BSJ
BURAPHA SCIENCE JOURNAL
ISSN 2985-0983 (online)

วารสารวิทยาศาสตร์บูรพา ปีที่ 30 (ฉบับที่ 2) พฤษภาคม – สิงหาคม พ.ศ. 2568

BURAPHA SCIENCE JOURNAL Volume 30 (No.2) May – August 2025 บทความวิจัย

การวิเคราะห์ฟอสโฟลิปิดที่เป็นองค์ประกอบในเลซิตินจากถั่วเหลือง ด้วยเทคนิคฟอสฟอรัสนิวเคลียร์แมกเนติกเรโซแนนซ์สเปกโตรสโคปี

Determination of Phospholipid in Lecithin from Soybean Using Phosphorous Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy

อุทัยวรรณ ศิริอ่อน[1], ธนิดา ตระกูลสุจริตโชค[1], ชาติชาย มาลาพงษ์[2] และ สรายุทธ เวชสิทธิ์[3*]

Uthaiwan Sirion[1], Thanida Trakulsujaritchok[1], Chartchai Malaphong[2] and Sarayut Watchasit[3*]

[1]*ศูนย์ความเป็นเลิศด้านนวัตกรรมทางเคมี ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา ประเทศไทย*

[2]*หน่วยบริการนวัตกรรมทางวิทยาศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา ประเทศไทย*

[3]*ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา ประเทศไทย*

[1]*Department of Chemistry and Center for Innovation in Chemistry, Faculty of Science, Burapha University, Thailand*

[2]*Science Innovation Facility, Faculty of Science, Burapha University, Thailand*

[3]*Department of Chemistry, Faculty of Science, Burapha University, Thailand*

Received : 11 June 2025, Received in revised form : 7 July 2025, Accepted : 13 July 2025

Available online : 22 July 2025

บทคัดย่อ

วัตถุประสงค์และที่มา : เลซิตินจากถั่วเหลืองนิยมใช้ทั้งในผลิตภัณฑ์เสริมอาหาร และเป็นส่วนผสมในอาหาร ยา เครื่องสำอาง และอาหารสัตว์ โดยเลซิตินประกอบด้วยสารสำคัญหลายชนิด เช่น phosphatidylcholine (PC), phosphatidylethanolamine (PE), phosphatidylinositol (PI), phosphatidic acid (PA) และ phosphatidylserine (PS) ซึ่งมีบทบาทสำคัญต่อการเจริญเติบโตของเซลล์ การขนส่งไขมัน และการสังเคราะห์สารสื่อประสาท เช่น อะเซทิลโคลีน แม้เลซิตินจะมีประโยชน์หลากหลาย แต่การบริโภคในปริมาณมากเกินไปอาจก่อให้เกิดผลข้างเคียง เช่น คลื่นไส้ อาเจียน เบื่ออาหาร หรือเหงื่อออกมาก ดังนั้นจึงมีความจำเป็นในการควบคุมคุณภาพด้วยการวิเคราะห์ชนิดและปริมาณของฟอสโฟลิปิดในผลิตภัณฑ์เลซิตินอย่างถูกต้องและแม่นยำ เทคนิคที่นิยมใช้ในปัจจุบันในการวิเคราะห์ฟอสโฟลิปิด ได้แก่ โครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง (HPLC) และอินฟราเรดสเปกโทรสโคปี (FT-IR) ซึ่งสามารถวิเคราะห์ได้ทั้งเชิงคุณภาพและเชิงปริมาณ อย่างไรก็ตาม เทคนิคดังกล่าวมีข้อจำกัด เช่น การพึ่งพาสารมาตรฐานอ้างอิงตามชนิดของสารที่ต้องการวิเคราะห์ อาศัยวัฏภาคคงที่และเคลื่อนที่ที่เฉพาะเจาะจง ใช้เวลาในการวิเคราะห์นาน และก่อให้เกิดของเสียจำนวนมาก ด้วยเหตุนี้งานวิจัยนี้จึงมีความสนใจในการประยุกต์ใช้เทคนิคฟอสฟอรัสนิวเคลียร์แมกเนติกเรโซแนนซ์สเปกโทรสโคปี (^{31}P-NMR) ในการวิเคราะห์ฟอสโฟลิปิด โดยเทคนิคนี้สามารถตรวจวัดฟอสโฟลิปิดหลายชนิดได้พร้อมกันในการวิเคราะห์ครั้งเดียว มีความจำเพาะสูงจากลักษณะเฉพาะของสัญญาณ ^{31}P ที่แตกต่างกันในแต่ละฟอสโฟลิปิด ดังนั้นการพัฒนาและประยุกต์ใช้เทคนิค ^{31}P-NMR ในการ

BSJ
BURAPHA SCIENCE JOURNAL
ISSN 2985-0983 (online)
วารสารวิทยาศาสตร์บูรพา ปีที่ 30 (ฉบับที่ 2) พฤษภาคม – สิงหาคม พ.ศ. 2568
BURAPHA SCIENCE JOURNAL Volume 30 (No.2) May – August 2025 บทความวิจัย

ตรวจวัดชนิดและปริมาณฟอสโฟลิปิดในเลซิตินจึงเป็นทางเลือกที่มีศักยภาพสูง เพื่อลดข้อจำกัดของวิธีดั้งเดิม และเพื่อประโยชน์ต่อผู้บริโภคในด้านความปลอดภัยและคุณภาพของผลิตภัณฑ์

วิธีดำเนินการวิจัย : ในงานวิจัยนี้มีการเตรียมสารละลายสำหรับใช้ในการสกัดฟอสโฟลิปิดจากเลซิตินของถั่วเหลืองโดยใช้สารละลาย Cs_2CO_3/EDTA ความเข้มข้น 0.75 M ที่ pH 8.5 กับ deuterated chloroform และสารละลายมาตรฐาน triphenyl phosphate เข้มข้น 6 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ในตัวทำละลายเมทานอล ในอัตราส่วน 2:2:2 จากนั้นทำการสกัดตัวอย่างเลซิตินปริมาณ 300 มิลลิกรัม ที่อุณหภูมิห้องแล้วนำส่วนชั้นสารอินทรีย์ไปทดสอบด้วยเทคนิค ^{31}P-NMR จำนวน 3 ซ้ำต่อตัวอย่าง ตัวอย่างเลซิตินจากถั่วเหลืองที่ทำการศึกษาแบ่งออกเป็น 4 กลุ่มตัวอย่างคือ สารมาตรฐานเลซิตินจากถั่วเหลือง เลซิตินจากถั่วเหลืองชนิดแคปซูลที่จำหน่ายตามท้องตลาด เลซิตินจากถั่วเหลืองที่ผ่านการปรับปรุงคุณภาพทางเคมี และเลซิตินที่ผู้วิจัยทำการสกัดจากเมล็ดถั่วเหลืองกะเทาะเปลือก มีการศึกษาค่าการวิเคราะห์คือค่าขีดจำกัดการตรวจัด (LOD) และค่าขีดจำกัดการตรวจวัดเชิงปริมาณ (LOQ) โดยใช้ตัวอย่างที่เตรียมในลักษณะเดียวกับการวิเคราะห์ปกติ เพื่อให้ได้ผลการวิเคราะห์ที่น่าเชื่อถือมีการวิเคราะห์ฟอสโฟลิปิดด้วยเทคนิค HPLC โดยเตรียมสารมาตรฐาน phosphatidylcholine (PC) ความเข้มข้น 5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร แล้วนำมาสร้างกราฟมาตรฐานในช่วง 100–1250 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตัวอย่างเลซิตินถูกเตรียมโดยชั่งน้ำหนัก ละลายในเมทานอล ช่วยละลายด้วยอัลตร้าโซนิก และวิเคราะห์ด้วยระบบ reverse phase-HPLC โดยใช้ตัวทำละลายเคลื่อนที่ผสมระหว่างไอโซโพรพานอล น้ำ และเมทานอล อัตราส่วน 70:22:8 ตรวจวัดที่ความยาวคลื่น 205 นาโนเมตร เป็นเวลา 30 นาที

ผลการวิจัย : การศึกษาพัฒนาวิธีการตรวจวัดชนิดและปริมาณฟอสโฟลิปิดที่เป็นองค์ประกอบในเลซิตินจากถั่วเหลืองในงานวิจัยนี้ได้ทำการศึกษาวิธีการวิเคราะห์ในกลุ่มตัวอย่าง 4 ประเภทคือสารมาตรฐานเลซิตินจากถั่วเหลือง เลซิตินที่สกัดจากเมล็ดถั่วเหลืองกะเทาะเปลือก เลซิตินจากถั่วเหลืองชนิดแคปซูล และเลซิตินจากถั่วเหลืองที่ทำการปรับเปลี่ยนโครงสร้างทางเคมี ผลการวิเคราะห์พบว่าในตัวอย่างเลซิตินจากถั่วเหลืองที่ทำการศึกษาทั้งหมดพบฟอสโฟลิปิดที่เป็นองค์ประกอบทั้งสิ้น 11 ชนิดคือ phosphatidylcholine (PC), 1-lysophosphatidylcholine (1-LPC), phosphatidylinositol (PI), 2-lysophosphatidylcholine (2-LPC), lysophosphatidylinositol (LPI), phosphatidylethanolamine (PE), diphosphatidyl glycerol (DPG), lysophosphatidylethanolamine (LPE), phosphatidylglycerol (PG), phosphatidylserine (PS) และ lysophosphatidic acid (LPA) โดยมีชนิดและปริมาณที่แตกต่างกันแบ่งออกเป็นแต่ละกลุ่มคือ สารมาตรฐานเลซิตินจากถั่วเหลืองพบฟอสโฟลิปิดทั้งสิ้น 10 ชนิด เลซิตินที่สกัดจากเมล็ดถั่วเหลืองกะเทาะเปลือกพบฟอสโฟลิปิดทั้งสิ้น 7 ชนิด เลซิตินชนิดแคปซูลที่จำหน่ายในรูปแบบอาหารเสริมพบฟอสโฟลิปิดทั้งสิ้น 11 ชนิด และเลซิตินที่ผ่านกระบวนการปรับปรุงทางเคมีพบฟอสโฟลิปิดทั้งสิ้น 11 ชนิด ซึ่งฟอสโฟลิปิดแต่ละชนิดปรากฏสัญญาณ ^{31}P-NMR ที่ค่า chemical shift แตกต่างกันอย่างชัดเจนในช่วง -0.77 ถึง 3.8 ppm เมื่อศึกษาค่า relaxation time (T_1) พบว่าฟอสโฟลิปิดที่เป็นองค์ประกอบในเลซิตินจากถั่วเหลืองจะมีค่า T_1 ของอะตอมฟอสฟอรัสอยู่ในค่าไม่เกิน 2 วินาที ในขณะที่สารมาตรฐานอ้างอิง triphenyl phosphate ที่ใช้เป็นสารอ้างอิงในการคำนวนหาปริมาณฟอสโฟลิปิด พบว่าให้ค่า T_1 อยู่ที่ 5.65 วินาที ซึ่งเป็นค่าที่สูงที่สุดครอบคลุม T_1 ของฟอสโฟลิปิด

BSJ
BURAPHA SCIENCE JOURNAL
ISSN 2985-0983 (online)
วารสารวิทยาศาสตร์บูรพา ปีที่ 30 (ฉบับที่ 2) พฤษภาคม – สิงหาคม พ.ศ. 2568
BURAPHA SCIENCE JOURNAL Volume 30 (No.2) May – August 2025 บทความวิจัย

ชนิดอื่นๆ และกำหนดให้ค่า number of scan มีค่าเท่ากับ 256 ซึ่งจะได้ค่า signal to noise ratio เท่ากับ 3070 ซึ่งจะใช้เวลาทดสอบหาปริมาณฟอสโฟลิปิดต่อหนึ่งตัวอย่างที่ประมาณ 46 นาที สำหรับค่าทางการวิเคราะห์คือขีดจำกัดการตรวจวัด (LOD) และขีดจำกัดการตรวจวัดเชิงปริมาณ (LOQ) ด้วยเทคนิค ^{31}P-NMR มีค่าเท่ากับ 0.01 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และ 0.02 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรตามลำดับ

สรุปผลการวิจัย : งานวิจัยนี้มีประสบความสำเร็จในการพัฒนาและประเมินประสิทธิภาพของเทคนิค ^{31}P-NMR สำหรับการวิเคราะห์ชนิดและปริมาณของฟอสโฟลิพิดที่เป็นองค์ประกอบในเลซิตินจากถั่วเหลือง โดยมุ่งลดข้อจำกัดของวิธีวิเคราะห์แบบดั้งเดิม อาทิเช่น HPLC, TLC และ FTIR ซึ่งมีข้อจำกัดด้านความต้องการใช้สารมาตรฐานเฉพาะชนิด ใช้ระยะเวลาในการวิเคราะห์นาน และก่อให้เกิดของเสียในปริมาณมาก ผลการวิเคราะห์แสดงให้เห็นว่าตำแหน่งสัญญาณ (chemical shift) ของฟอสโฟลิปิดแต่ละชนิดจากกลุ่มตัวอย่าง 4 ประเภท มีความเหมือนกันและแยกออกจากกันอย่างชัดเจนในช่วง -0.77 ถึง 3.80 ppm เหมาะสมที่จะนำมาวิเคราะห์เชิงคุณภาพและปริมาณ อันเนื่องมาจากความแตกต่างของโครงสร้างเคมีของฟอสโฟลิปิดดังกล่าว ผลการศึกษายังแสดงให้เห็นว่าการวิเคราะห์ด้วยเทคนิค ^{31}P-NMR สามารถวิเคราะห์ชนิดและปริมาณฟอสโฟลิปิดจากถั่วเหลืองได้ถึง 11 ชนิดในการทดสอบเพียงครั้งเดียวและใช้เวลาทดสอบเพียง 46 นาที ส่งผลให้สามารลดเวลา ของเสียที่เกิดขึ้น และไม่ต้องพึ่งพาสารมาตรฐานตามชนิดของฟอสโฟลิปิดที่ต้องการวิเคราะห์ และที่สำคัญให้ค่าขีดจำกัดการตรวจวัดต่ำถึง 0.01 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

คำสำคัญ : ฟอสโฟลิปิด ; เลซิตินจากถั่วเหลือง ; ฟอสฟอรัสนิวเคลียร์แมกเนติกเรโซแนนซ์สเปกโตรสโคปี

Abstract

Background and Objectives : Soy lecithin is widely utilized in dietary supplements as well as in the formulation of food, pharmaceuticals, cosmetics, and animal feed. Its structure comprises several key phospholipids, including phosphatidylcholine (PC), phosphatidylethanolamine (PE), phosphatidylinositol (PI), phosphatidic acid (PA), and phosphatidylserine (PS), all of which play crucial roles in cellular growth, lipid transport, and the synthesis of neurotransmitters such as acetylcholine. Despite its numerous health benefits, excessive intake of lecithin may lead to adverse effects, including nausea, vomiting, loss of appetite, and excessive sweating. Therefore, accurate and precise analysis of the types and quantities of phospholipids in lecithin products is essential for quality control. Currently, high performance liquid chromatography (HPLC) and fourier transform infrared spectroscopy (FT-IR) are commonly employed for both qualitative and quantitative analysis of phospholipids. However, these techniques have certain limitations, such as reliance on reference standards specific to each analyte, dependence on specific stationary and mobile phases, long analysis times, and the generation of considerable chemical waste. To address these limitations, this study explores the application of phosphorous nuclear magnetic resonance spectroscopy

(^{31}P-NMR) for the analysis of phospholipids. This technique enables the simultaneous detection of multiple phospholipid species in a single analysis with high specificity, due to the distinct ^{31}P signals characteristic of each phospholipid type. Therefore, the development and application of ^{31}P-NMR as a method for identifying and quantifying phospholipids in soy lecithin presents a promising alternative, offering significant advantages over conventional methods and contributing to product safety and quality assurance for consumers.

Methodology : In the present study, a solvent system was formulated for the extraction of phospholipids from soybean lecithin using a mixture comprising 0.75 M Cs_2CO_3/EDTA (pH 8.5), deuterated chloroform, and a standard solution of triphenyl phosphate at a concentration of 6 mg/mL in methanol, in a volumetric ratio of 2:2:2. Soy lecithin samples (300 mg) were extracted at ambient temperature, and the organic layer was subsequently collected for analysis using ^{31}P nuclear magnetic resonance spectroscopy (^{31}P-NMR). Each sample was analyzed in triplicate to ensure reproducibility. The lecithin samples were categorized into four groups: (1) standard soybean lecithin, (2) commercially available encapsulated soybean lecithin, (3) chemically modified soybean lecithin and (4) lecithin extracted from dehulled soybean seeds. Analytical performance parameters, including the limit of detection (LOD) and limit of quantitation (LOQ), were determined using samples prepared in the same manner as those used for routine ^{31}P-NMR analysis to ensure methodological reliability. To validate the NMR findings, complementary quantitative analysis of phospholipids was performed using high performance liquid chromatography (HPLC). A phosphatidylcholine (PC) standard solution was prepared at a concentration of 5 mg/mL and employed to construct a calibration curve within the range of 100–1250 µg/mL. Lecithin samples were accurately weighed, dissolved in methanol, subjected to ultrasonic-assisted dissolution and analyzed using a reverse-phase HPLC system. The mobile phase consisted of a mixture of isopropanol, water, and methanol in a ratio of 70:22:8. UV detection was carried out at a wavelength of 205 nm over a chromatographic run time of 30 minutes.

Main Results : This study focused on the development of a method for the identification and quantification of phospholipid components in soybean-derived lecithin. The investigation was conducted on four types of samples: (1) standard soybean lecithin, (2) lecithin extracted from dehulled soybean seeds, (3) encapsulated soybean lecithin used as dietary supplements, and (4) chemically modified soybean lecithin. The analysis revealed the presence of 11 phospholipid species across all lecithin samples: phosphatidylcholine (PC), 1-lysophosphatidylcholine (1-LPC), phosphatidylinositol (PI), 2-lysophosphatidylcholine (2-LPC), lysophosphatidy linositol (LPI), phosphatidylethanolamine (PE), diphosphatidylglycerol (DPG), lysophosphatidylethanolamine (LPE), phosphatidylglycerol (PG), phosphatidylserine (PS), and lysophosphatidic acid (LPA). However, the number and

relative abundance of phospholipid species varied among the sample types: standard soybean lecithin contained 10 phospholipid species, lecithin from dehulled soybean seeds contained 7, the encapsulated lecithin supplement contained all 11, and the chemically modified lecithin also contained 11. Each phospholipid exhibited a distinct ^{31}P-NMR signal with a chemical shift in the range of -0.77 to 3.8 ppm. Relaxation time (T_1) measurements showed that phosphorous atoms in soybean lecithin phospholipids had T_1 values not exceeding 2 seconds. In contrast, the internal standard, triphenyl phosphate, used for quantification, exhibited a T_1 value of 5.65 seconds, longer than those of all other phospholipids. Making it suitable as a reference compound. The number of scans was set to 256, yielding a signal-to-noise ratio (S/N) of 3070. Under these conditions, the time required for quantification of each sample was approximately 46 minutes. The analytical limits obtained using the ^{31}P-NMR technique included a limit of detection (LOD) of 0.01 mg/mL and a limit of quantification (LOQ) of 0.02 mg/mL.

Conclusions : This research successfully developed and evaluated the effectiveness of the ^{31}P-NMR technique for the qualitative and quantitative analysis of phospholipids present in soy lecithin. The aim was to overcome the limitations associated with conventional analytical methods such as HPLC, TLC, and FTIR, which typically require specific reference materials, involve lengthy analytical procedures and generate considerable chemical waste. The analysis results demonstrated that the chemical shift positions of various phospholipid species across four sample groups were consistent and distinctly separable within the range of -0.77 to 3.80 ppm, making the technique suitable for both qualitative and quantitative analysis due to the structural differences among phospholipid types. Furthermore, the findings revealed that the ^{31}P-NMR technique enabled the identification and quantification of up to eleven phospholipid species in a single run, with a total analysis time of only 46 minutes. This significantly reduced analysis time, minimized waste production, and eliminated the need for phospholipid-specific standards. Notably, the method also achieved a detection limit as low as 0.01 mg/mL.

Keywords : phospholipids ; soy lecithin ; ^{31}P nuclear magnetic resonance spectroscopy

***Corresponding author E-mail** : sarayut.wa@buu.ac.th

Introduction

ประเทศไทยมีการบริโภคถั่วเหลืองและผลิตภัณฑ์ที่เกี่ยวข้องในปริมาณมาก โดยข้อมูลจากกรมการค้าภายในรายงานว่าในปี 2564 ประเทศไทยมีการผลิตถั่วเหลืองในประเทศปริมาณมากกว่า 29,000 ตัน และมีการนำเข้าถั่วเหลืองจากต่างประเทศสูงถึงกว่า 250,000 ตัน โดยนำเข้ามาเพื่อใช้ในอุตสาหกรรมอาหาร เครื่องสำอาง อาหารเสริม ยา และอาหารสัตว์

เป็นหลัก โดยถั่วเหลืองเป็นแหล่งของสารอาหารที่สำคัญทั้งโปรตีน คาร์โบไฮเดรต กรดอะมิโน โดยสารสำคัญชนิดหนึ่งคือ ฟอสโฟลิปิด (phospholipids) ที่อยู่ในรูปของเลซิติน (lecithin) ที่สกัดได้จากถั่วเหลือง ฟอสโฟลิปิดเป็นสารประกอบออร์กาโนฟอสเฟตที่มีความสำคัญอย่างมากต่อสิ่งมีชีวิตเนื่องจากเป็นส่วนประกอบของเยื่อหุ้มเซลล์ นอกจากนั้นฟอสโฟลิปิดนี้จะทำหน้าที่เป็นอิมัลซิไฟเออร์ (Emulsifier) ที่ช่วยให้ร่างกายดูดซึมไขมันได้ (Jangle *et al*., 2013; Mertins *et al*., 2008) โดยในโครงสร้างจะมีส่วนที่มีคุณสมบัติ hydrophilic และ hydrophobic (Sousa *et al*., 2013) ด้วยเหตุผลนี้ผู้ที่รักในการดูแลสุขภาพจึงมีการบริโภคผลิตภัณฑ์เลซิตินจากถั่วเหลืองทั้งในรูปแบบผลิตภัณฑ์เสริมอาหารและการผสมลงไปเป็นส่วนเสริมในผลิตภัณฑ์อาหาร ในขณะเดียวกันผู้ประกอบการผลิตอาหาร ยา เวชสำอาง รวมถึงอาหารสัตว์ ก็มีการผสมเลซิตินในผลิตภัณฑ์เหล่านี้เช่นเดียวกัน เลซิตินเป็นสารที่พบได้ในเนื้อเยื่อของสัตว์และในน้ำมันพืช ประกอบด้วยโคลีนกลีเซอรอล (glycerol) กรดไขมันไกลโคลิปิดไตรเอซิลกลีเซอรอล (triacyl glyceride) และส่วนใหญ่เป็นฟอสโฟลิปิด เช่น ฟอสฟาติดิลโคลีน (phosphatidylcholine หรือ PC) ฟอสฟาติดิลเอทานอลเอมีน (phosphatidylethanolamine หรือ PE) และฟอสฟาติดิลลิโนซิทอล (phosphatidylinositol หรือ PI) โดยมีกรดฟอสฟาติดิก (phosphatidic acid หรือ PA) และฟอสฟาติดิลซีรีน (phosphatidylserine หรือ PS) ในปริมาณเล็กน้อย (Cooper & Ainscough, 2016; Scholfield, 1981) ฟอสโฟลิปิดที่มีอยู่ในเลซิตินเป็นส่วนประกอบที่สำคัญของเยื่อหุ้มเซลล์ ซึ่งจำเป็นต่อการเจริญเติบโต (Liu *et al*., 2013) โดยที่ฟอสฟาติดิลโคลีน phosphatidylcholine (PC) มีอยู่ในปริมาณมากที่สุดในเลซิติน และมีส่วนสำคัญในการก่อตัวของชั้นไบลิปิดในเยื่อหุ้มเซลล์ นอกจากนี้ยังเป็นสารตั้งต้นของการสังเคราะห์โคลีน ซึ่งเป็นสารอาหารที่จำเป็นสำหรับการขนส่งไขมัน และเป็นสารตั้งต้นในการผลิตอะเซทิลโคลีน ที่ทำหน้าที่เป็นสารสื่อประสาท (Blusztajn *et al*., 1987) โดยโครงสร้างของฟอสโฟลิปิดบางชนิดที่มักพบในผลิตภัณฑ์อาหารแสดงดัง Figure 1 ในปัจจุบันมีการนำเลซิตินมาจำหน่ายในรูปของอาหารเสริมเป็นจำนวนมาก การรับประทานเลซิตินในปริมาณที่มากเกินไปอาจจะทำให้เกิดผลข้างเคียงได้ เช่น อาจทำให้เกิดอาการคลื่นไส้ อาเจียน น้ำลายหลั่งออกมาก เบื่ออาหาร และมีเหงื่อออกมาก ดังนั้นจึงมีความจำเป็นอย่างยิ่งในการวิเคราะห์ชนิดและปริมาณฟอสโฟลิปิดในผลิตภัณฑ์เลซิตินดังกล่าวเพื่อเป็นข้อมูลในการพิจารณาสำหรับผู้บริโภค

การวิเคราะห์ชนิดและปริมาณของฟอสโฟลิปิดในปัจจุบัน นิยมใช้เทคนิคโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง (HPLC) (Hurst & Martin, 1984) thin-layer chromatography (TLC) (Deranieh *et al*., 2013) และอินฟราเรดสเปคโทรสโคปี (FT-IR) (Meng *et al*., 2014) เนื่องจากการวิเคราะห์ทำได้ไม่ยาก สามารถวิเคราะห์ได้ทั้งเชิงคุณภาพและเชิงปริมาณ มีความแม่นยำสูง แต่อย่างไรก็ตามการวิเคราะห์ด้วยเทคนิค HPLC จำเป็นต้องพึ่งพาสารมาตรฐานสำหรับใช้ในการวิเคราะห์ตามชนิดของสารที่ต้องการวิเคราะห์ พึ่งพาชนิดของวัฏภาคคงที่ (stationary phase) ใช้เวลาในการทดสอบนาน และที่สำคัญคือมีของเสียที่ใช้เป็นวัฏภาคเคลื่อนที่ (mobile phase) เกิดขึ้นจากกระบวนการวิเคราะห์จำนวนมาก ดังนั้นนักวิจัยจึงสนใจที่จะวิเคราะห์ฟอสโฟลิปิดด้วยเทคนิคอื่นที่ให้ประสิทธิภาพที่ดีกว่า ลดเวลาในการวิเคราะห์และลดของเสียที่เกิดขึ้นจากกระบวนการวิเคราะห์ หนึ่งในวิธีนั้นคือการใช้เทคนิคฟอสฟอรัสนิวเคลียร์แมกเนติกเรโซแนนซ์สเปกโทรสโคปี (^{31}P-NMR) เพื่อนำมาวิเคราะห์ชนิดและปริมาณของฟอสโฟลิปิด เนื่องจากเป็นวิธีที่ใช้ในการวิเคราะห์ที่สามารถวิเคราะห์ฟอสโฟลิปิดหลายชนิดได้พร้อมๆ กัน

ในการวิเคราะห์เพียงครั้งเดียว มีความจำเพาะเจาะจงในการวิเคราะห์ที่สูง เนื่องมาจากลักษณะเฉพาะของนิวเคลียสของฟอสฟอรัสที่อยู่ในโครงสร้างของฟอสโฟลิปิดแต่ละชนิดที่มีสภาวะแวดล้อมที่แตกต่างกันจะให้สัญญาณค่า chemical shift ที่แตกต่างกันด้วย (Glonek, 1998; Horn *et al*., 2000; Zheng *et al*., 2017; Liu *et al*., 2025) ^{31}P-NMR เป็นเทคนิคที่สนใจในการวัดสัญญาณของนิวเคลียสของ ^{31}P มักใช้ในการจำแนกลักษณะเฉพาะของนิวคลีโอไทด์และฟอสโฟลิปิด แม้ว่าเทคนิคนี้จะมีสภาพไว (sensitivity) น้อยกว่า ^{1}H-NMR แต่ก็มีสภาพไวที่ดีกว่า ^{13}C-NMR เนื่องจาก ^{31}P เป็นไอโซโทปที่เสถียรและมีจำนวนมากถึง 100% ดังนั้น ^{31}P-NMR จึงถูกนำมาใช้อย่างกว้างขวาง เช่นใช้ในการระบุความบริสุทธิ์ของสารประกอบ (purity determination) (Feringa *et al*., 1985) เนื่องจากสัญญานของ ^{31}P ส่วนใหญ่จะปรากฏขึ้นในบริเวณที่มีลักษณะเฉพาะไม่ซ้อนทับกับสัญญานตำแหน่งอื่นๆ จึงสามารถนำมาใช้ในการคำนวนหาปริมาณได้ดี โดยค่านิวเคลียร์สปิน (I) ของ ^{31}P คือ ½ และสัญญาณของ ^{31}P-NMR จะปรากฏในช่วง chemical shift ที่ +250 ถึง -250 ppm

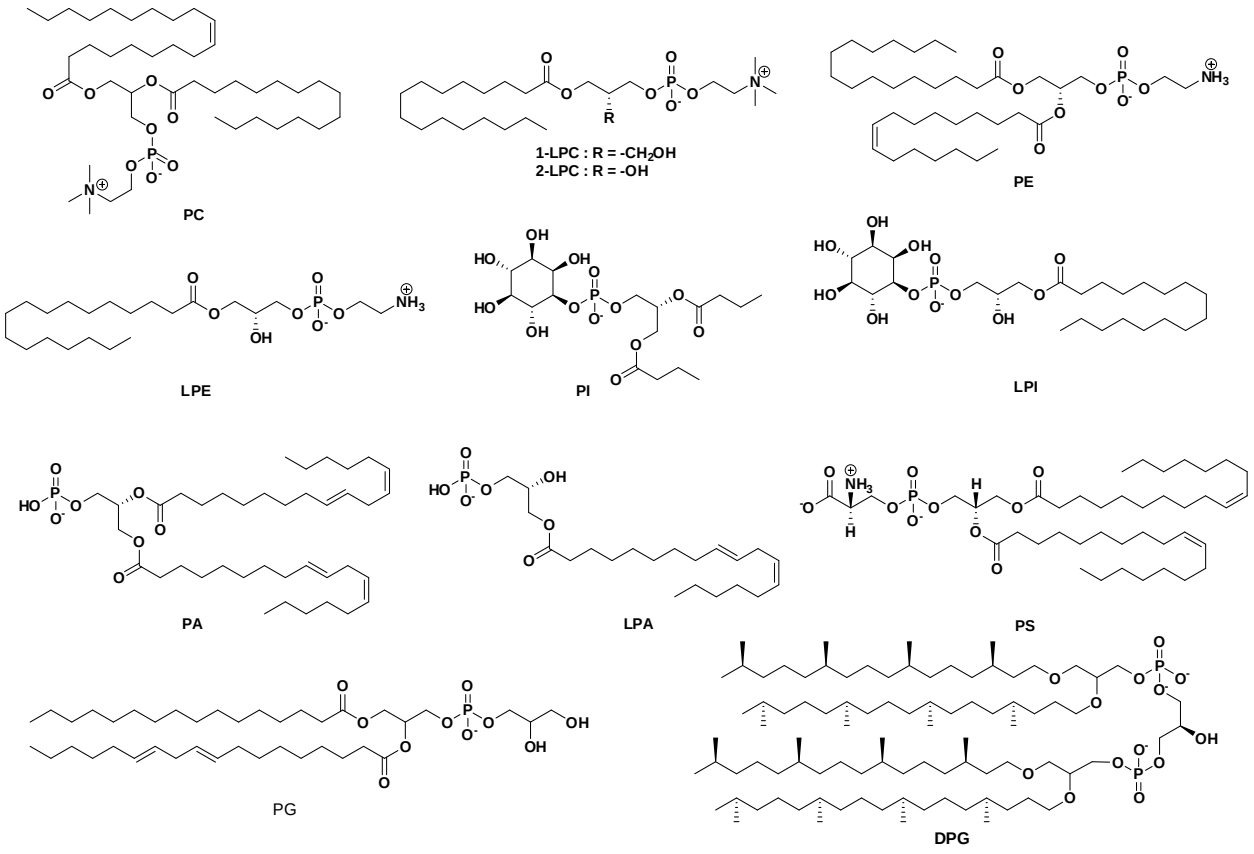

Figure 1 Structures of example phospholipids in lecithin

Methodology

1. สารเคมี

สารเคมีและตัวทำละลายที่ใช้ในงานวิจัยนี้เป็นเกรดสำหรับวิเคราะห์ (analytical reagent grade) และเกรดสำหรับ HPLC โดยสารมาตรฐาน phosphatidylcholine (PC) และ ethylenediaminetetraacetic acid disodium salt dihydrate เป็นของบริษัท Merck เกลือ cesium carbonate สารมาตรฐานเลซิตินสกัดจากถั่วเหลือง และ triphenyl phosphate ของบริษัท Tokyo Chemical Industry ตัวทำละลาย isopropanol, methanol, acetone, hexane ยี่ห้อ QREC และ RCI Labscan สำหรับตัวทำละลาย deuterated chloroform ยี่ห้อ Eurisotop

2. เครื่องมือและอุปกรณ์

- เครื่องปั่นไฟฟ้ายี่ห้อ Mandine รุ่น MBL600M1-16
- เครื่องคนสารละลายแบบให้ความร้อนยี่ห้อ IKA รุ่น C-MAG HS7
- เครื่องวัดค่า pH ของสารละลายยี่ห้อ Metrohm รุ่น 913
- เครื่องปั่นเหวี่ยงตกตะกอนยี่ห้อ Hettich รุ่น EBA 200
- เครื่องชั่งทศนิยม 4 และ 5 ตำแหน่ง ยี่ห้อ Mettler Toledo รุ่น ME 204 และ NewClassic MS
- เครื่องนิวเคลียร์แมกเนติกเรโซแนนซ์สเปกโทรมิเตอร์ยี่ห้อ Bruker รุ่น Avance III HD 400 พร้อมหัวตรวจวัดแบบ CryoProbe^{TM} Prodigy
- เครื่องโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง (HPLC system) ยี่ห้อ Agilent Technologies รุ่น 1260 infinity II Quaternary pump (G7111A), Diode array detector (G7117C), autosampler (G7129A) คอลัมน์ Agilent Eclipse XDB-C18, 4.6x150 mm, 5 μM (PN : 993967-902)

3. การเตรียมสารละลายสำหรับการสกัดฟอสโฟลิปิดจากเลซิติน

3.1 การเตรียมสารละลาย Cs_2CO_3/EDTA ความเข้มข้น 0.75 M pH 8.5

ในงานวิจัยนี้ได้ประยุกต์วิธีการเตรียมสารละลายสำหรับสกัดฟอสโฟลิปิดจากเลซิตินจากงานวิจัยของ Ahmmed และคณะ (Ahmmed *et al*., 2021) โดยทำการเตรียมสารละลาย Cs_2CO_3/EDTA ความเข้มข้น 0.75 M ที่ pH 8.5 จากการละลาย ethylenediaminetetraacetic acid disodium salts dihydrate ปริมาณ 13.96 กรัม ละลายด้วยน้ำกลั่น 40 มิลลิลิตร และเติม cesium carbonate (Cs_2CO_3) ปริมาณ 0.3 กรัม จากนั้นนำของผสมไปให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 100 °C พร้อมทั้งคนสารละลายผสมต่อเนื่องจนกระทั่งของแข็งละลายได้ จึงปล่อยให้สารละลายเย็นลงที่อุณหภูมิห้อง และทำการปรับ pH ของสารละลายให้ได้ค่า 8.5 ด้วยการเติม Cs_2CO_3 ที่เป็นของแข็งพร้อมคนสารละลายอย่างต่อเนื่อง จากนั้นถ่ายสารละลายที่เตรียมได้ ลงในขวดวัดปริมาตรขนาด 50 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่น จะได้สารละลาย Cs_2CO_3/EDTA ความเข้มข้น 0.75 M pH 8.5

3.2 การเตรียมสารละลายมาตรฐาน triphenyl phosphate

สารละลายมาตรฐาน (internal standard) triphenyl phosphate (TPP) ที่ใช้สำหรับการวิเคราะห์ปริมาณฟอสโฟลิปิด ด้วยเทคนิค ^{31}P-NMR สามารถเตรียมได้โดยทำการละลาย triphenyl phosphate ปริมาณ 300 มิลลิกรัม ในตัวทำละลายเมทานอล จากนั้นทำการปรับปริมาตรสารละลายในขวดวัดปริมาตรขนาด 50 มิลลิลิตร จะได้สารละลายมาตรฐาน triphenyl phosphate เข้มข้น 6 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

4. การวิเคราะห์ชนิดและปริมาณของฟอสโฟลิปิดด้วยเทคนิค ^{31}P-NMR

4.1 การสกัดเลซิตินจากเมล็ดถั่วเหลือง

ในงานวิจัยนี้ทำการประยุกต์วิธีการสกัดเลซิตินจากเมล็ดถั่วเหลืองจากวิธีของ Wu (Wu, 2002) โดยนำตัวอย่างถั่วเหลืองที่ผ่านการกะเทาะเปลือกแล้ว ที่ซื้อจากท้องตลาดในประเทศไทย ชั่งน้ำหนักประมาณ 300 กรัมและนำไปปั่นให้ละเอียดด้วยเครื่องปั่นไฟฟ้า จากนั้นถ่ายลงใส่ในบีกเกอร์ขนาด 2000 มิลลิลิตร ทำการแช่ตัวอย่างถั่วเหลืองที่ปั่นละเอียดแล้วด้วย hexane ปริมาตร 1000 มิลลิลิตร คนให้เข้ากันและนำตัวอย่างไปให้ความร้อนด้วยอ่างน้ำร้อนที่อุณหภูมิ 60-65 $^{\circ}$C เป็นเวลา 1 ชั่วโมง โดยคนของผสมทุก ๆ 10 นาที เมื่อครบ 1 ชั่วโมง นำไปกรองและเก็บชั้น hexane ทำการสกัดกากถั่วเหลืองซ้ำจำนวน 2 ครั้ง และนำชั้น hexane ที่กรองได้ไประเหยตัวทำละลายด้วยเครื่องระเหยตัวทำละลายแบบลดความดัน จะได้ผลิตภัณฑ์เป็นของผสมของเลซิตินและน้ำมัน (crude oil) เป็นของเหลวสีเหลืองส้ม นำของผสมที่ได้ไปเติมน้ำกลั่นปริมาณ 3% (w/w) ของน้ำหนักของ crude oil ที่ได้ ทำการคนสารละลายผสมพร้อมทั้งให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 60 $^{\circ}$C เป็นเวลา 1 ชั่วโมง จากนั้นนำของผสมถ่ายใส่หลอดทดลองขนาด 15 มิลลิลิตร และนำไปทำการปั่นเหวี่ยง (centrifuge) ที่ความเร็ว 3500 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที จะได้ของผสมแยกออกจากกันเป็น 3 ส่วนคือส่วนที่เป็นน้ำมันชั้นบน ของแข็งชั้นกลาง (กัม, gum) และส่วนน้ำชั้นล่าง ทำการถ่ายส่วนที่เป็นน้ำมันชั้นบนและน้ำชั้นล่างออก เก็บส่วนกัมนำมาละลายด้วยอะซีโตนเย็นปริมาตร 10 มิลลิลิตร เพื่อกำจัดส่วนที่เป็นน้ำมัน และนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 5000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที จะได้ส่วนของเลซิตินเป็นของแข็งที่ก้นหลอด ถ่ายส่วนที่เป็นของเหลวออก ละลายส่วนของแข็งด้วย hexane ถ่ายใส่ขวดก้นกลมและนำไประเหยแห้งด้วยเครื่องระเหยตัวทำละลายแบบลดความดัน จะได้ผลิตภัณฑ์เลซิตินเป็นของเหลวกึ่งแข็งสีเหลืองส้ม ที่พร้อมจะนำไปวิเคราะห์ปริมาณฟอสโฟลิปิดต่อไป

4.2. การสกัดฟอสโฟลิปิดจากเลซิตินจากถั่วเหลือง

ชั่งตัวอย่างเลซิตินจากถั่วเหลืองประมาณ 300 มิลลิกรัม ด้วยเครื่องชั่งทศนิยม 4 ตำแหน่ง ใส่หลอดเซนตริฟิวจ์ขนาด 15 มิลลิลิตร พร้อมทั้งบันทึกน้ำหนักที่แน่นอน จากนั้นเติมสารละลายมาตรฐาน triphenyl phosphate เข้มข้น 6 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 2 มิลลิลิตร ทำการเขย่าสารละลายผสมเป็นเวลา 5 นาที จนกระทั่งเลซิตินกระจายตัวสม่ำเสมอในสารละลาย ทำการเติม deuterated chloroform ปริมาตร 2 มิลลิลิตร ลงไปยังของผสมเพื่อใช้เป็นตัวทำละลายสำหรับการวิเคราะห์ด้วยเครื่อง NMR (deuterium solvent as the lock signal) และนำสารละลายผสมดังกล่าวไปเขย่าให้เข้ากันเป็นเวลา 5 นาที สุดท้ายเติมสารละลาย Cs_2CO_3/EDTA ความเข้มข้น 0.75 M pH 8.5 ปริมาตร 2 มิลลิลิตร และเขย่าสารละลายให้

ผสมกัน จากนั้นนำสารละลายผสมไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 5000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที จะได้สารละลายแยกชั้นเป็น 2 ชั้น เก็บชั้นตัวทำละลายอินทรีย์ (ชั้นล่าง) เพื่อนำไปวิเคราะห์ในขั้นต่อไป ในส่วนของตัวอย่างเลซิตินสำเร็จรูปชนิดแคปซูลให้ทำการตัดแคปซูลที่บรรจุเลซิตินจำนวน 5 แคปซูล และนำเลซิตินที่ได้มาผสมกัน จากนั้นทำการเตรียมตัวอย่างเช่นเดียวกับเลซิตินจากถั่วเหลืองดังที่กล่าวมา

4.3 การเตรียมสารตัวอย่างเลซิตินเพื่อนำมาวิเคราะห์ด้วยเทคนิค ^{31}P-NMR

ปิเปตชั้นตัวทำละลายอินทรีย์ที่เตรียมได้จากข้อ 4.2 ใส่ลงในหลอด NMR เส้นผ่านศูนย์กลาง 5 มิลลิเมตร ความหน้าผนังหลอด 0.38 มิลลิเมตร ปริมาตร 600 ไมโครลิตร และนำไปวัดสัญญาณ ^{31}P-NMR (ทำซ้ำ 3 ครั้ง) จากนั้นนำผลการวิเคราะห์ที่ได้มาคำนวณหาร้อยละองค์ประกอบของฟอสโฟลิปิดที่เป็นองค์ประกอบ โดยใช้สมการที่ 1 (Bharti & Roy, 2012)

$$P_x = \frac{I_x}{I_{cal}} \times \frac{N_x}{N_{cal}} \times \frac{M_x}{M_{cal}} \times \frac{W_x}{W_{cal}} \times P_{cal} \qquad (1)$$

โดยที่ P_x คือ % w/w ของฟอสโฟลิปิดที่วิเคราะห์

P_{cal} คือ ความบริสุทธิ์ (% w/w) ของสารมาตรฐานที่ใช้เป็น internal standard

I_x คือ พื้นที่พีคของฟอสโฟลิปิดที่วิเคราะห์

I_{cal} คือ พื้นที่พีคของ internal standard

N_x คือ จำนวนอะตอมของ ^{31}P ของพีคฟอสโฟลิปิดที่วิเคราะห์

N_{cal} คือ จำนวนอะตอมของ ^{31}P ของพีค internal standard

M_x คือ มวลโมเลกุลของฟอสโฟลิปิดที่วิเคราะห์

M_{cal} คือ มวลโมเลกุลของ internal standard

W_x คือ น้ำหนักของเลซิตินที่ชั่งได้ (มิลลิกรัม)

W_{cal} คือ น้ำหนักของ internal standard (มิลลิกรัม)

4.4 การเตรียมสภาวะเครื่อง NMR สำหรับการทำปริมาณวิเคราะห์ด้วยเทคนิค ^{31}P-NMR

ในการทำปริมาณวิเคราะห์ด้วยเทคนิคนิวเคลียร์แมกเนติกเรโซแนนซ์สเปกโทรสโคปี (Quantitative Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy, qNMR) มีพารามิเตอร์ที่ต้องคำนึงถึงในการทดสอบแตกต่างจากการทดสอบด้วยเทคนิค NMR เชิงคุณภาพพอสมควร โดยผู้ทดสอบจำเป็นต้องเลือกสัญญาณ (peak) ที่จะนำมาทำปริมาณวิเคราะห์ที่มีคุณภาพสูง มีค่า signal to noise ratio (S/N) ที่ดีพอ ซึ่งการที่จะให้ได้มาซึ่งสัญญาณที่ดีดังกล่าวจำเป็นต้องกำหนดพารามิเตอร์ที่ให้ถูกต้อง เช่น ค่า pulse angle, repetition time (T_R), time domain (TD), receiver gain (RG) และ relaxation time (T_1), delay time (D_1) เป็นต้น งานวิจัยนี้ได้ทำการประยุกต์ใช้พารามิเตอร์จากงานวิจัยของ Glonek (Glonek, 1998) บางส่วนและ

ทำการปรับเปลี่ยนบางพารามิเตอร์ให้เหมาะสมกับตัวอย่างเลซิตินของถั่วเหลืองในประเทศไทยเพื่อให้ได้ผลการวิเคราะห์ที่แม่นยำที่สุด โดยทำการหาค่า T_1 ของสารตัวอย่าง โดยใช้ฟังก์ชั่นการหาค่า T_1 ด้วยโปรแกรม Topspin 3.7 และกำหนดพารามิเตอร์ D_1 โดยใช้ repetition time เท่ากับ 3 ($D_1 = 3T_1$)

5. การศึกษาค่าทางการวิเคราะห์

5.1 การเตรียมตัวอย่างเพื่อใช้วิเคราะห์หา Limit of Detection (LOD) และ Limit of Quantitation (LOQ)

ชั่งตัวอย่างสารมาตรฐานเลซิตินจากถั่วเหลือง 300 มิลลิกรัม ด้วยเครื่องชั่งทศนิยม 4 ตำแหน่ง ใส่หลอดเซนตริฟิวจ์ขนาด 15 มิลลิลิตร พร้อมทั้งบันทึกน้ำหนักที่แน่นอน จากนั้นเติมสารละลายมาตรฐาน triphenyl phosphate เข้มข้น 6 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 2 มิลลิลิตร ทำการเขย่าสารละลายผสมเป็นเวลา 5 นาที จนกระทั่งเลซิตินกระจายตัวสม่ำเสมอในสารละลาย ทำการเติม deuterated chloroform ปริมาตร 2 มิลลิลิตร ลงไปยังของผสมและนำสารละลายผสมดังกล่าวไปเขย่าให้เข้ากันเป็นเวลา 5 นาที สุดท้ายเติมสารละลาย $CsCO_3$/EDTA ความเข้มข้น 0.75 M pH 8.5 ปริมาตร 2 มิลลิลิตร และเขย่าสารละลายให้ผสมกัน จากนั้นนำสารละลายผสมไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 5000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที จะได้สารละลายแยกชั้นเป็น 2 ชั้น เก็บชั้นตัวทำละลายอินทรีย์ (ชั้นล่าง) เพื่อนำไปวิเคราะห์ด้วยเทคนิค ^{31}P-NMR ซ้ำจำนวน 3 ซ้ำ คำนวณหาค่า S/N ของสัญญาณของ triphenyl phosphate เมื่อกำหนดให้ค่า LOD คือความเข้มข้นของ triphenyl phosphate ที่ให้ค่า S/N มีค่าประมาณ 3 และ LOQ คือความเข้มข้นของ triphenyl phosphate ที่ให้ค่า S/N มีค่าประมาณ 10 โดยทำการเจือจางตัวอย่างด้วย deuterated chloroform และวิเคราะห์จนพบความเข้มข้นที่ให้ค่า S/N ดังกล่าว

6. การวิเคราะห์ปริมาณฟอสโฟลิปิดด้วยเทคนิค HPLC

6.1 การเตรียมสารละลายมาตรฐาน phosphatidylcholine (PC) สำหรับการสร้างกราฟมาตรฐาน

สารละลายมาตรฐาน stock solution ของ phosphatidylcholine (PC) เข้มข้น 5.00 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร สามารถเตรียมได้โดยชั่ง สารมาตรฐาน PC ปริมาณ 50 มิลลิกรัม ด้วยเครื่องชั่งทศนิยม 5 ตำแหน่ง ละลายด้วยเมทานอล และถ่ายใส่ขวดวัดปริมาตรขนาด 10 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรด้วยเมทานอล จากนั้นทำการเตรียมสารละลายมาตรฐานให้มีความเข้มข้นในช่วง 100-1250 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร จากสารละลายมาตรฐานเข้มข้น 5.0 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร โดยปรับปริมาตรด้วยเมทานอล

6.2 การเตรียมตัวอย่างเลซิติน

ชั่งตัวอย่างเลซิตินปริมาณ 10.00 มิลลิกรัม ด้วยเครื่องชั่งทศนิยม 5 ตำแหน่ง บันทึกน้ำหนัก จากนั้นทำการละลายด้วยเมทานอล 1 มิลลิลิตร ใช้เครื่องอัลตร้าโซนิกช่วยละลาย กรองสารละลายตัวอย่างด้วยไนลอนเมมเบรนความละเอียดรูพรุน 0.45 μm และนำไปทดสอบด้วย HPLC

6.3 สภาวะสำหรับการทดสอบ

สภาวะที่ใช้วิเคราะห์ปริมาณ PC ประยุกต์จากวิธีการทดสอบของ Jangle และคณะ (Jangle *et al*., 2013) โดยใช้เป็นระบบ reverse phase -HPLC โดยใช้ไอโซโพรพานอล : น้ำ : เมทานอล อัตราส่วน 70:22:8 %v/v เป็นตัวทำละลาย

เคลื่อนที่ ที่อัตราการไหล 1.0 มิลลิลิตรต่อนาที ปริมาตรสารตัวอย่างที่ฉีด 10 ไมโครลิตร ตรวจวัดที่ความยาวคลื่น 205 นาโนเมตร ระยะเวลาในการวิเคราะห์ 30 นาที

Results

1. ผลการวิเคราะห์ชนิดของฟอสโฟลิปิดด้วยเทคนิค ^{31}P-NMR

เมื่อนำตัวอย่างสารมาตรฐานเลซิตินจากถั่วเหลืองมาวิเคราะห์เพื่อศึกษาชนิดของฟอสโฟลิปิดด้วยเทคนิค ^{31}P-NMR ได้ผลการทดลองแสดงได้ดัง Figure 2 จาก ^{31}P-NMR สเปกตรัมพบว่าสารมาตรฐานเลซิตินประกอบด้วยฟอสโฟลิปิดจำนวน 10 ชนิด ได้แก่ phosphatidylcholine (PC), 1-lysophosphatidylcholine (1-LPC), phosphatidylinositol (PI), 2-lysophosphatidylcholine (2-LPC), lysophosphatidylinositol (LPI), phosphatidylethanolamine (PE), diphosphatidylglycerol (DPG), lysophosphatidylethanolamine (LPE), phosphatidylglycerol (PG) และ lysophosphatidic acid (LPA) ในขณะที่เมื่อทำการวิเคราะห์ตัวอย่างเลซิตินที่สกัดได้จากเมล็ดถั่วเหลืองที่มีจำหน่ายในท้องตลาดจำนวน 3 เครื่องหมายการค้าพบว่าได้ผลการทดสอบดัง Figure 3 โดยปรากฏว่าเลซิตินที่ทำการวิเคราะห์พบฟอสโฟลิปิดจำนวน 7 ชนิด เช่นเดียวกับสารมาตรฐานเลซิตินโดยไม่พบฟอสโฟลิปิดชนิด 1-LPC, 2-LPC และ LPE สำหรับตัวอย่างเลซิตินจากถั่วเหลืองกลุ่มที่ 3 ที่ทำการวิเคราะห์คือตัวอย่างเลซิตินชนิดแคปซูลที่เป็นอาหารเสริมที่จำหน่ายในท้องตลาดของประเทศไทยจำนวน 3 เครื่องหมายการค้าพบว่ามีองค์ประกอบของฟอสโฟลิปิดทั้งหมด 11 ชนิดโดยมีชนิดที่เพิ่มเติมมาจากสารมาตรฐานเลซิตินคือ Phosphatidylserine (PS) โดย ^{31}P-NMR สเปคตรัมของเลซิตินชนิดแคปซูลแสดงดัง Figure 4

การระบุตำแหน่งค่า ^{31}P-NMR chemical shift ที่สอดคล้องกับชนิดของฟอสโฟลิปิดที่เป็นองค์ประกอบในเลซิตินจากถั่วเหลืองในงานวิจัยนี้ดำเนินการโดยการศึกษางานวิจัยที่เกี่ยวข้องที่มีรายงานก่อนหน้านี้ที่มีการศึกษาชนิดของฟอสโฟลิปิดด้วยเทคนิค ^{31}P-NMR ในตัวอย่างที่มีความหลากหลายเช่นในตัวอย่างอาหาร เลซิตินจากพืชและสัตว์ชนิดต่างๆ (Glonek, 1998; Lanier *et al*., 2008; Monakhova & Diehl, 2015; Ahmmed *et al*., 2021) และการใช้สารมาตรฐานเป็นข้อมูลเปรียบเทียบ โดยข้อมูลชนิด ค่า chemical shift และน้ำหนักโมเลกุลของฟอสโฟลิปิดที่เป็นองค์ประกอบของเลซิตินทั้ง 11 ชนิดและสารประกอบออร์กาโนฟอสเฟตที่ใช้เป็นสารมาตรฐานอ้างอิง แสดงใน Table1 ซึ่งมีค่าที่สอดคล้องกับเอกสารอ้างอิง

2. สภาวะเครื่อง NMR สำหรับการทำปริมาณวิเคราะห์ด้วยเทคนิค NMR

การวิเคราะห์ฟอสโฟลิปิดด้วยเทคนิค ^{31}P-NMR ในงานวิจัยนี้ ได้ทำการประยุกต์ใช้พารามิเตอร์จากงานวิจัยของ Glonek (Glonek, 1998) และทำการปรับเปลี่ยนบางพารามิเตอร์ให้เหมาะสมกับตัวอย่างเลซิตินจากถั่วเหลืองในประเทศไทยเพื่อให้ได้ผลการวิเคราะห์ที่แม่นยำที่สุด โดยทำการวิเคราะห์ค่า relaxation time (T_1) ของสารประกอบฟอสเฟตที่เป็นองค์ประกอบในตัวอย่างที่ทำการวิเคราะห์ พบว่า triphenyl phosphate ซึ่งใช้เป็นสารมาตรฐานอ้างอิง ให้ค่า T_1 ที่มากที่สุดที่ 5.65 วินาที ดังนั้นจึงทำการกำหนดค่า D_1 โดยใช้ repetition time เท่ากับ 3 ให้มีค่าเท่ากับ 16.95 วินาที ($D_1 = 3T_1$) ในส่วนของ number of scan นั้นกำหนดให้มีค่าเท่ากับ 256 scan เพื่อให้ได้ค่า signal to noise ratio (S/N) ที่ดีเพียงพอในการนำพื้นที่

ใต้กราฟไปใช้คำนวนเชิงปริมาณวิเคราะห์ โดยพบว่าค่า S/N ของ triphenyl phosphate ซึ่งใช้เป็นสารมาตรฐานกำหนดปริมาณมีค่าอยู่ที่ประมาณ 3070 และค่า S/N ของฟอสโฟลิปิดที่ตรวจพบในปริมาณความเข้มข้นต่ำเช่น LPC LPI LPE และ PG มีค่าอยู่ระหว่าง 184 ถึง 275 โดย parameter อื่นๆ ที่ใช้ในการทดสอบดังแสดงใน Table 2

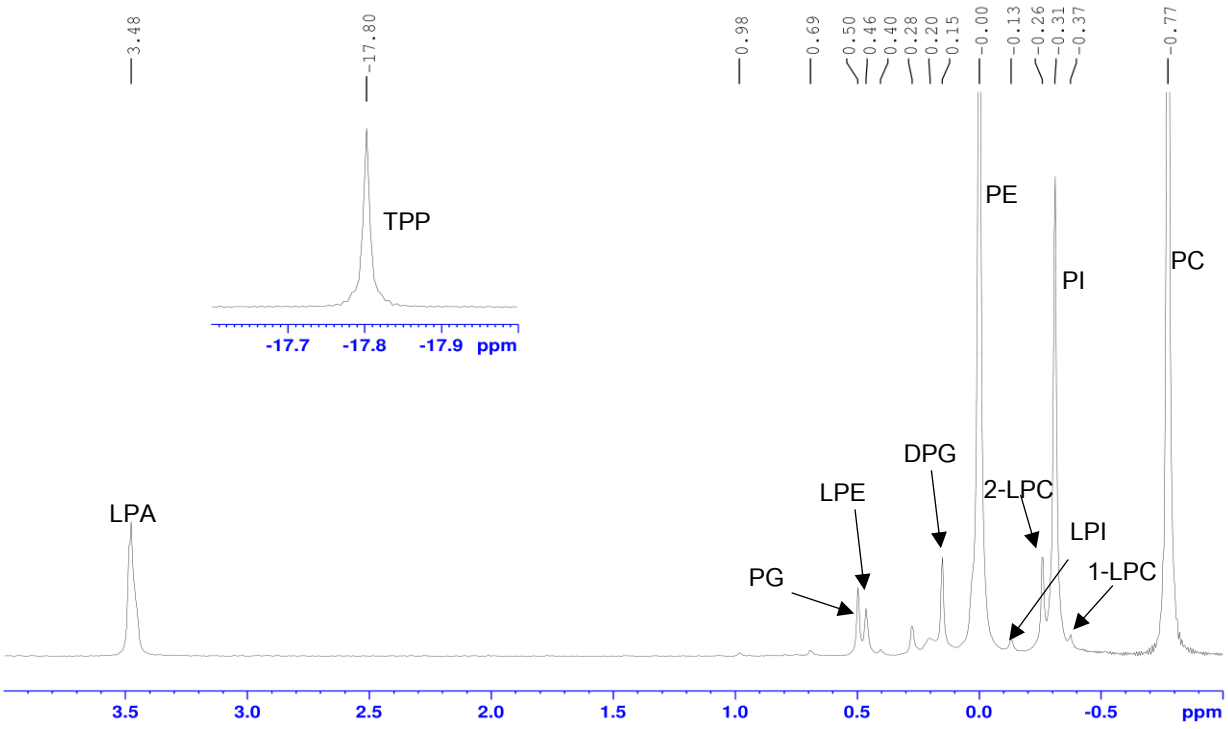

Figure 2 ^{31}P-NMR spectrum of standard soy lecithin with triphenyl phosphate (TPP) in $CDCl_3$

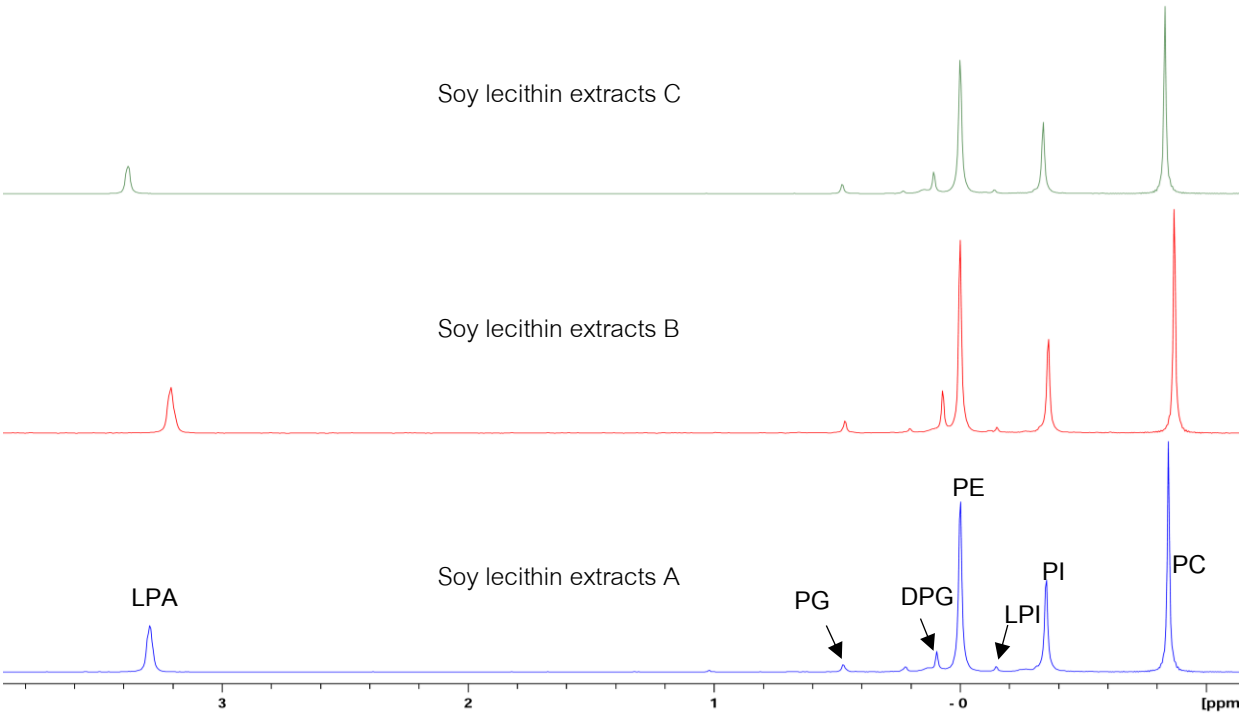

Figure 3 ^{31}P-NMR spectra of soy lecithin extracted from soybeans of three brands available in local markets of Chonburi, Thailand with triphenyl phosphate (TPP) in $CDCl_3$

Table 1 Chemical shift (ppm), molecular weight and number of ^{31}P atom of phospholipids in soy lecithin

Phospholipids	Molecular weight (g/mol)	Number of ^{31}P atom	Chemical shift (ppm) in this study	Chemical shift (ppm) from references
Phosphatidylcholine (PC)	770	1	-0.77	-0.77
1-Lysophosphatidylcholine (1-LPC)	515	1	-0.37	-0.40
Phosphatidylinositol (PI)	835	1	-0.31	-0.37
2-Lysophosphatidylcholine (2-LPC)	515	1	-0.26	-0.29
Lysophosphatidylinositol (LPI)	570	1	-0.13	-0.25
Phosphatidylethanolamine (PE)	725	1	0.00	0.00
Phosphatidylserine (PS)	797	1	0.03	-0.08
Diphosphatidylglycerol (DPG)	1450	2	0.15	0.18
Lysophosphatidylethanolamine (LPE)	470	1	0.46	0.46
Phosphatidylglycerol (PG)	758	1	0.50	0.48
Lysophosphatidic acid (LPA)	430	1	3.48	3.50
Triphenyl phosphate (TPP)	326.28	1	-17.80	-

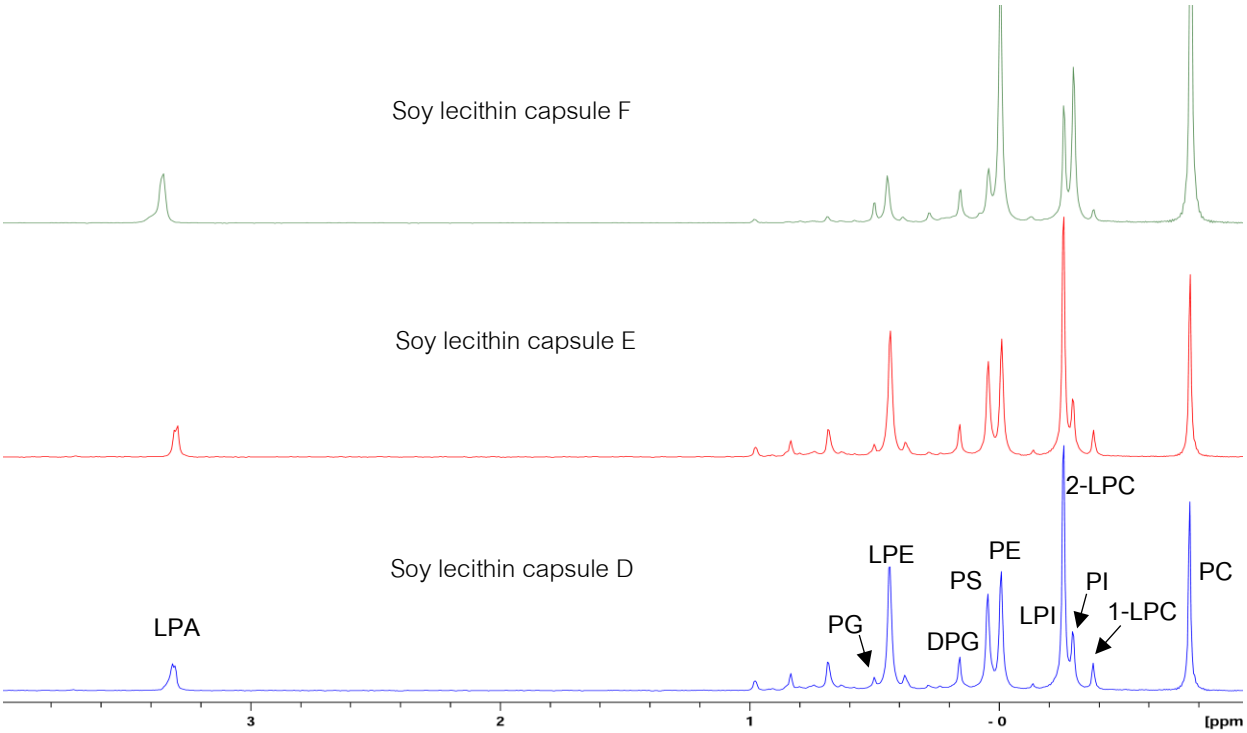

Figure 4 ^{31}P-NMR spectra of soy lecithin products (capsule) from soybeans of three brands available in local markets of Chonburi, Thailand with triphenyl phosphate (TPP) in $CDCl_3$

3. ผลการวิเคราะห์ปริมาณของฟอสโฟลิปิดด้วยเทคนิค ^{31}P-NMR ในตัวอย่างสารมาตรฐานเลซิตินจากถั่วเหลือง

ผลการศึกษาการวิเคราะห์สารมาตรฐานเลซิตินจากถั่วเหลืองด้วยเทคนิค ^{31}P-NMR พบว่าสเปกตรัมของฟอสโฟลิปิดที่เป็นองค์ประกอบในสารมาตรฐานเลซิตินที่ทำการทดสอบแสดงดัง Figure 2 นั้นสามารถนำมาคำนวณหาร้อยละองค์ประกอบของฟอสโฟลิปิดที่เป็นองค์ประกอบในเลซิตินจากถั่วเหลือง โดยใช้สมการที่ 1 พบว่าร้อยละองค์ประกอบ (%w/w) ของฟอสโฟลิปิดที่เป็นองค์ประกอบในสารมาตรฐานเลซิตินเรียงลำดับจากมากไปน้อยได้ดังนี้ PC > PE > PI > DPG > LPA > PG > 2-LPC > LPE > LPI > 1-LPC ตามลำดับ และมีร้อยละโดยรวมของฟอสโฟลิปิดทั้ง 10 ชนิด เท่ากับ 38.82 ± 1.53 โดยค่าพื้นที่ใต้กราฟ (peak area) และปริมาณของฟอสโฟลิปิดที่คำนวนได้แสดงดัง Table 3

Table 2 NMR parameter for determination of phospholipids in soy lecithin by ^{31}P-NMR

NMR instrument parameter	Value
NMR instrument	400 MHz
NMR probe head	BBFO CryoProbe
Observe nucleus	^{31}P
Pulse program	zgpg (pulse angle 90°)
Size of FID	35836
Solvents	Chloroform-D
Number of scans	256
Number of dummy scans	10
Spectral width	160 ppm
FID resolution	1.453380 Hz
Acquisition time	0.6880512 s
Receiver gain	203
Dwell time	19.20 μs
Pre-scan delay	18.00 μs
Probe temperature	298 K
Delay time	16.95 s
Transmitter frequency offset	1.00 ppm

Table 3 Concentration and peak area of phospholipids in standard soy lecithin determination by ^{31}P-NMR (N.D. = Not detected)

Phospholipids	Integral (peak area ± SD)	Relative phospholipid concentration (%w/w ± SD)
Phosphatidylcholine (PC)	179.54 ± 9.38	16.35 ± 0.47
1-Lysophosphatidylcholine (1-LPC)	0.39 ± 0.07	0.04 ± 0.01
Phosphatidylinositol (PI)	64.01 ± 4.72	3.90 ± 0.21
2-lysophosphatidylcholine (2-LPC)	5.78 ± 0.45	0.35 ± 0.02
Lysophosphatidylinositol (LPI)	1.35 ± 0.26	0.09 ± 0.02
Phosphatidylethanolamine (PE)	141.24 ± 8.12	12.11 ± 0.45
Phosphatidylserine (PS)	N.D.	N.D.
Diphosphatidylglycerol (DPG)	9.61 ± 0.72	3.29 ± 0.18
Lysophosphatidylethanolamine (LPE)	2.76 ± 0.28	0.15 ± 0.01
Phosphatidylglycerol (PG)	6.24 ± 0.39	0.56 ± 0.02
Lysophosphatidic acid (LPA)	37.05 ± 2.21	1.88 ± 0.07
Triphenyl phosphate (TPP)	100.00	-

4. ผลการวิเคราะห์ปริมาณของฟอสโฟลิปิดในเลซิตินจากถั่วเหลืองด้วยเทคนิค HPLC

เพื่อให้ได้ผลการวิเคราะห์ปริมาณฟอสโฟลิปิดในเลซิตินจากถั่วเหลืองที่มีความน่าเชื่อถือจึงจำเป็นต้องทำการทดสอบเปรียบเทียบกับวิธีมาตรฐานที่มีการรายงานมาก่อนหน้านี้ โดยในงานวิจัยนี้ได้เลือกใช้วิธีการวิเคราะห์ฟอสโฟลิปิดในเลซิตินจากถั่วเหลืองด้วยเทคนิค HPLC ตามรายงานวิจัยของ Jangle และคณะ (Jangle *et al*., 2013) แต่อย่างไรก็ตามผู้วิจัยสามารถทำการเลือกวิเคราะห์ปริมาณ PC ในตัวอย่างเลซิตินเพียงชนิดเดียวเนื่องจากข้อจำกัดที่สามารถหาซื้อสารมาตรฐาน PC ที่สกัดจากถั่วเหลืองได้เพียงชนิดเดียวอีกทั้งสารมาตรฐานดังกล่าวยังมีราคาที่สูง โดยทำการวิเคราะห์ปริมาณ PC ในเลซิตินจากถั่วเหลืองที่แตกต่างกัน 3 กลุ่มคือเลซิตินที่สกัดจากเมล็ดถั่วเหลืองสำหรับบริโภค (soy lecithin extracts) สารมาตรฐานเลซิติน (standard soy lecithin) และเลซิตินอาหารเสริมชนิดแคปซูล (soy lecithin capsule) ที่มีจำหน่ายในท้องตลาด โดยตัวอย่างโครมาโทแกรมของการวิเคราะห์เลซิตินแสดงดัง Figure 5 ผลการวิเคราะห์พบว่าสัญญาณของ PC จะปรากฏที่ค่า retention time เท่ากับ 14.5 นาที ซึ่งเมื่อทำการคำนวนปริมาณ PC ที่พบในตัวอย่างแต่ละชนิดให้ผลการวิเคราะห์เปรียบกับผลการวิเคราะห์ด้วยเทคนิค ^{31}P-NMR ดังแสดงใน Table 4

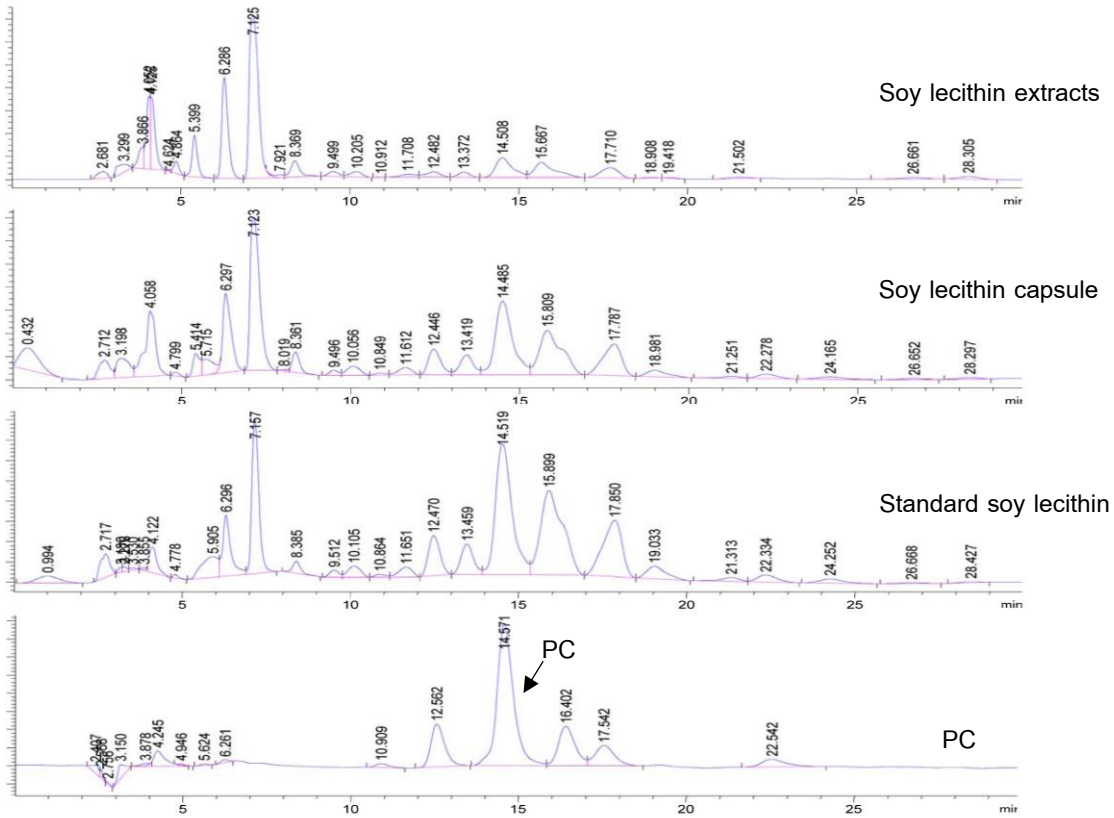

Figure 5 HPLC chromatogram of PC, stand lecithin, lecithin capsule and lecithin extracts

ผลการวิเคราะห์ปริมาณ PC ด้วยเทคนิค HPLC พบว่าในตัวอย่างสารมาตรฐานเลซิตินจากถั่วเหลือง เลซิตินจากการสกัดเมล็ดถั่วเหลืองและเลซิตินชนิดแคปซูล มีองค์ประกอบของ PC อยู่ในช่วง 3.68 ถึง 14.30 %w/w ซึ่งผลการทดสอบดังกล่าวให้ค่าปริมาณ PC ที่ตรวจพบมีค่าใกล้เคียงกับการทดสอบด้วยเทคนิค ^{31}P-NMR เป็นที่น่าสังเกตคือผลิตภัณฑ์เลซิตินชนิดแคปซูลจำนวน 2 เครื่องหมายการค้าพบปริมาณ PC ในปริมาณต่ำในช่วง 3.68 ถึง 4.62 %w/w

Table 4 Comparison of PC phospholipid concentration determination by HPLC and ^{31}P-NMR methods

Samples	Concentration of PC (% w/w)	
	^{31}P-NMR	HPLC
Standard soy lecithin	16.35 ± 0.47	14.30 ± 0.43
Soy lecithin extracts A	10.24 ± 0.69	10.27 ± 0.38
Soy lecithin extracts B	8.69 ± 0.30	9.02 ± 0.97
Soy lecithin extracts C	3.09 ± 0.09	3.85 ± 0.12
Soy lecithin capsule D	5.21 ± 0.16	4.62 ± 0.16
Soy lecithin capsule E	3.20 ± 0.17	3.68 ± 0.18
Soy lecithin capsule F	10.69 ± 0.11	10.30 ± 0.32

5. การศึกษาค่าทางการวิเคราะห์

5.1 ผลการศึกษาหาค่าขีดจำกัดการตรวจวัด (Limit of detection, LOD) และขีดจำกัดการตรวจวัดเชิงปริมาณ (Limit of quantitation, LOQ)

การวิเคราะห์หาค่าขีดจำกัดในการตรวจวัดฟอสโฟลิปิด สามารถหาได้จากการนำข้อมูลการวิเคราะห์ด้วยเทคนิค ^{31}P-NMR โดยคำนวณหาค่า S/N ของสัญญาณของ triphenyl phosphate ที่ตำแหน่งค่า chemical shift -17.8 ppm เมื่อกำหนดให้ค่า LOD คือความเข้มข้นของ triphenyl phosphate ที่ให้ค่า S/N มีค่าประมาณ 3 และ LOQ คือความเข้มข้นของ triphenyl phosphate ที่ให้ค่า S/N มีค่าประมาณ 10 ซึ่งจากผลการวิเคราะห์พบว่าที่ความเข้มข้นของ triphenyl phosphate เท่ากับ 10 มิลลิกรัมต่อลิตร (10 ppm) จะให้ค่า S/N เฉลี่ยอยู่ที่ 3.83 ± 0.18 และที่ความเข้มข้น 20 มิลลิกรัมต่อลิตร (20 ppm) จะให้ค่า S/N เฉลี่ยอยู่ที่ 13.23 ± 0.31 จึงสามารถสรุปได้ว่าค่าขีดจำกัดการตรวจวัดฟอสโฟลิปิดด้วยเทคนิค ^{31}P-NMR มีค่าเท่ากับ 10 ppm และค่าขีดจำกัดการตรวจวัดเชิงปริมาณมีค่าเท่ากับ 20 ppm

5.2 ผลการวิเคราะห์ปริมาณของฟอสโฟลิปิดด้วยเทคนิค ^{31}P-NMR ในตัวอย่างเลซิตินจากถั่วเหลือง

จากการศึกษาการวิเคราะห์ปริมาณของฟอสโฟลิปิดที่เป็นองค์ประกอบในเลซิตินที่ทำการสกัดจากเมล็ดถั่วเหลืองที่จำหน่ายในท้องตลาดของประเทศไทยจำนวน 3 เครื่องหมายการค้าดังแสดงใน Table 5 พบว่าเลซิตินที่สกัดได้จากเมล็ดถั่วเหลืองทั้ง 3 เครื่องหมายการค้า (soy lecithin extracts A-C) มีปริมาณ PC สูงที่สุด รองลงมาเป็น PE และ PI และผลการทดสอบไม่พบ 1-LPC, 2-LPC, PS และ LPE ในส่วนของผลิตภัณฑ์เลซิตินจากถั่วเหลืองชนิดแคปซูลที่จำหน่ายในท้องตลาด

จำนวน 3 เครื่องหมายการค้า (soy lecithin capsule D-F) ในรูปของอาหารเสริมจากการทดลองจะเห็นได้ว่าเลซิตินทั้ง 3 เครื่องหมายการค้ามีฟอสโฟลิปิดที่เป็นองค์ประกอบเหมือนกับสารมาตรฐานเลซิตินจากถั่วเหลืองดังแสดงใน Figure 2 โดยพบว่าเลซิตินแคปซูลเครื่องหมายการค้า F มีปริมาณ PC สูงกว่าเครื่องหมายการค้า D และ E อย่างมีนัยสำคัญ สำหรับเลซิตินกลุ่มสุดท้ายที่ทำการทดสอบหาปริมาณและชนิดของฟอสโฟลิปิดด้วยเทคนิค ^{31}P-NMR คือเลซิตินที่ผ่านกระบวนการปรับปรุงคุณภาพทางเคมีจำนวน 3 ตัวอย่าง (processed soy lecithin 1-3) พบว่าเลซิตินในกลุ่มดังกล่าวมีปริมาณ 2-LPC สูงที่สุดในช่วง 3.60 ถึง 5.26 % w/w รองลงมาเป็น PS และ LPE ในปริมาณ 1.71 ถึง 3.02 %w/w ในขณะที่ปริมาณ PC มีน้อยกว่าเมื่อเปรียบเทียบกับเลซิตินในกลุ่มอื่นๆ

Discussion

การศึกษาพัฒนาวิธีการตรวจวัดชนิดและปริมาณฟอสโฟลิปิดที่เป็นองค์ประกอบในเลซิตินจากถั่วเหลือง โดยใช้เทคนิค ^{31}P-NMR ในงานวิจัยนี้ถูกพัฒนาขึ้นมาเพื่อลดข้อจำกัดของวิธีการดั้งเดิมเช่น HPLC TLC และ FTIR ที่จำเป็นต้องพึ่งพาสารมาตรฐานฟอสโฟลิปิดแต่ละชนิดที่ต้องการวิเคราะห์ การเกิดของเสียปริมาณมาก และใช้เวลาในการวิเคราะห์ที่นาน การศึกษาครั้งนี้อาศัยข้อมูลค่า chemical shift และน้ำหนักโมเลกุลของสารประกอบฟอสโฟลิปิดที่มีรายงานในงานวิจัยก่อนหน้านี้ โดยในงานวิจัยนี้ได้ทำการศึกษาวิธีการวิเคราะห์ในกลุ่มตัวอย่าง 4 ประเภทคือสารมาตรฐานเลซิตินจากถั่วเหลือง เลซิตินที่สกัดจากเมล็ดถั่วเหลืองกะเทาะเปลือก เลซิตินจากถั่วเหลืองชนิดแคปซูล และเลซิตินจากถั่วเหลืองที่ทำการปรับเปลี่ยนโครงสร้างทางเคมี ผลการวิเคราะห์เอกลักษณ์ของสัญญาณ ^{31}P-NMR พบว่าในตัวอย่างเลซิตินจากถั่วเหลืองที่ทำการศึกษาทั้งหมดพบฟอสโฟลิปิดที่เป็นองค์ประกอบทั้งสิ้น 11 ชนิดคือ phosphatidylcholine (PC), 1-lysophosphatidylcholine (1-LPC), phosphatidylinositol (PI), 2-lysophos phatidylcholine (2-LPC), lysophosphatidylinositol (LPI), phosphatidylethanolamine (PE), diphosphatidylglycerol (DPG), lysophosphatidylethanolamine (LPE), phosphatidylglycerol (PG), phosphatidylserine (PS) และ lysophosphatidic acid (LPA) โดยมีชนิดและปริมาณที่แตกต่างกันแบ่งออกเป็นแต่ละกลุ่มคือ สารมาตรฐานเลซิตินจากถั่วเหลืองพบฟอสโฟลิปิดทั้งสิ้น 10 ชนิด เลซิตินที่สกัดจากเมล็ดถั่วเหลืองกะเทาะเปลือกพบฟอสโฟลิปิดทั้งสิ้น 7 ชนิด เลซิตินชนิดแคปซูลที่จำหน่ายในรูปแบบอาหารเสริมพบฟอสโฟลิปิดทั้งสิ้น 11 ชนิด และเลซิตินที่ผ่านกระบวณการปรับปรุงทางเคมีพบฟอสโฟลิปิดทั้งสิ้น 11 ชนิด ซึ่งฟอสโฟลิปิดแต่ละชนิดปรากฏสัญญาณ ^{31}P-NMR ที่ค่า chemical shift แต่กต่างกันอย่างชัดเจนในช่วง -0.77 ถึง 3.8 ppm อันเป็นผลมาจากการที่โครงสร้างทางเคมีของฟอสโฟลิปิดที่มีหมู่อัลคิลสายยาวที่แตกต่างกันเป็นปัจจัยให้ความหนาแน่นของอิเล็กตรอนที่หมู่ฟอสเฟตมีความแตกต่างกันส่งผลโดยตรงต่อค่า chemical shift ของอะตอมฟอสฟอรัส ผลการทดสอบยังแสดงให้เห็นว่าในผลิตภัณฑ์เลซิตินจากถั่วเหลืองที่ไม่ได้ผ่านการปรับปรุงคุณภาพด้วยกระบวนการทางเคมีจะมีปริมาณ PC สูงกว่าฟอสโฟลิปิดชนิดอื่นๆ เสมอ รองลงมาคือ PE และ PI ส่วนเลซิตินที่ผ่านกระบวณการปรับปรุงคุณภาพจะมีการเปลี่ยนแปลงปริมาณของ PC เปลี่ยนไปเป็น 2-LPC เพิ่มมากขึ้น

BSJ
BURAPHA SCIENCE JOURNAL
ISSN 2985-0983 (online)
วารสารวิทยาศาสตร์บูรพา ปีที่ 30 (ฉบับที่ 2) พฤษภาคม – สิงหาคม พ.ศ. 2568
BURAPHA SCIENCE JOURNAL Volume 30 (No.2) May – August 2025 บทความวิจัย

Table 5 Phospholipids concentration determination by ^{31}P-NMR method (N.D. = not detected)

Samples	Phospholipids concentration (% w/w)										
	PC	1-LPC	PI	2-LPC	LPI	PE	PS	DPG	LPE	PG	LPA
Soy lecithin extracts A	10.24 ± 0.69	N.D.	2.09 ± 0.02	N.D.	0.05 ± 0.01	3.51 ± 0.07	N.D.	2.11 ± 0.25	N.D.	0.48 ± 0.07	0.53 ± 0.02
Soy lecithin extracts B	8.69 ± 0.30	N.D.	2.30 ± 0.75	N.D.	0.07 ± 0.03	7.62 ± 0.05	N.D.	2.14 ± 0.70	N.D.	0.46 ± 0.07	0.86 ± 0.59
Soy lecithin extracts C	3.09 ± 0.09	N.D.	1.07 ± 0.03	N.D.	0.04 ± 0.00	2.73 ± 0.06	N.D.	1.67 ± 0.01	N.D.	0.26 ± 0.13	0.76 ± 0.00
Soy lecithin capsule D	5.21 ± 0.16	0.53 ± 0.05	0.56 ± 0.03	3.38 ± 0.03	0.06 ± 0.01	3.04 ± 0.07	2.53 ± 1.07	2.11 ± 0.69	2.41 ± 0.05	0.12 ± 0.08	0.47 ± 0.00
Soy lecithin capsule E	3.20 ± 0.17	0.42 ± 0.02	0.29 ± 0.01	2.34 ± 0.10	0.04 ± 0.00	1.78 ± 0.10	1.38 ± 0.08	1.98 ± 0.15	1.70 ± 0.07	0.11 ± 0.01	0.55 ± 0.03
Soy lecithin capsule F	10.69 ± 0.11	0.21 ± 0.01	1.84 ± 0.10	1.17 ± 0.06	0.01 ± 0.00	5.35 ± 0.11	0.67 ± 0.02	1.96 ± 0.67	0.71 ± 0.04	0.32 ± 0.02	1.10 ± 0.23
Processed soy lecithin 1	1.33 ± 0.10	0.67 ± 0.00	1.01 ± 0.08	3.62 ± 0.17	0.03 ± 0.01	0.25 ± 0.01	1.98 ± 0.09	0.37 ± 0.16	1.71 ± 0.04	0.05 ± 0.01	0.22 ± 0.01
Processed soy lecithin 2	2.87 ± 0.07	0.62 ± 0.04	0.66 ± 0.02	3.60 ± 0.11	0.07 ± 0.01	1.18 ± 0.06	2.66 ± 0.07	1.02 ± 0.08	2.23 ± 0.04	0.08 ± 0.05	0.56 ± 0.03
Processed soy lecithin 3	1.98 ± 0.04	0.76 ± 0.01	1.32 ± 0.03	5.26 ± 0.05	0.07 ± 0.01	0.50 ± 0.02	3.02 ± 0.01	0.79 ± 0.06	2.46 ± 0.06	0.06 ± 0.00	0.32 ± 0.01

เมื่อศึกษาค่า relaxation time (T_1) ที่เหมาะสมของอะตอม ^{31}P ในโครงสร้างฟอสโฟลิปิด พบว่าฟอสโฟลิปิดที่เป็นองค์ประกอบในเลซิตินจากถั่วเหลืองจะมีค่า T_1 ของอะตอมฟอสฟอรัสอยู่ในค่าไม่เกิน 2 วินาที ซึ่งสอดคล้องกับผลการศึกษาของ Kato และคณะ (Kato *et al*., 2018) อย่างไรก็ตามสำหรับสารมาตรฐานอ้างอิง triphenyl phosphate ที่ใช้เป็นสารอ้างอิงในการคำนวนหาปริมาณฟอสโฟลิปิด พบว่าให้ค่า T_1 อยู่ที่ 5.65 วินาที ซึ่งเป็นค่าที่สูงที่สุดครอบคลุม T_1 ของฟอสโฟลิปิดชนิดอื่นๆ ดังนั้นจึงเลือกใช้ค่า T_1 ดังกล่าวมากำหนดค่า relaxation delay (D_1) โดยเลือกใช้เป็นสามเท่าของค่า T_1 เพื่อไม่ให้ใช้เวลาในการวิเคราะห์มากเกินไป (โดยปกติจะกำหนดค่า D_1 อยู่ในช่วง 3 ถึง 7 เท่าของค่า T_1) และกำหนดให้ค่า number of scan มีค่าเท่ากับ 256 เมื่อกำหนดค่า parameter ที่ทำการทดสอบดัง Table 2 แล้ว จะใช้เวลาทดสอบหาปริมาณฟอสโฟลิปิดต่อหนึ่งตัวอย่างที่ประมาณ 46 นาที เมื่อทำการศึกษาค่าทางการวิเคราะห์คือขีดจำกัดการตรวจวัด (LOD) และขีดจำกัดการตรวจวัดเชิงปริมาณ (LOQ) ด้วยเทคนิค ^{31}P-NMR โดยอ้างอิงทฤษฎีค่า signal to noise ratio (S/N) 3 เท่า และ 10 เท่า พบว่าตัวอย่างสารมาตรฐานอ้างอิง triphenyl phosphate ที่เตรียมให้สภาวะการทดสอบจริง (real sample matrix) ซึ่งปรากฏพีคที่ค่า chemical shift -17.8 ppm จะให้ค่า LOD ที่ความเข้มข้นของ triphenyl phosphate เท่ากับ 0.01 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และ LOQ เท่ากับ 0.02 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร โดยให้ S/N เท่ากับ 3.83 ± 0.18 และ 13.23 ± 0.31 ตามลำดับ ในส่วนของการวิเคราะห์ปริมาณฟอสโฟลิปิดในตัวอย่างเลซิตินจากถั่วเหลืองด้วยวิธี HPLC เพื่อเป็นการเปรียบเทียบผลการทดลองกับวิธี ^{31}P-NMR นั้น ในการศึกษาได้ทำการวิเคราะห์ปริมาณ PC เพื่อเป็นตัวแทนฟอสโฟลิปิดที่ทำการทดสอบ โดยผลการทดสอบแสดงให้เห็นว่าปริมาณ PC ที่ตรวจพบจากทั้งสองวิธีไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ จึงเป็นการยืนยันได้ว่าเทคนิค ^{31}P-NMR นั้นสามารถนำมาใช้เป็นวิธีการตรวจวัดปริมาณฟอสโฟลิปิดในตัวอย่างเลซิตินจากถั่วเหลืองได้อย่างมีประสิทธิภาพ

Conclusions

งานวิจัยนี้มีประสบความสำเร็จในการพัฒนาและประเมินประสิทธิภาพของเทคนิค ^{31}P-NMR สำหรับการวิเคราะห์ชนิดและปริมาณของฟอสโฟลิพิดที่เป็นองค์ประกอบในเลซิตินจากถั่วเหลือง โดยมุ่งลดข้อจำกัดของวิธีวิเคราะห์แบบดั้งเดิม อาทิเช่น HPLC, TLC และ FTIR ซึ่งมีข้อจำกัดด้านความต้องการใช้สารมาตรฐานเฉพาะชนิด ใช้ระยะเวลาในการวิเคราะห์นานและก่อให้เกิดของเสียในปริมาณมาก ผลการวิเคราะห์แสดงให้เห็นว่าตำแหน่งสัญญาณ (chemical shift) ของฟอสโฟลิปิดแต่ละชนิดจากกลุ่มตัวอย่าง 4 ประเภท มีความเหมือนกันและแยกออกจากกันอย่างชัดเจนในช่วง -0.77 ถึง 3.80 ppm เหมาะสมที่จะนำมาวิเคราะห์เชิงคุณภาพและปริมาณ อันเนื่องมาจากความแตกต่างของโครงสร้างเคมีของฟอสโฟลิปิดดังกล่าว ผลการศึกษายังแสดงให้เห็นว่าการวิเคราะห์ด้วยเทคนิค ^{31}P-NMR สามารถวิเคราะห์ชนิดและปริมาณฟอสโฟลิปิดจากถั่วเหลืองได้ถึง 11 ชนิดในการทดสอบเพียงครั้งเดียวและใช้เวลาทดสอบเพียง 46 นาที ส่งผลให้สามารถลดเวลาวิเคราะห์ของเสียที่เกิดขึ้น และไม่ต้องพึ่งพาสารมาตรฐานตามชนิดของฟอสโฟลิปิดที่ต้องการวิเคราะห์ และที่สำคัญให้ค่าขีดจำกัดการตรวจวัดต่ำถึง 10 ppm

Acknowledgments

งานวิจัยนี้ได้รับการสนับสนุนจากทุนอุดหนุนการวิจัย ประเภทเงินรายได้ส่วนงาน สำหรับนักวิจัยรุ่นใหม่ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา ประจำปีงบประมาณ พ.ศ. 2568 เลขที่สัญญา YS01/2568 และได้รับการสนับสนุนการใช้เครื่องมือวิทยาศาสตร์จากหน่วยบริการนวัตกรรมทางวิทยาศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา (SIF-IN-59400089 และ SIF-IN-67300028)

References

Ahmmed, M. K., Carne, A., Stewart, I., Tian., H. S., & Ahmed Bekhit, A. E. (2021). Phosphorus-31 nuclear magnetic resonance (^{31}P NMR) for quantitative measurements of phospholipids derived from natural products: Effect of analysis conditions. *LWT-Food Science and Technology, 142*, 110991. 1-8.

Bharti, K. S., & Roy, R. (2012). Quantitative ^{1}H NMR spectroscopy. *Trends in Analytical Chemistry, 35*, 5-26.

Blusztajn, J. K., Liscovitch, M., & Richardson, U. I. (1987). Synthesis of acetylcholine from choline derived from phosphatidylcholine in a human neuronal cell line. Proceedings of the National Academy of Sciences, *84*, 5474-5477.

Cooper, L., & Ainscough, T. (2016). FT-NIR analysis of lecithin. *Inform, 27*, 706–707.

Deranieh, R. M., Joshi, A. S., & Greenberg, M. L. (2013). Thin-Layer Chromatography of Phospholipids. *Methods in Molecular Biology, 1033*, 21-27.

Feringa, B. L., Smaardijk, A., & Wynberg, H. (1985). Simple ^{31}P NMR method for the determination of enantiomeric purity of alcohols not requiring chiral auxiliary compounds. *Journal of the American Chemical Society, 107*, 4798-4799.

Glonek, T. (1998). ^{31}P Nuclear magnetic resonance phospholipid analysis of anionic-enriched lecithins. *Journal of the American Oil Chemists' Society, 75*, 569-573.

Horn, M., Kadgien, M., Schnackerz, K., & Neubauer, S. (2000). ^{31}P-nuclear magnetic resonance spectroscopy of blood: a species comparison. *Journal of Cardiovascular Magnetic Resonance, 2*(2), 143.

Hurst, W. J., & Martin, R. A. (1984). The analysis of phospholipids in soy lecithin by HPLC. *Journal of the American Oil Chemists' Society, 61*(9), 1462–1463.

Jangle, R. D., Magar, V. P., & Thorat, B. N. (2013). Phosphatidylcholine and its purification from raw de-oiled soya lecithin. *Separation and Purification Technology, 102*, 187-195.

Kato, T., Nishimiya, M., Kawata, A., Kishida, K., Suzuri, K., Saito, M., Fujita, K., Igarashi, T., & Inagaki, M. (2018). Quantitative ^{31}P NMR method for individual and concomitant determination of phospholipid classes in polar lipid samples. *Journal of Oleo Science, 67*, 1279-1289.

Lanier, K. L., Moore, J. D., Smith, D., Li, S., Davis, B. ,& Shaw, W. A. (2008). *Quantitative phospholipid analysis of soy lecithin and krill lecithin by ^{31}P-NMR*. Avanti Polar Lipids, Inc.

Liu, L., Waters, D. L. E., Rose, T. J., Bao, J., & King, G. J. (2013). Phospholipids in rice: Significance in grain quality and health benefits: *A review. Food Chemistry, 139*, 1133–1145.

Liu, Y., Gao, L., & Yu, Z. (2025). Quantitative ^{31}P NMR spectroscopy: Principles, methodologies, and applications in phosphorus-containing compound analysis.

Meng, X., Pan, Q., Ding, Y., & Jiang, L. (2014). Rapid determination of phospholipid content of vegetable oils by FTIR spectroscopy combined with partial least-square regression. *Food Chemistry, 147,* 272-278.

Mertins, O., Sebben, M., Schneider, P. H., Pohlmann, A. R., & Silveira, N. P. (2008). Characterization of soybean phosphatidylcholine purity by ^{1}H and ^{31}P NMR. *Química Nova, 31*, 1856–1859.

Monakhova, Y. B., & Diehl, B. W. K. (2015). Quantitative analysis of sunflower lecithin adulteration with soy species by NMR spectroscopy and PLS regression. *Journal of the American Oil Chemists' Society, 93*, 27-36.

Scholfield, C. R. (1981). Composition of soybean lecithin. *Journal of the American Oil Chemists' Society, 58*(10), 889–892. *Applied Sciences, 15*, 323.

Sousa, R. S., Nogueira, A. O. M., Marques, V. G., Clementin, R. M., & Lima, V. R. (2013). Effects of α-eleostearic acid on asolectin liposomes dynamics: Relevance to its antioxidant activity. *Bioorganic Chemistry, 51*, 8-15.

Wu, Yingzi. (2002). *Soybean lecithin composition, fractionation, and functionality*. Iowa State University.

Zheng, A., Liu, S. B, & Deng, F. (2017). ^{31}P NMR chemical shifts of phosphorus probes as reliable and practical acidity scales for solid and liquid catalysts. *Chemical Reviews, 117*, 12475-12531.