while sucrose should not exceed 5 percent by weight. If the sugar content does not meet these specified criteria, it may suggest that the product is mixed honey or a beverage containing honey. Such products are not genuine honey but are often sold at the higher price of real honey despite being of lower quality. Detecting the fructose, glucose, and sucrose content in honey is crucial for ensuring its quality and that it meets standard criteria. This helps prevent consumer exploitation by confirming that the honey complies with established standards. In this research, a measurement technique using liquid chromatography-mass spectrometry (LC-MS) was developed. The technique employs an ion source called electrospray ionization (ESI) and operates in negative ion mode. The mass-to-charge ratios (m/z) used are 179 for fructose and glucose, and 341 for sucrose. The separation conditions involve an AQS NH2 column with a size of 4.6 mm. The system uses a fixed proportion separation with a ratio of 25:75 and a flow rate of 0.5 mL/min. The total analysis time is 20 minutes, with linearity in the range of 1-50 µg/mL. This developed method can be applied to analyze the amounts of fructose, glucose, and sucrose in honey. Ten honey samples were analyzed. The results showed that fructose content ranged from 31.22 to 40.53 percent, glucose from 28.69 to 32.83 percent, and the combined fructose and glucose content ranged from 61.30 to 70.04 percent. sucrose content ranged from 1.93 to 4.58 percent. All 10 samples met the standard criteria.

**Keywords :** fructose, glucose, sucrose, liquid chromatography-mass spectrometry

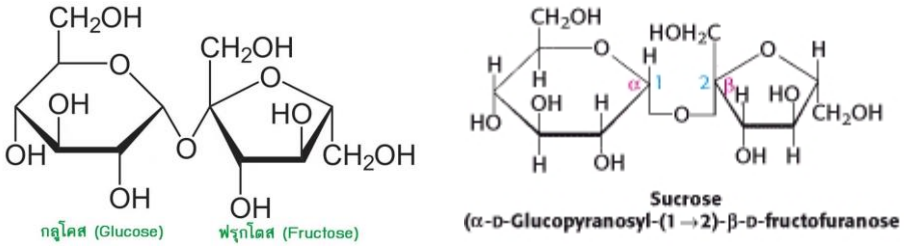
Veterinary Public Health Laboratory, Bureau of Ouality Control of Livestock Products, Department of Livestock Development, Tivanont Road, Bangkadi Subdistrict, Muang District, Pathum Thani Province, 12000; Tel. 0 2967 9727

# การพัฒนาวิธีการตรวจหาปริมาณน้ำตาลกลูโคส ฟรุกโตส และซูโครส ในน้ำผึ้งด้วยเทคนิค LC-MS

## บทนำ

น้ำผึ้ง คือ เป็นน้ำหวานที่ผึ้งงานดูดจากเกสรดอกไม้ชนิดต่างๆ แล้วนำมาเก็บรวบรวมไว้ในรังผึ้ง โดยน้ำผึ้งจะเป็นของเหลวใส มีลักษณะข้นหนืดและมีรสหวาน สีของน้ำผึ้งมีลักษณะไม่มีสีจนกระทั่งมีสีเข้มเกือบดำขึ้นอยู่กับชนิดของดอกไม้ โดยน้ำผึ้งเป็นของเหลวที่อิ่มตัวสูงด้วยน้ำตาล ประกอบด้วยฟรุกโตส 38.5%, กลูโคส 31.0%, น้ำ 17.1%, มอลโตส 7.2%, น้ำตาลโมเลกุลสามและคาร์โบไฮเดรตชนิดอื่นๆ 4.2%, น้ำตาลกลูโคส 1.5% และแร่ธาตุ วิตามิน และเอนไซม์ 0.5% (มหาวิทยาลัยเชียงใหม่, ม.ป.ป.)

น้ำตาล เป็นชื่อเรียกทั่วไปของคาร์โบไฮเดรตชนิดละลายน้ำ โซ่สั้น และมีรสหวาน ส่วนใหญ่ใช้ประกอบอาหาร โดยน้ำตาลเป็นคาร์โบไฮเดรตที่ประกอบด้วยธาตุคาร์บอน ไฮโดรเจน และออกซิเจน คาร์โบไฮเดรตสามารถแบ่งออกได้ 3 ประเภท ดังนี้ มอโนแซ็กคาไรด์ (monosaccharide) ไดแซ็กคาไรด์ (disaccharide) และพอลิแซ็คคาไรด์ (polysaccharide) โดยมอโนแซ็กคาไรด์เป็นหน่วยเล็กที่สุดของคาร์โบไฮเดรตมีจำนวนคาร์บอนตั้งแต่ 3-9 อะตอม มีสูตรทั่วไปคือ $(CH_2O)_n$ โครงสร้างโมเลกุลแบ่งตามหมู่ฟังชันก์ได้ 2 กลุ่ม คือ กลุ่มน้ำตาลที่มีหมู่ฟังชันก์เป็นแอลดีไฮด์ มีโครงสร้างเป็นพอลิไฮดรอกซีแอลดีไฮด์ (polyhydroxy aldehyde) เรียกว่าน้ำตาลกลุ่มนี้ว่า น้ำตาลอัลโดส (aldose) และ กลุ่มน้ำตาลที่มีหมู่ฟังชันก์เป็นคีโตนมีโครงสร้างเป็นพอลิไฮดรอกซีคีโตน (polyhydroxy ketone) ซึ่งเรียกน้ำตาลกลุ่มนี้ว่าน้ำตาลคีโตส (ketose) โดยมอนอแซ็กคาไรด์แบ่งออกเป็นน้ำตาลหลายชนิด ตัวอย่างเช่น น้ำตาลกลูโคส (glucose) ที่มีคาร์บอน 6 อะตอมชนิดแอลโดส ลักษณะเป็นของแข็งสีขาวและมีจุดหลอมเหลวที่ 146 องศาเซลเซียส และน้ำตาลฟรุกโตส (fructose) มีคาร์บอน 6 อะตอมชนิดคีโทเฮกโซส ลักษณะเป็นของแข็งสีขาวและมีจุดหลอมเหลวที่ 102 องศาเซลเซียส ซึ่งน้ำตาลกลูโคสและฟรุกโตสพบมากในผลองุ่นสุก น้ำผึ้ง และผลไม้ที่มีรสหวาน ส่วนน้ำตาลไดแซ็กคาไรด์ (disaccharide) เช่นน้ำตาลซูโครสเป็นน้ำตาลโมเลกุลคู่ ซึ่งประกอบด้วยน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยว 2 ชนิด ได้แก่ น้ำตาลฟรุกโตสและน้ำตาลกลูโคส เชื่อมต่อกันด้วยพันธะไกลโคไซด์มีสูตรโมเลกุลคือ $C_{12}H_{22}O_{11}$ น้ำตาลซูโครสโดยไม่มีหมู่ฟังชันเหลืออยู่ในโมเลกุล (พิมพ์เพ็ญ และนิธิยา, ม.ป.ป.)




**ภาพที่ 1** โครงสร้างทางเคมีของน้ำตาลกลูโคส ฟรุกโตส และซูโครส
**ที่มา :** พิมพ์เพ็ญ และนิธิยา (ม.ป.ป.)

ปริมาณน้ำตาลแต่ละชนิดจึงมีความสำคัญต่อน้ำผึ้ง เนื่องจากเป็นค่าที่บ่งชี้ได้ว่าน้ำผึ้งที่ได้มามีการผสมซูโครสลงไปหรือในกระบวนการเลี้ยงผึ้งมีการปนเปื้อนหรือตกหล่นของน้ำตาลซูโครสลงไปในรังผึ้ง โดยค่าน้ำตาลกลูโครสรวมกับน้ำตาลฟรุกโตสไม่น้อยกว่าร้อยละ 60 ของน้ำหนัก ส่วนน้ำตาลซูโครสไม่เกินร้อยละ 5 ของน้ำหนัก หากค่าของน้ำตาลไม่เป็นไปตามมาตรฐานสินค้าเกษตร มกษ. 8003-2556 อาจเข้าเกณฑ์น้ำผึ้งผสมหรือเครื่องดื่มผสมน้ำผึ้งไม่ใช่น้ำผึ้งแท้และมีการจำหน่ายในราคาของน้ำผึ้งแท้ซึ่งมีราคาแพงกว่าเครื่องดื่มทั่วไป ดังนั้น การพัฒนาวิธีการตรวจหาปริมาณน้ำตาลในน้ำผึ้งด้วยเทคนิค LC-MS จึงมีความสำคัญอย่างยิ่ง เพื่อควบคุมคุณภาพของน้ำผึ้งให้เป็นไปตามเกณฑ์มาตรฐาน

**1. วัตถุประสงค์**

เพื่อหาสภาวะที่เหมาะสมและประสิทธิภาพของวิธีการวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลฟรุกโตส กลูโคส และซูโครสในน้ำผึ้งด้วยเทคนิค LC-MS และนำวิธีที่พัฒนาได้มาใช้ในการวิเคราะห์หาปริมาณน้ำตาลทั้ง 3 ชนิดเพื่อควบคุมคุณภาพน้ำผึ้งที่มีขายอยู่ในท้องตลาดและที่ส่งออกไปยังต่างประเทศตามมาตรฐานสินค้าเกษตร มกษ. 8003-2556

**2. ขอบข่าย**

พัฒนาวิธีวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลฟรุกโตส กลูโคส และซูโครส ในน้ำผึ้งด้วยเทคนิคลิควิดโครมาโทกราฟี-แมสสเปกโทรเมตรี (LC-MS)

**3. ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ**

3.1 ได้วิธีวิเคราะห์ที่เหมาะสมในการหาปริมาณน้ำตาลฟรุกโตส กลูโคส และซูโครส ในน้ำผึ้งเชิงคุณภาพและปริมาณอย่างมีประสิทธิภาพถูกต้องและแม่นยำ

3.2 เพิ่มขีดความสามารถในการตรวจวิเคราะห์น้ำตาลฟรุกโตส กลูโคส และซูโครส ในตัวอย่างน้ำผึ้ง เพื่อควบคุมคุณภาพน้ำผึ้งให้ได้มาตรฐาน

3.3 ได้เทคนิคในการตรวจวัดไปประยุกต์ใช้ในการตรวจการหาปริมาณน้ำตาลฟรุกโตส กลูโคส และซูโครสในตัวอย่างชนิดอื่นๆ ได้

**4. อุปกรณ์สารเคมีและสารมาตรฐาน**

4.1 อุปกรณ์และเครื่องมือ

4.1.1 เครื่อง LC-MS/MS (triple quadrupole) ยี่ห้อ Thermo Scientific รุ่น TSQ Endura

4.1.2 เครื่องชั่งความละเอียด 0.00001 กรัม สำหรับชั่งสารมาตรฐาน

4.1.3 เครื่องชั่งความละเอียด 0.001 กรัม สำหรับชั่งตัวอย่าง

4.1.4 เครื่อง ultrasonic bath

4.1.5 เครื่องผสมสาร (vortex mixer)

4.1.6 ไมโครปิเปตขนาด 5-20, 10-100, 100-1,000 และ 500- 5,000 ไมโครลิตร

4.1.7 HPLC คอลัมน์ AQS $NH_2$ ขนาด 4.6 X 150 มิลลิเมตร 5 ไมโครเมตร

4.2 สารเคมี

4.2.1 อะซีโตไนไตรล์ (acetonitrile) HPLC grade

4.2.2 น้ำขจัดไอออน (deionized, DI)

4.3 สารมาตรฐาน

4.3.1 สารมาตรฐานฟรุกโตส (fructose) ยี่ห้อ Sigma-Aldrich Lot no. LRAD5926

4.3.2 สารมาตรฐานกลูโคส (glucose) ยี่ห้อ Sigma-Aldrich Lot no. 0000306534

4.3.2 สารมาตรฐานซูโครส (sucrose) ความเข้มข้น 100 กรัมต่อลิตร ยี่ห้อ CPA chem Lot no. 982833

4.4 การเตรียมสารละลายมาตรฐาน

4.4.1 การเตรียมสารละลายมาตรฐานฟรุกโตสและกลูโคส

ชั่งสารมาตรฐานฟรุกโตสและกลูโคสอย่างละ 10 มิลลิกรัมละลายและปรับปริมาตรด้วยน้ำขจัดไอออนเป็น 100 มิลลิลิตร ในขวดปริมาตรขนาด 100 มิลลิลิตร โดยสารละลายฟรุกโตสและกลูโคสที่ได้จะมีความเข้มข้นประมาณ 1,000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

4.4.2 การเตรียมสารละลายมาตรฐานซูโครส

ดูดสารละลายมาตรฐานซูโครสความเข้มข้น 100 กรัมต่อลิตร ปริมาตร 1 มิลลิลิตรละลายแล้วปรับปริมาตรด้วยน้ำขจัดไอออนเป็น 100 มิลลิลิตร ในขวดปริมาตรขนาด 100 มิลลิลิตร โดยสารละลายมาตรฐานซูโครสที่ได้จะมีความเข้มข้นประมาณ 1,000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

4.4.3 การเตรียมสารละลายมาตรฐานผสม

ดูดสารละลายมาตรฐานฟรุกโตส กลูโคส และซูโครสปริมาตรอย่างละ 1 มิลลิลิตรรวมกัน ละลายแล้วปรับปริมาตรด้วยน้ำขจัดไอออนเป็น 100 มิลลิลิตร ในขวดปริมาตรขนาด 100 มิลลิลิตร สารละลายมาตรฐานผสมฟรุกโตส กลูโคส และซูโครสที่ได้จะมีความเข้มข้นประมาณ 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรจากนั้นเจือจางให้มีความเข้มข้นระดับต่าง ๆ ด้วยน้ำขจัดไอออน กรองด้วยแผ่นกรองไนลอนขนาด 0.2 ไมครอน

4.5 การเตรียมตัวอย่างน้ำผึ้ง

5.4.1 การเตรียมตัวอย่างน้ำผึ้ง

5.4.1.1 ชั่งตัวอย่างน้ำผึ้ง 1 กรัม ละลายในน้ำขจัดไอออนและปรับปริมาตรเป็น 100 มิลลิลิตรในขวดปริมาตรขนาด 100 มิลลิลิตร นำไป ultrasonic ด้วยเครื่อง ultrasonic bath นาน 5 นาที

5.4.1.2 ดูดสารละลายตัวอย่างจากข้อ 5.4.1.1 ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ละลายในน้ำขจัดไอออนและปรับปริมาตรเป็น 100 มิลลิลิตรในขวดปริมาตรขนาด 100 มิลลิลิตร นำไป ultrasonic ด้วยเครื่อง ultrasonic bath นาน 5 นาที จากนั้นกรองสารละลายผ่านแผ่นกรองไนลอนขนาด 0.2 ไมครอน

5.4.2 การคำนวณปริมาณน้ำตาลแต่ละชนิด

5.4.2.1 ปริมาณน้ำตาลแต่ละชนิดที่คำนวณได้จากกราฟมาตรฐาน

= ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร X สัมประสิทธิ์การเจือจาง (10,000)

= ไมโครกรัมต่อ 1 กรัม

5.4.2.2 เปลี่ยนความเข้มข้นให้เป็น กรัมต่อ 1 กรัม

= ไมโครกรัมต่อ 1 กรัม/1,000,000

5.4.2.3 เปลี่ยนปริมาณน้ำตาลแต่ละชนิดเป็นเปอร์เซ็นต์ (กรัมต่อ 100 กรัม)

= ปริมาณน้ำตาลแต่ละชนิด กรัมต่อ 1 กรัมx100

1

**5. วิธีดำเนินการ**

5.1 การหาสภาวะที่เหมาะสมสำหรับการวิเคราะห์ด้วยเครื่อง LC-MS

โดยใช้เครื่อง LC-MS/MS (triple quadrupole) ใช้โหมด SIMQ1 ตั้งค่า polarity แบบ negative กำหนดค่า m/z ดังนี้ m/z ของฟรุกโตสและกลูโคสเท่ากับ 179 และ m/z ของซูโครสเท่ากับ 341 สภาวะของเครื่อง LC ใช้คอลัมน์ AQS $NH_2$ ขนาด 4.6 X 150 มิลลิเมตร 5 ไมโครเมตร อุณหภูมิของคอลัมน์เท่ากับ 30 องศาเซลเซียส มีเฟสเคลื่อนที่ (mobile phase) ที่เป็นสารละลาย 2 ชนิด ประกอบด้วยน้ำและอะซีโตไนไตรล์อัตราส่วน 25 ต่อ 75 โดยมีระบบการแยกชนิดสัดส่วนแบบคงที่อัตราการไหล (flow rate) 0.5 มิลลิลิตรต่อนาที และเวลาที่ใช้ในการวิเคราะห์ทั้งหมด 20 นาที

5.2 การทดสอบค่า instrument detection limit (IDL)

ตรวจวัดสารละลายมาตรฐานผสมฟรุกโตส กลูโคส และซูโครสที่ความเข้มข้น 1 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร จำนวน 3 ซ้ำ ฉีดเข้าเครื่องด้วยเทคนิค LC-MS ตรวจสอบค่าสัญญาณของสารที่ต้องการวิเคราะห์เทียบกับสัญญาณรบกวน (signal to noise ratio, S/N) กำหนดเกณฑ์ยอมรับค่าของ S/N ต้องมีค่ามากกว่าหรือเท่ากับ 3

5.3 การทดสอบความเป็นเส้นตรงของสารมาตรฐาน (linearity)

ตรวจวัดสารละลายมาตรฐานผสมฟรุกโตส กลูโคส และซูโครส จำนวน 7 ระดับความเข้มข้น ได้แก่ 1, 5 10, 20, 30, 40 และ 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ด้วยเทคนิค LC-MS สร้างกราฟมาตรฐานระหว่างความเข้มข้นของสารมาตรฐาน (แกน x) กับ peak area ของสารมาตรฐาน (แกน y) และคำนวณหาค่าสัมประสิทธิ์การตัดสินใจ (coefficient of determination, $R^2$)

5.4 การวิเคราะห์หา ฟรุกโตส กลูโคส และซูโครส ในตัวอย่างน้ำผึ้ง

ใช้ตัวอย่างน้ำผึ้งจำนวน 10 ตัวอย่าง มาผ่านการเตรียมตัวอย่าง จากนั้นฉีดเข้าเครื่องด้วยเทคนิค LC-MS ภายใต้สภาวะที่เหมาะสม โดยทำตัวอย่างละ 1 ซ้ำ นำค่าที่ได้ไปเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐานเพื่อหาความเข้มข้นของ ฟรุกโตส กลูโคส และซูโครส ที่มีในตัวอย่างน้ำผึ้ง และคำนวณหาปริมาณ ฟรุกโตส กลูโคส และซูโครส เป็นเปอร์เซ็นต์ (กรัมต่อ 100 กรัม)

**6. ผลการทดสอบ**

6.1 การหาสภาวะที่เหมาะสมสำหรับการวิเคราะห์ด้วยเทคนิค LC-MS

**ตารางที่ 1** สภาวะที่เหมาะสมของเครื่อง LC

| พารามิเตอร์ | สภาวะการทดสอบ |
|---|---|
| คอลัมน์ | AQS $NH_2$ ขนาด 4.6 X 150 มิลลิเมตร 5 ไมโครเมตร |
| เฟสเคลื่อนที่ | น้ำและอะซิโตไนไตรล์อัตราส่วน 25 ต่อ 75 |
| อัตราการไหล | 0.5 มิลลิลิตรต่อนาที |
| อุณหภูมิของคอลัมน์ | 30 องศาเซลเซียส |
| ปริมาณสารที่ฉีด | 10 ไมโครลิตร |
| เวลาที่ใช้ในการวิเคราะห์ | 20 นาที |

**ตารางที่ 2** การปรับตั้งสภาวะของเครื่อง MS

| พารามิเตอร์ | สภาวะการทดสอบ |
|---|---|
| Ion source | ESI- |
| Spray Voltage | Static |
| Negative Ion (V) | 3000 |
| Sheath gas (Arb) | 40 |
| Aux Gas (Arb) | 10 |
| Sweep Gas (Arb) | 0 |
| Ion transfer tube temperature | 300 องศาเซลเซียส |
| Vaporizer temperature | 150 องศาเซลเซียส |

**ตารางที่ 3** ค่า mass transition ฟรุกโตส กลูโคส และซูโครส ที่ตรวจวิเคราะห์ด้วยเทคนิค LC-MS

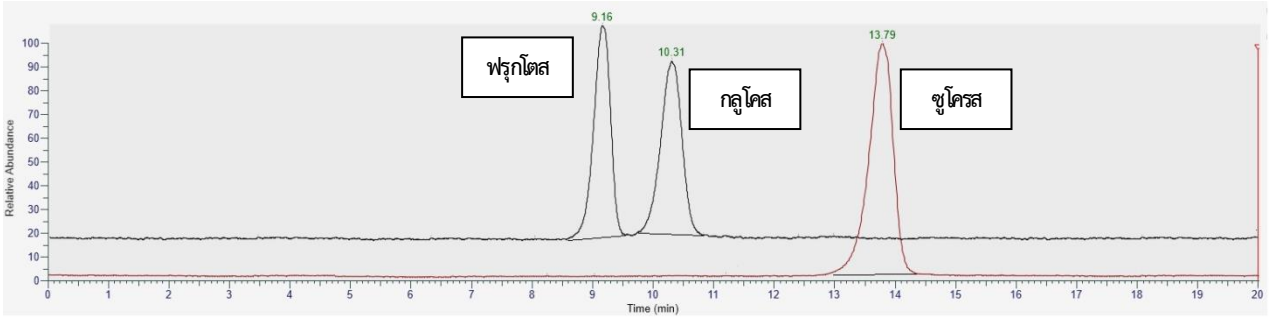
| **สาร** | **MW** | **m/z** | **RF Lens (V)** |
|---|---|---|---|
| ฟรุกโตส | 180 | 179 $[M-H]^-$ | 50 |
| กลูโคส | 180 | 179 $[M-H]^-$ | 50 |
| ซูโครส | 342 | 341 $[M-H]^-$ | 50 |

6.2 การทดสอบค่า instrument detection limit (IDL)

ค่า signal to noise ratio (S/N) ของสารละลายมาตรฐานผสมฟรุกโตส กลูโคส และซูโครส ที่ความเข้มข้น 1 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร มีค่ามากกว่าเกณฑ์ที่กำหนด คือมีค่ามากกว่าหรือเท่ากับ 3 (ตารางที่ 4) ความเข้มข้นดังกล่าวจึงสามารถนำมาใช้เป็นค่าต่ำสุด สำหรับการวิเคราะห์ฟรุกโตส กลูโคส และซูโครส ด้วยเทคนิค LC-MS

**ตารางที่ 4** ค่า signal to noise (S/N) ของสารละลายมาตรฐานผสมฟรุกโตส กลูโคส และซูโครส ที่ความเข้มข้น 1 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

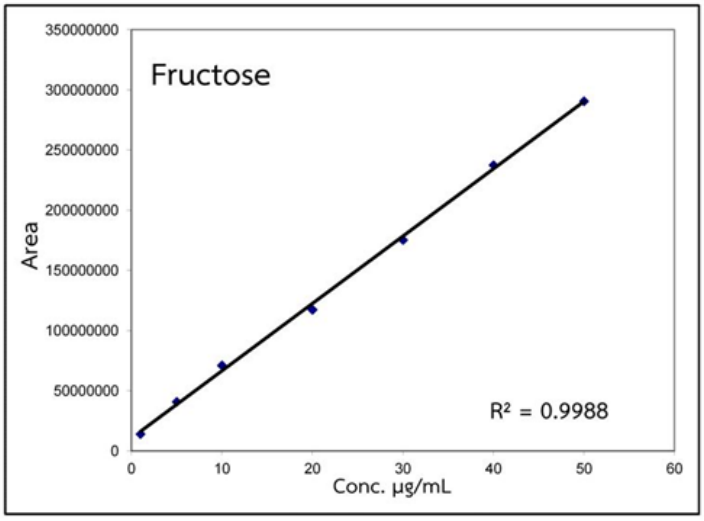
| สาร | signal to noise (S/N) | | | |
|---|---|---|---|---|
| | ซ้ำที่ 1 | ซ้ำที่ 2 | ซ้ำที่ 3 | ค่าเฉลี่ย |
| ฟรุกโตส | 510.7394 | 349.2481 | 355.0157 | 405.0011 |
| กลูโคส | 114.447 | 88.48078 | 77.00018 | 93.30932 |
| ซูโครส | 1587.219 | 1344.105 | 1247.229 | 1392.851 |



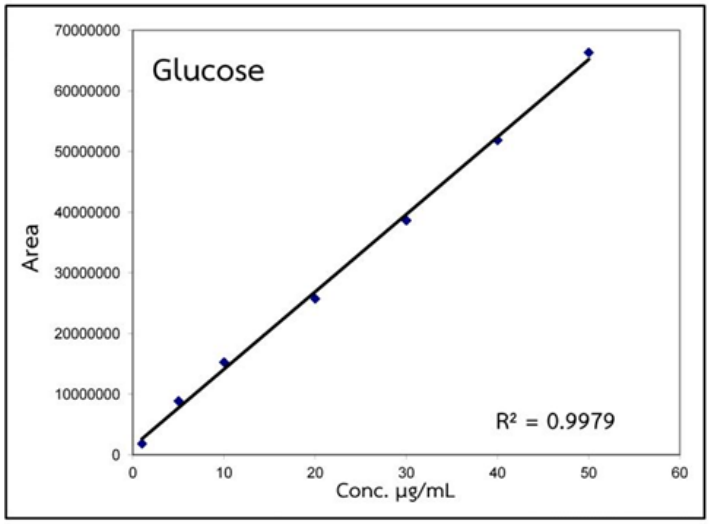

**ภาพที่ 2** โครมาโทแกรมสารมาตรฐานผสมฟรุกโตส กลูโคส และซูโครส เข้มข้น 1 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

6.3 ความเป็นเส้นตรงของกราฟมาตรฐาน (Linearity)

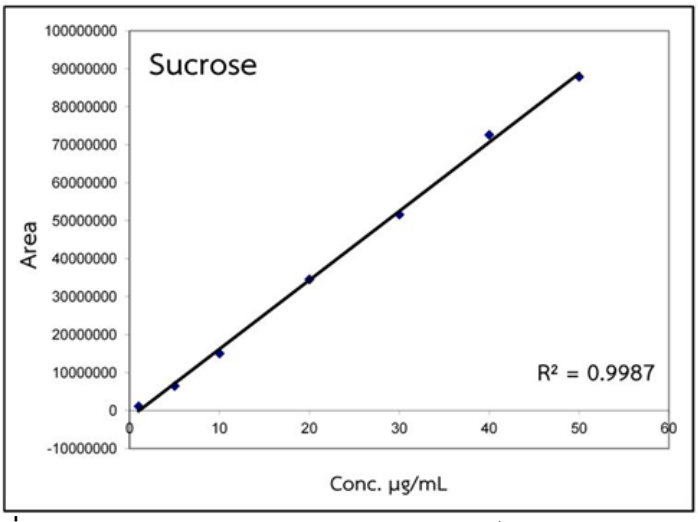
การทดสอบความเป็นเส้นตรงของกราฟมาตรฐานของสารละลายมาตรฐานผสมฟรุกโตส กลูโคส และซูโครส ได้ค่า $R^2$ เท่ากับ 0.9988, 0.9979 และ 0.9987 ตามลำดับ ซึ่งมีค่ามากกว่าหรือเท่ากับ 0.990 ดังนั้น สารละลายมาตรฐานผสมฟรุกโตส กลูโคส และซูโครส ที่ทดสอบด้วยเทคนิค LC-MS มีความเป็นเส้นตรงอยู่ในช่วง 1–50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร (ภาพที่ 3 -5)




**ภาพที่ 3** กราฟมาตรฐานฟรุกโตส ความเข้มข้น 1-50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร




**ภาพที่ 4** กราฟมาตรฐานกลูโคสความเข้มข้น 1-50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร



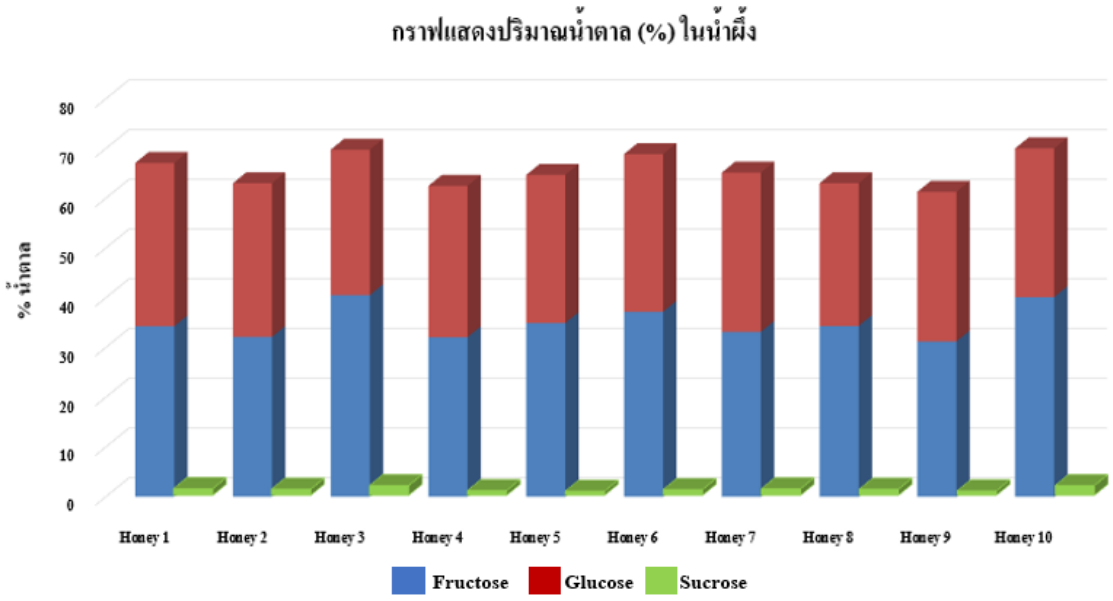

**ภาพที่ 5** กราฟมาตรฐานซูโคสความเข้มข้น 1-50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

6.4 การวิเคราะห์หา ฟรุกโตส กลูโคส และซูโครส ในตัวอย่างน้ำผึ้ง

จากการหาปริมาณของน้ำตาลฟรุกโตส กลูโคส และซูโครสในตัวอย่างน้ำผึ้งทั้งหมดจำนวน 10 ตัวอย่าง พบว่า ปริมาณฟรุกโตสอยู่ในช่วง 31.22-40.53 เปอร์เซ็นต์ กลูโคสอยู่ในช่วง 28.69-32.83 เปอร์เซ็นต์ ฟรุกโตสและกลูโคสรวมกันอยู่ในช่วง 61.30-70.04 และซูโครสอยู่ในช่วง 1.93-4.58 เปอร์เซ็นต์ (ตารางที่ 5) ซึ่งตัวอย่างทั้ง 10 ตัวอย่างเป็นไปตามเกณฑ์มาตรฐานของมาตรฐานสินค้าเกษตร มกษ. 8003-2556

**ตารางที่ 5** ผลวิเคราะห์เปอร์เซ็นต์ฟรุกโตส กลูโคส และซูโครส ในตัวอย่างน้ำผึ้ง จำนวน 10 ตัวอย่าง ด้วยเทคนิค LC-MS

| ตัวอย่างน้ำผึ้ง | ฟรุกโตส | | กลูโคส | | ซูโครส | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | ความเข้มข้น (มิลลิกรัมต่อกรัม) | เปอร์เซ็นต์ | ความเข้มข้น (มิลลิกรัมต่อกรัม) | เปอร์เซ็นต์ | ความเข้มข้น (มิลลิกรัมต่อกรัม) | เปอร์เซ็นต์ |
| 1 | 342.7 | 34.27 | 328.3 | 32.83 | 31.2 | 3.12 |
| 2 | 321.3 | 32.13 | 309.1 | 30.91 | 28.6 | 2.86 |
| 3 | 405.3 | 40.53 | 292.4 | 29.24 | 45.5 | 4.55 |
| 4 | 320.8 | 32.08 | 304.3 | 30.43 | 22 | 2.20 |
| 5 | 349.2 | 34.92 | 297.9 | 29.79 | 19.3 | 1.93 |
| 6 | 371.9 | 37.19 | 317 | 31.7 | 27 | 2.7 |
| 7 | 331.4 | 33.14 | 320.3 | 32.03 | 30.3 | 3.03 |
| 8 | 343.4 | 34.34 | 286.9 | 28.69 | 28.5 | 2.85 |
| 9 | 312.2 | 31.22 | 300.8 | 30.08 | 20.7 | 2.07 |
| 10 | 401.3 | 40.13 | 299.1 | 29.91 | 45.8 | 4.58 |




**ภาพที่ 6** ปริมาณน้ำตาล (%) ในน้ำผึ้ง

**7. สรุปผลการทดลอง**

สภาวะที่เหมาะสมและและประสิทธิภาพของวิธีการวิเคราะห์สำหรับใช้ในการวิเคราะห์หาปริมาณน้ำตาลฟรุกโตส กลูโคส และซูโครสด้วยเทคนิค LC-MS กำหนด m/z ดังนี้ m/z ของฟรุกโตสและกลูโคสเท่ากับ 179 และ m/z ของซูโครสเท่ากับ 341 สภาวะเครื่อง LC ใช้คอลัมน์ AQS $NH_2$ ขนาด 4.6 X 150 มิลลิเมตร 5 ไมโครเมตร อุณหภูมิของคอลัมน์เท่ากับ 30 องศาเซลเซียส มีเฟสเคลื่อนที่ (mobile phase) ที่เป็นสารละลาย 2 ชนิด ประกอบด้วยน้ำและอะซีโตไนไตรล์อัตราส่วน 25 ต่อ 75 โดยมีระบบการแยกชนิดสัดส่วนแบบคงที่อัตราการไหล (flow rate) 0.5 มิลลิลิตรต่อนาที และเวลาที่ใช้ในการวิเคราะห์ทั้งหมด 20 นาที สำหรับประสิทธิภาพของวิธีวิเคราะห์ พบว่ากราฟมาตรฐานของ ฟรุกโตสมีค่าความเป็นเส้นตรงอยู่ในช่วง 1-50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรและค่าสัมประสิทธิ์การตัดสินใจ ($R^2$) เท่ากับ 0.9988 กราฟมาตรฐานของกลูโคสมีค่าความเป็นเส้นตรงอยู่ในช่วง 1-50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรและค่าสัมประสิทธิ์การตัดสินใจ ($R^2$) เท่ากับ 0.9979 กราฟมาตรฐานของฟรุกโตสมีค่าความเป็นเส้นตรงอยู่ในช่วง 1-50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรและค่าสัมประสิทธิ์การตัดสินใจ ($R^2$) เท่ากับ 0.9987 จากการหาปริมาณของน้ำตาลฟรุกโตส กลูโคส และซูโครสในตัวอย่างน้ำผึ้งทั้งหมดจำนวน 10 ตัวอย่าง พบว่า ปริมาณฟรุกโตสอยู่ในช่วง 31.22-40.53 เปอร์เซ็นต์ กลูโคสอยู่ในช่วง 28.69-32.83 เปอร์เซ็นต์ ฟรุกโตสและกลูโคสรวมกันอยู่ในช่วง 61.30-70.04 และซูโครสอยู่ในช่วง 1.93-4.58 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งตัวอย่างทั้ง 10 ตัวอย่างเป็นไปตามเกณฑ์มาตรฐานของมาตรฐานสินค้าเกษตร มกษ. 8003-2556 ดังนั้นจึงเหมาะสมในการนำมาประยุกต์ใช้ในการวิเคราะห์หาปริมาณน้ำตาล ฟรุกโตส กลูโคส และซูโครสในตัวอย่างน้ำผึ้ง เพื่อเป็นแนวทางในการเพื่อควบคุมคุณภาพน้ำผึ้งที่มีขายอยู่ในท้องตลาดและที่ส่งออกไปยังต่างประเทศต่อไป

**8. ข้อเสนอแนะ**

8.1 การพัฒนาวิธีการตรวจหาปริมาณน้ำตาลกลูโคส ฟรุกโตส และซูโครสในน้ำผึ้งด้วยเทคนิค LC-MS นี้ ควรมีการตรวจสอบความใช้ได้ของวิธี (method validation) เพื่อพิสูจน์ว่าสามารถตรวจวัดปริมาณน้ำตาลแต่ละชนิดในระดับใดได้

8.2 วิธีการตรวจหาปริมาณน้ำตาลกลูโคส ฟรุกโตส และซูโครสในน้ำผึ้งด้วยเทคนิค LC-MS นี้ เป็นวิธีที่มี sensitivity สูงตรวจวัดได้ในระดับ ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร (PPM) แต่การตรวจวัดหาปริมาณน้ำตาลในน้ำผึ้งในปัจจุบัน ตรวจหาปริมาณเป็นเปอร์เซ็นต์ (กรัมต่อ 100 กรัม) ซึ่งการใช้เทคนิค LC-MS นั้น ทำให้ ion source ของเครื่องสกปรกจึงต้องทำการเจือจางตัวอย่างเพื่อป้องกันคราบเกาะติด ion source ถ้าหากใช้เทคนิค HPLC-refractive index detector (RI) จึงมีความเหมาะสมมากกว่า

**9. กิตติกรรมประกาศ**

ขอขอบคุณนายอุดม เจือจันทร์ ผู้อำนวยการสำนักตรวจสอบคุณภาพสินค้าปศุสัตว์ นายสัตวแพทย์พิเชษฐ์ กุมภาว์ หัวหน้ากลุ่มตรวจสอบคุณภาพเนื้อสัตว์และผลผลิตจากสัตว์ ที่สนับสนุนการศึกษาในครั้งนี้ รวมทั้งเจ้าหน้าที่งานเคมีอาหาร สารตกค้างและสารปนเปื้อน กลุ่มตรวจสอบคุณภาพเนื้อสัตว์และผลผลิตจากสัตว์ สำนักตรวจสอบคุณภาพสินค้าปศุสัตว์ที่ช่วยในการศึกษาในครั้งนี้สำเร็จลุล่วงไปด้วยดี

**10. เอกสารอ้างอิง**

พิมพ์เพ็ญ พรเฉลิมพงศ์ และนิธิยา รัตนาปนนท์. ม.ป.ป. น้ำตาล. แหล่งที่มา : https://www.foodnetworksolution.com/wiki/word/1679/sugar, 22 สิงหาคม 2567.

สำนักงานมาตรฐานสินค้าเกษตรและอาหารแห่งชาติ. 2556. มาตรฐานสินค้าเกษตร มกษ. 8003-2556. กระทรวงเกษตรและสหกรณ์, กรุงเทพมหานคร.

Kenneth, J. Fountain., Christopher, J., Hudalla, Douglas, R., McCabe and Morrison D. 2009. Analysis of carbohydrates by ultraperformance liquid chromatography and mass spectrometry. Water Application Note: 720003212.

Salmana, M., Abdel-Hameed, E.S., Bazaid, S.A., and Al-Shamrani, M.G., and Mohamed, H.F. 2014. Liquid chromatography-mass spectrometry (LC-MS) method for the determination of sugars in fresh pomegranate fruit juices. Der Pharma Chemica: 6(5):320-333.

Wilhad, M. 2015. Analysis of Sugars in Honey Using the PerkinElmer Altus HPLC System with RI Detection. PerkinElmer Application Note: 012101_01.