บทที่ 4
ผลการวิจัย

ส่วนที่ 1 การวิเคราะห์หาปริมาณ อัลลิอินในกระเทียมโดยเทคนิคทีแอลซี-เดนซิโตเมตรี

1.1 การพัฒนาระบบตัวทำละลายของวัฏภาคเคลื่อนที่สำหรับการแยกสารด้วยวิธีทางโครมาโตกราฟีฉาบบาง (Thin Layer Chromatography, TLC)

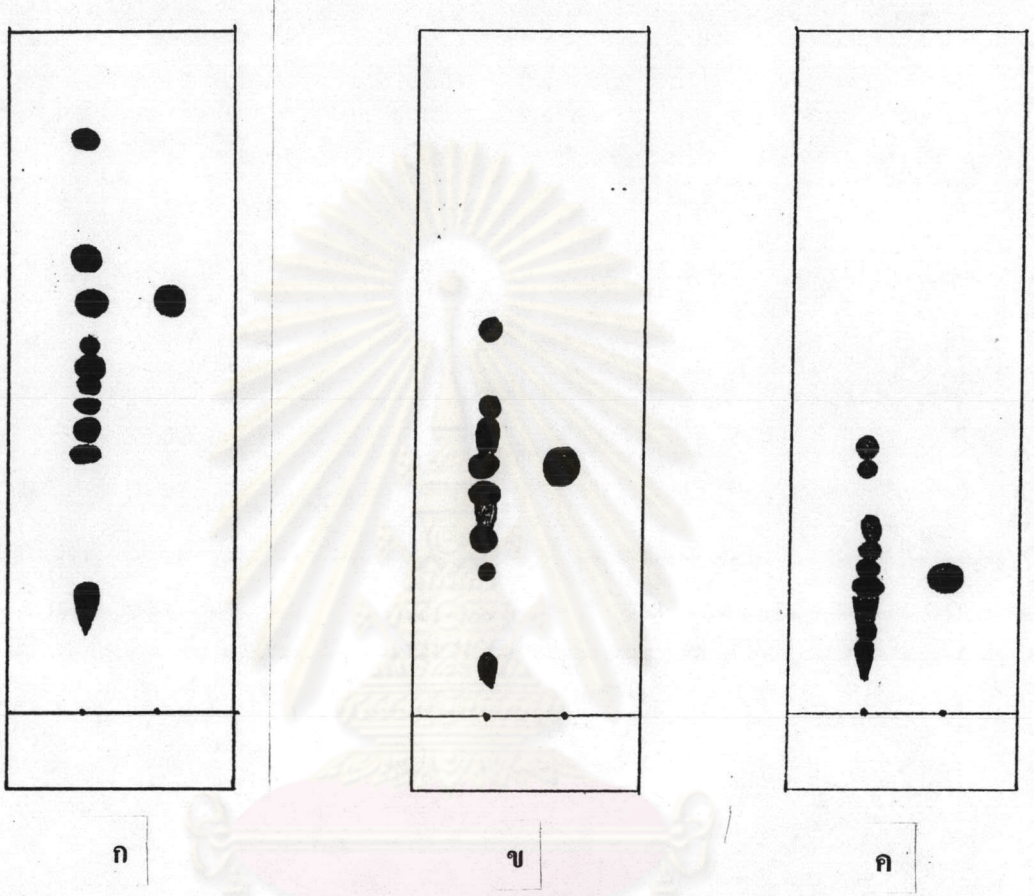
จากการค้นคว้ารายงานที่ตีพิมพ์ในวารสารต่างๆพบว่ามีรายงานน้อยมากที่กล่าวถึงสภาวะที่ใช้ในการแยกสารสกัดหยาบของกระเทียม โดยใช้เทคนิคทางโครมาโทกราฟีฉาบบาง (Wagner *et al.* 1984, Curtz ,1993) โดยการศึกษาเหล่านั้นส่วนใหญ่เป็นการศึกษาในเชิงคุณภาพ (Qualitative) เพื่อดูถึงองค์ประกอบต่างๆในสารสกัดนั้น แต่ในการศึกษาในเชิงปริมาณ (Quantitatvie) เพื่อหาปริมาณของสารใดสารหนึ่ง ในสารสกัดกระเทียม ด้วยเทคนิคการแยกทาง โครมาโทกราฟีฉาบบาง นั้น ยังไม่มีรายงานไว้ ดังนั้นในการศึกษาครั้งนี้ จึงทำการรวบรวมข้อมูลที่เกี่ยวกับระบบตัวทำละลายของวัฏภาคเคลื่อนที่ ที่มีรายงานไว้ (Wagner *et al.* 1984, Curtze, 1993) เพื่อเลือกสรรระบบตัวทำละลายที่สามารถแยกสารอัลลิอินออกจากสารอื่นๆได้ดี ที่เหมาะสมที่จะนำมาวิเคราะห์ด้วยเทคนิค ทีแอลซี-เดนซิโตเมตรี ต่อไป ระบบตัวทำละลายที่เลือกนำมาทำการทดลองในการศึกษานี้ได้แสดงรายละเอียดเกี่ยวกับส่วนประกอบของระบบตัวทำละลายของวัฏภาคเคลื่อนที่ พร้อมอัตราส่วน วัฏภาคคงที่ (Stationary phase) และค่า Rf value ดังในตารางที่ 11

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 11 แสดงรายละเอียดเกี่ยวกับส่วนประกอบของระบบตัวทำละลายของวัฏภาคเคลื่อนที่ (mobile phase) พร้อมอัตราส่วน วัฏภาคคงที่ (Stationary phase) และค่า Rf value ของสารอัลลิอิน ในแต่ละระบบ

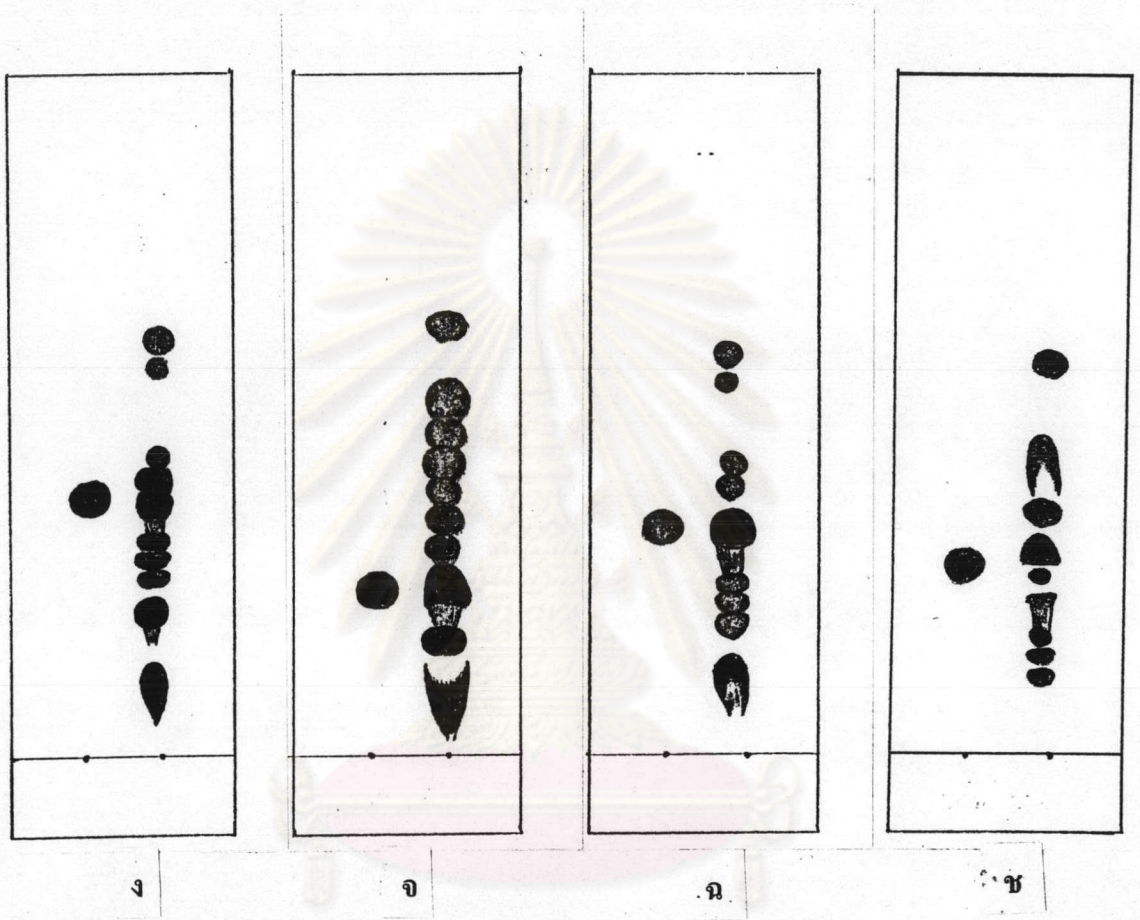
วัฏภาคเคลื่อนที่ (Mobile Phase)	อัตราส่วน (Ratios)	วัฏภาคคงที่ (Stationary Phase)	ค่า Rf ของอัลลิอิน (Rf values of Alliin)	เอกสารอ้างอิง (Reference)
n-BuOH: acetone: 98%HOAc:H_2O	35:35:7:23	Silica gel 60 F_{254}	~0.6	Curtze., 1993
	35:35:10:20	Silica gel 60 F_{254}	~0.48	
n-BuOH: 98%HOAc:H_2O (ใช้ส่วนบน)	50:10:40	Silica gel 60 F_{254}	~0.30	Wagner., *et al.*, 1984
n-BuOH:MeOH 98%HOAc:H_2O	40:10:10:10	Silica gel 60 F_{254}	~0.42	Muller and Ruhnke, 1993
		Cellulose	~0.33	
n-BuOH:MeOH 98%HOAc:H_2O	30:10:10:10	Silica gel 60 F_{254}	~0.35	Wagner., *et al.*, 1984
		Cellulose	~0.36	

จากระบบตัวทำละลายที่ได้แสดงดังตารางที่ 11 และใช้การตรวจหาตำแหน่งของสารอัลลิอิน โดยใช้สารละลายนินไฮดริน พบว่าเมื่อทำการเปรียบเทียบระบบทั้งหมดจะได้ค่า Rf value ของสารอัลลิอิน อยู่ในช่วง 0.3-0.6 โดยพบว่าระบบตัวทำละลายที่ประกอบด้วย n-Butanol : Acetone : 98% Acetic acid : น้ำ ในอัตราส่วน 35:35:7:23 จะให้ค่า Rf value สูงสุดคือ 0.6 ซึ่งมีวัฏภาคคงที่เป็นซิลิการเจล 60 F_{254} และสามารถแยกสารอัลลิอินออกจากสารประกอบอื่นๆได้ดี ดังรูปที่ 17 และเหมาะสมในการนำไปวิเคราะห์เชิงปริมาณ (Quantitative) ด้วยวิธีทาง ทีแอลซี-เดนซิโตเมตรีต่อไป ดังนั้นในการศึกษาครั้งนี้ จึงเลือกใช้ระบบตัวทำละลายของวัฏภาคเคลื่อนที่นี้ตลอดการศึกษา ดังแสดงในรูปที่ 17



รูปที่ 17 ผลของระบบตัวทำละลายของวัฏภาคเคลื่อนที่ (mobile phase) ต่อการแยกของสารในกลุ่มกรดอะมิโนและเอมีน ในสารสกัดหยาบของกระเทียม สปอร์ตต่างๆที่ปรากฏบนแผ่น โครมาโทกราฟีฉาบบาง เป็นผลมาจากการพ่นด้วยสารละลาย ninihydrin โดยในทุกระบบจะมีการเปรียบเทียบตำแหน่งของสารมาตรฐานอัลลิอินทางขวามือของทุกแผ่น

Mobile Phase	Ratios	Stationary Phase	ภาพที่	Rf values of Alliin
n-BuOH: acetone: 98%HOAc:H_2O	35:35:7:23	Silica gel 60 F_{254}	ก	~0.6
	35:35:10:20	Silica gel 60 F_{254}	ข	~0.48
n-BuOH: 98%HOAc:H_2O (ใช้ส่วนบน)	50:10:40	Silica gel 60 F_{254}	ค	~0.30
n-BuOH:MeOH 98%HOAc:H_2O	40:10:10:10	Silica gel 60 F_{254}	ง	~0.42
		Cellulose	จ	~0.33
n-BuOH:n-PrOH 98%HOAc:H_2O	30:10:10:10	Silica gel 60 F_{254}	ฉ	~0.35
		Cellulose	ช	~0.36



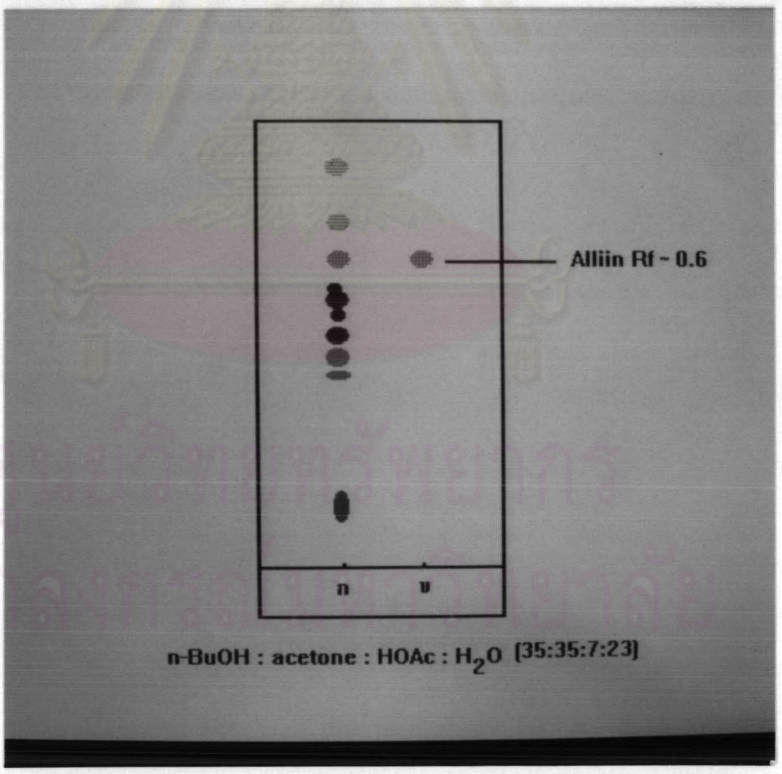
รูปที่ 17(ต่อ) ผลของระบบตัวทำละลายของวัฏภาคเคลื่อนที่ (mobile phase) ต่อการแยกของสารในกลุ่มกรดอะมิโนและเอมีน ในสารสกัดหยาบของกระเทียม สปอร์ตต่างๆที่ปรากฏบนแผ่น โครมาโทกราฟีฉาบบางเป็นผลมาจากการพ่นด้วยสารละลาย ninihydrin โดยในทุกระบบจะมีการเปรียบเทียบตำแหน่งของสารมาตรฐานอัลลิอินทางขวามือของทุกแผ่น

Mobile Phase	Ratios	Stationary Phase	ภาพที่	Rf values of Alliin
n-BuOH: acetone: 98%HOAc:H_2O	35:35:7:23	Silica gel 60 F_{254}	ก	~0.6
	35:35:10:20	Silica gel 60 F_{254}	ข	~0.48
n-BuOH: 98%HOAc:H_2O (ใช้ส่วนบน)	50:10:40	Silica gel 60 F_{254}	ค	~0.30
n-BuOH:MeOH 98%HOAc:H_2O	40:10:10:10	Silica gel 60 F_{254}	ง	~0.42
		Cellulose	จ	~0.33
n-BuOH:n-PrOH 98%HOAc:H_2O	30:10:10:10	Silica gel 60 F_{254}	ฉ	~0.35
		Cellulose	ช	~0.36

หอสมุดกลาง สถาบันวิทยบริการ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ในการทดลองนี้เนื่องจากอัลลิอิน เป็นสารไม่มีสี และไม่สามารถดูดกลืนคลื่นแสงหรือเรืองแสงได้ การตรวจสอบหาตำแหน่งของอัลลิอิน บนแผ่นโครมาโทกราฟีฉาบบางจึงจำเป็นต้องอาศัย การเกิดปฏิกริยาอนุพันธ์ เพื่อให้ได้สารที่มีสีเกิดขึ้น เพื่อง่ายในการตรวจหาค่าตำแหน่งของอัลลิอิน ในการศึกษาครั้งนี้จะใช้สารนินไฮดริน เป็นสารสำหรับการตรวจสอบ

ผลการทดลองหลังจากพ่นสารละลายนินไฮดริน ลงบนแผ่นโครมาโทกราฟีฉาบบาง แล้วนำไปอบที่อุณหภูมิ 100°ซ เป็นเวลา 5 นาที ตำแหน่งของสารอัลลิอิน จะปรากฏเป็นสีเหลืองน้ำตาล (Browish-yellow) เกิดขึ้น ซึ่งจะต่างจากตำแหน่งของสารอื่นๆที่ปรากฏเป็นสีม่วง หรือม่วงแดงเกิดขึ้น ซึ่งคาดว่าสารต่างๆเหล่านั้นน่าจะเป็นสารจำพวกกรดอะมิโนหรือสารพวกเอมีน ที่มีอยู่ในสารสกัดกระเทียม (รูปที่ 18)



รูปที่ 18 ภาพถ่ายของการตรวจหาตำแหน่งของสาร อัลลิอิน ในสารสกัดกระเทียมที่ผ่านกระบวนการแยก โดยใช้เทคนิคโครมาโทกราฟีฉาบบาง (Thin Layer Chromatography) โดยใช้สารละลายนินไฮดรินแล้วทำการเปรียบเทียบกับตำแหน่งของสารมาตรฐานอัลลิอิน

1.2 ความยาวคลื่น (λ_{max}) ที่เหมาะสมในการสร้างโครมาโทแกรมของสารอัลลิอิน

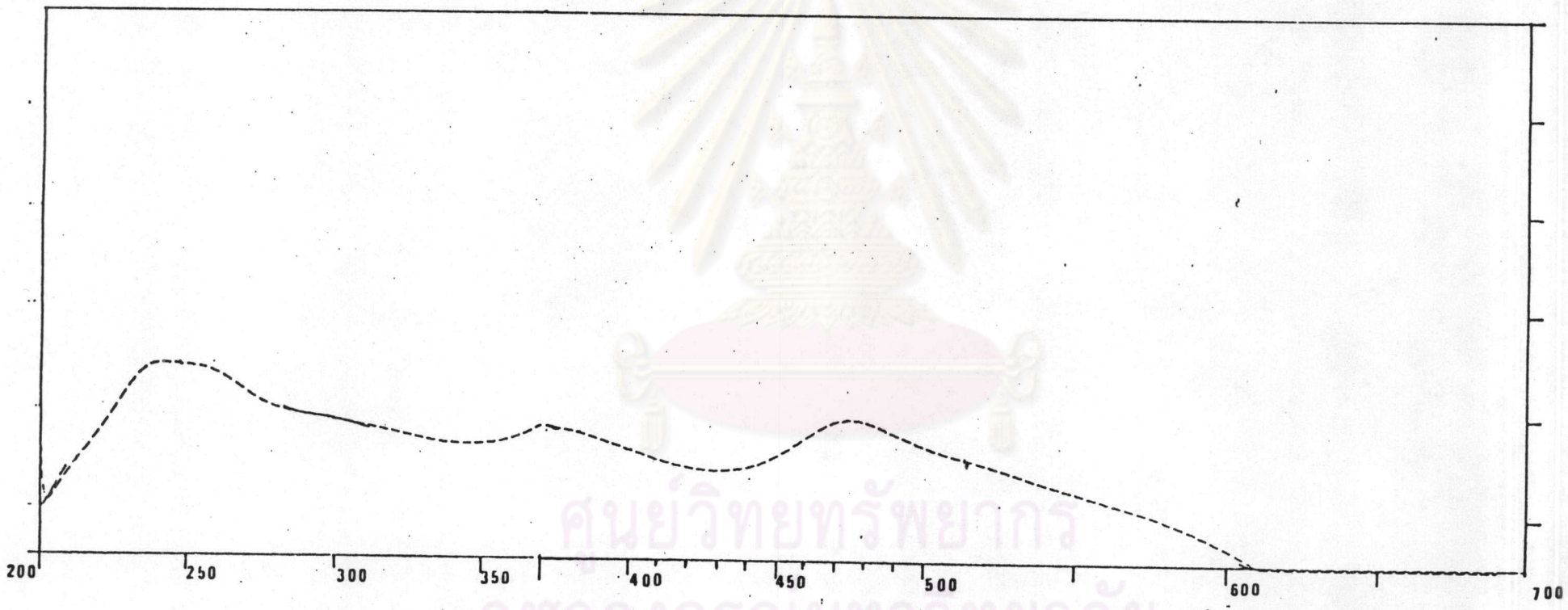
จากการเกิดปฏิกริยาอนุพันธ์หลังทำการแยกระหว่างสารอัลลิอินกับสารนินไฮดริน ซึ่งทำให้ได้อนุพันธ์ที่มีสีเกิดขึ้นแล้ว อนุพันธ์สารอัลลิอินที่เกิดขึ้นนี้จะมีความสามารถในการดูดกลืนแสงในความยาวคลื่นหนึ่งๆได้สูงสุด เนื่องจากในการศึกษาครั้งนี้เป็นการวิเคราะห์เชิงปริมาณ (Quantitative) ของสารอัลลิอิน โดยใช้เทคนิคทาง ทีแอลซี-เดนซิโตเมตรี ดังนั้นการหาความยาวคลื่นที่อนุพันธ์ของอัลลิอินสามารถดูดกลืนคลื่นแสงได้สูงสุด (λ_{max} of allin derivative) จึงมีความสำคัญมากสำหรับการหาปริมาณของอัลลิอิน

การหาความยาวคลื่น (λ_{max}) ของสารอัลลิอิน โดยใช้เครื่องมือ Dual-Wavelenght TLC-Scanner model CS-930 (Shimadsu) ได้ผลดังรูปที่ 19 จากสเปกตรัมที่ได้ซึ่งจะเห็นได้ว่า ในช่วงความยาวคลื่น 200-700 นาโนเมตร สารอนุพันธ์ของอัลลิอินกับนินไฮดรินสามารถดูดกลืนคลื่นแสงได้สูงสุดที่ 240 370 และ 475 นาโนเมตร แต่เนื่องจากที่ความยาวคลื่น 240 นาโนเมตร สามารถถูกรบกวนโดยสารหลายชนิด และที่ความยาวคลื่น 370 นาโนเมตร เป็นช่วงต่อระหว่างความยาวคลื่นอัลตราไวโอเลต (UV-light) กับช่วงคลื่นแสงที่มองเห็นได้ (Visible light) การศึกษานี้จึงเลือกใช้ความยาวคลื่นที่ 475 นาโนเมตร ตลอดการศึกษานี้

เมื่อใช้ความยาวคลื่นที่ 475 นาโนเมตร ทำการตรวจวัด (scan) ผ่านจุดต่างๆของสารสกัดหยาบกระเทียมที่ผ่านการแยกด้วยเทคนิคโครมาโทกราฟีฉาบบางจะได้ลักษระของโครมาโทแกรมดังรูปที่ 20

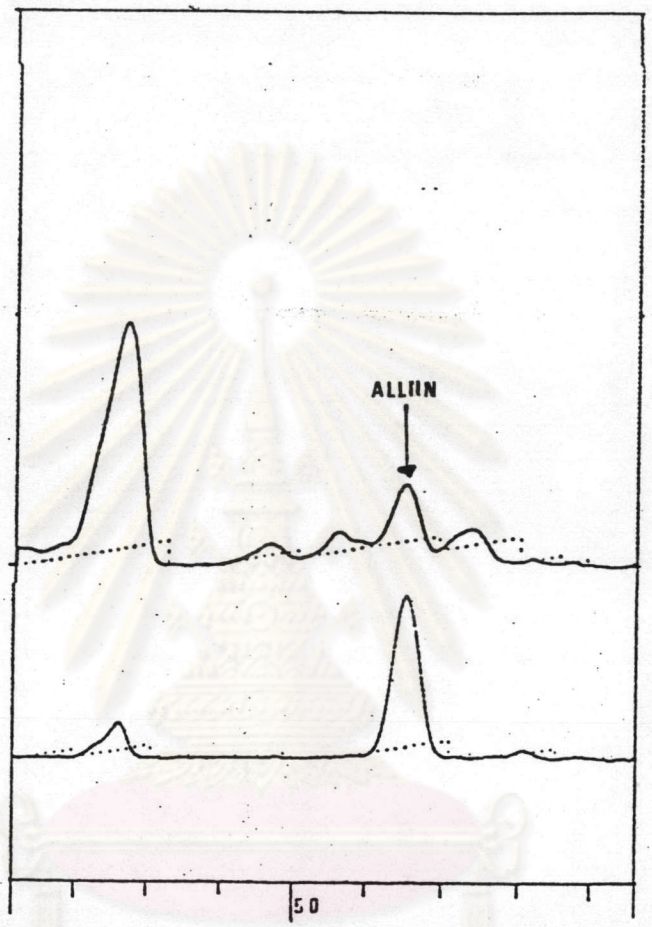
จะเห็นได้ว่าเมื่อทำการแยกสารสกัดกระเทียมในระบบตัวทำละลายของวัฏภาคเคลื่อนที่ ที่เหมาะสมจะเกิดการแยกของพีคอัลลิอิน ออกจากสารอื่นๆได้ดีดังโครมาโตแกรมที่แสดงไว้ดังรูปที่ 20

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 19 แสดงสเปกตรัมของการดูดกลืนแสงของสารอัลลิอิน ในช่วงความยาวคลื่น 200-700 นาโนเมตร โดยใช้เครื่องมือ Dual-Wavelenght TLC-Scanner

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

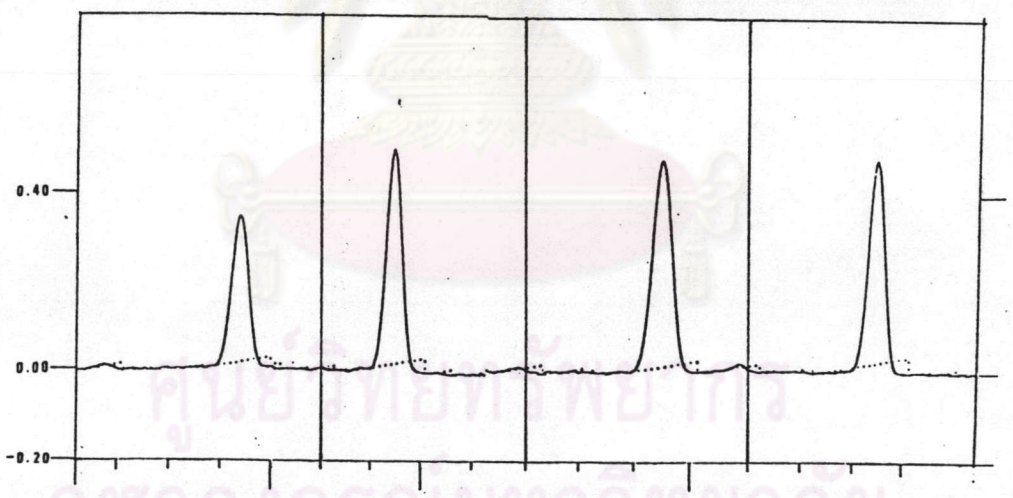


ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

รูปที่ 20 โครมาโตแกรมของสารสกัดหยาบของกระเทียม ที่ผ่านการแยกโดยเทคนิคโครมาโท-กราฟีฉาบบาง เมื่อใช้ความยาวคลื่น 475 นาโนเมตร ทำการตรวจวัด

1.3 การศึกษาสัดส่วนที่เหมาะสมของสารละลายนินไฮดรินกับพื้นที่ของแผ่นโครมาโทกราฟีฉาบบาง ที่ใช้ในการตรวจสอบหาปริมาณอัลลิอิน

จากผลการทดลองการศึกษาสัดส่วนที่เหมาะสมของสารละลายนินไฮดรินกับพื้นที่ของแผ่นโครมาโทกราฟีฉาบบาง ที่ใช้ในการตรวจสอบหาปริมาณอัลลิอิน โดยการพ่นสารละลายนินไฮดริน ความเข้มข้น 3 มก/มล. ปริมาตรต่างๆคือ 3.5 7 14 และ 21 มล. โดยคิดเป็นปริมาณนินไฮดรินต่อพื้นที่ของแผ่นโครมาโทกราฟีฉาบบาง คิดเป็นซม.^{2} เป็น 0.5 1.0 2.0 และ 3.0 มก /ซม.^{2} (แผ่นโครมาโทกราฟีฉาบบาง ที่ใช้ในการทดลองมีขนาด 2 x 10 ซม.^{2}) ตามด้วยการทำโครมาโทแกรม เพื่อหาค่าพื้นที่ใต้พีคของสารอัลลิอินที่อ่านได้จากเครื่อง TLC-densitometer พบว่าค่าพื้นที่ใต้พีคของอัลลิอิน จะมีค่าเพิ่มขึ้นตามปริมาณนินไฮดริน ที่เพิ่มขึ้นดังรูปที่ 21 แต่ในปริมาณนินไฮดริน 2 และ 3 มก/ซม.^{2} ของแผ่นโครมาโทกราฟีฉาบบาง ที่ให้ค่าที่ใกล้เคียงกันมากหรือไม่แตกต่างกัน แสดงว่าปริมาณนินไฮดริน 2 มิลลิกรัม ก็จะเพียงพอในการเกิดปฏิกริยากับอัลลิอิน ความเข้มข้น 2 มคก./5 มคล.(2ng./5µl) และการใช้ปริมาณไฮดรินที่มากเกินพอ คือ 3 มก/ซม.^{2} ไม่มีผลต่อการอ่านค่าของอัลลิอินแต่อย่างใด ดังนั้นในการศึกษานี้จึงใช้ปริมาณนินไฮดริน 3 มก/ซม.^{2} ของแผ่นโครมาโทกราฟีฉาบบาง ที่ใช้ในการวิเคราะห์ ตลอดการศึกษานี้ (รูป 21)



รูปที่ 21 แสดงผลของปริมาณนินไฮดรินที่พ่นลงบนแผ่นโครมาโทกราฟีฉาบบางต่อพื้นที่ใต้พีคของอัลลิอินการทดลองทำโดยแต้มสารมาตรฐานอัลลิอิน 2 มคก. ลงบนแผ่นโครมาโทกราฟีฉาบบางขนาด 2 ซม.x 10 ซม. และผ่านระบบตัวทำละลายของวัฏภาคเคลื่อนที่จากนั้นทำการพ่นด้วยสารละลายนินไฮดรินที่มีความเข้มข้น 3 มก./มล. ในปริมาตร ก) 3.5 มล. ข) 7.0 มล. ค) 14.0 มล. และ ง) 21.0 มล. เมื่อผ่านปฏิกิริยาการเกิดสีที่สมบูรณ์แล้ว นำมาอ่านค่าด้วยเครื่อง TLC - densitometer จะได้พื้นที่ใต้พีคของอัลลิอินเป็น 108774.9 146166.3 154812.7 และ 151028.4 ตามที่ระบุไว้ตามลำดับ

โดยสรุปคือในการวิเคราะห์หาปริมาณอัลลิอิน จากตัวอย่างกระเทียมในการศึกษาครั้งนี้ ได้ใช้เครื่องมือ Dual-Wavelenght TLC-scanner model DS-930 ของบริษัท Shimodsu โดยมีรายละเอียดของการควบคุมเครื่องมือดังนี้

แหล่งกำเนิดแสง (Lamp source) : หลอดทังสเตน (Tungsten Lamp)
วิธีการตรวจสอบ (Determination mode) : การดูดกลืนแสง (Absorption-reflection mode)
ระยะของการตรวจวัด (Scan width) : แนวขวาง = 6 มม (x = 6 mm)
: แนวตั้งฉาก = 0.05 มม (y = 0.05 mm)
ความไว (Sensitivity) : สูง (high)
ความกว้างของช่องตรวจวัด (Slid width) : 1.2 x 1.2 มม^2 (1.2 x 1.2 mm^2)
ความยาวคลื่นในการตรวจวัด (Wave lenght detector) : 475 นาโนเมตร (475 nm)

1.4 กราฟมาตรฐานของอัลลิอิน (Calibration Curve of Alliin)

จากการศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นต่างๆของอัลลิอินกับพื้นที่ใต้พีคของอัลลิอินที่ได้ พบว่าช่วงความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐานอัลลิอิน ที่ให้ลักษณะกราฟเป็นเส้นตรง จะอยู่ในช่วง 14.7-470 มคก./มล. ดังรูปที่ 23 โดยจะได้ค่า correlation coefficient (r) = 0.9977 และมีสมการเส้นตรงเป็นดังนี้

$y = 137.935 x - 475.795$ (n = 6)

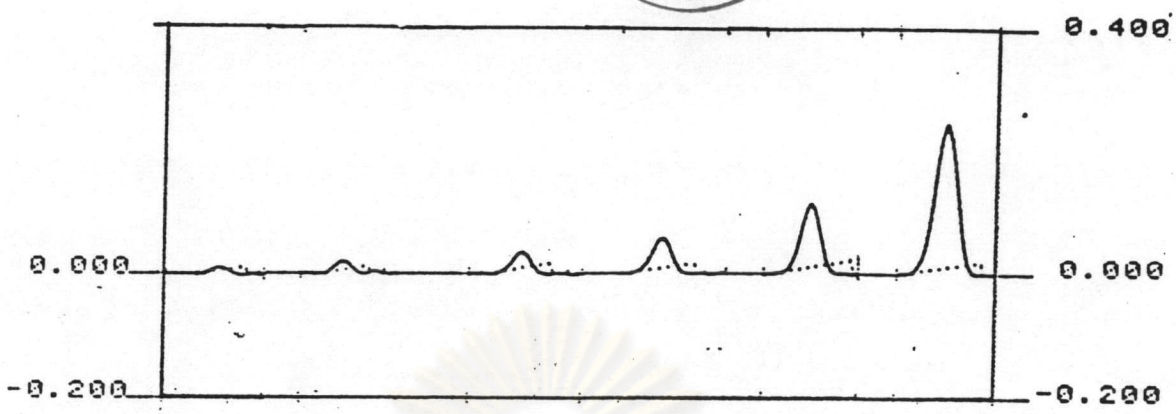
เมื่อ y = พื้นที่ใต้พีคของสารอัลลิอิน

x = ความเข้มข้นของสารมาตรฐานอัลลิอิน มีหน่วยเป็น มคก./มล.

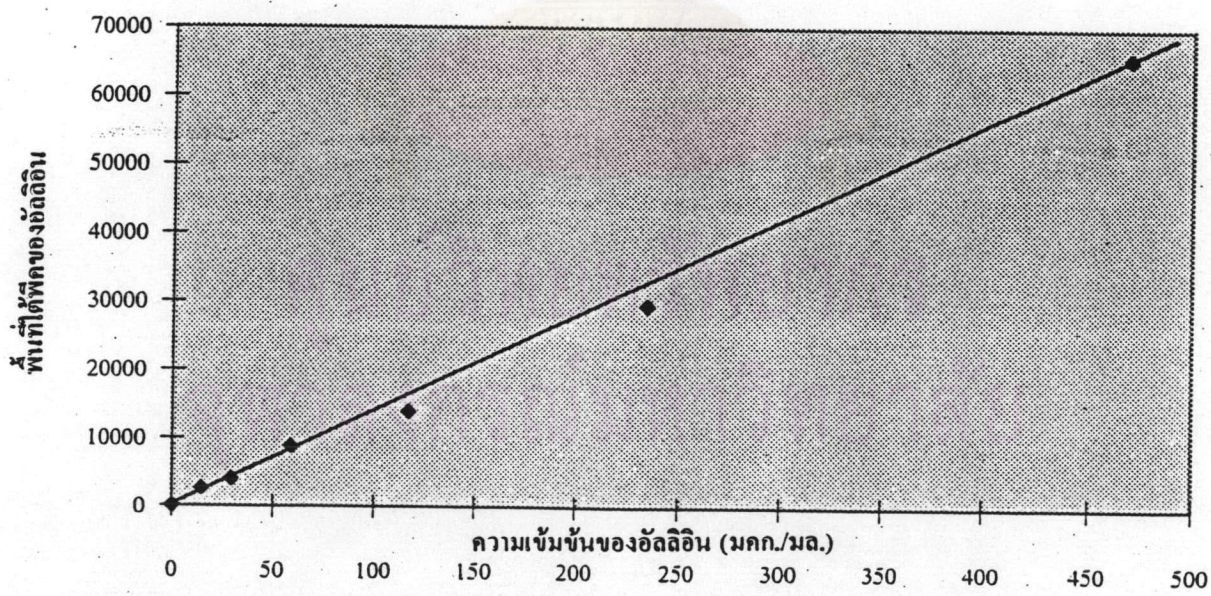
r = ค่า correlation coefficient

n = ระดับความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐานอัลลิอิน 6 ความเข้มข้น

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 22 สเปกตรัมของสารมาตรฐานอัลลิอินที่แสดงความสัมพันธ์ระหว่างพื้นที่ใต้พีคกับความเข้มข้นต่างๆของสารมาตรฐานอัลลิอินดังนี้ ก) 14.7 มคก./มล. ข) 29.4 มคก./มล. ค) 58.7มคก./มล. ง) 117.5 มคก./มล. จ) 235.0 มคก./มล. และ ฉ) 470.0 มคก./มล.



รูปที่ 23 กราฟมาตรฐานของสารอัลลิอิน สำหรับการวิเคราะห์หาปริมาณอัลลิอินในตัวอย่างกระเทียมด้วยเทคนิค ทีแอลซี-เดนซิโตเมตรี โดยมีสมการเส้นตรงเป็น

$Y = 137.935 X - 475.795$

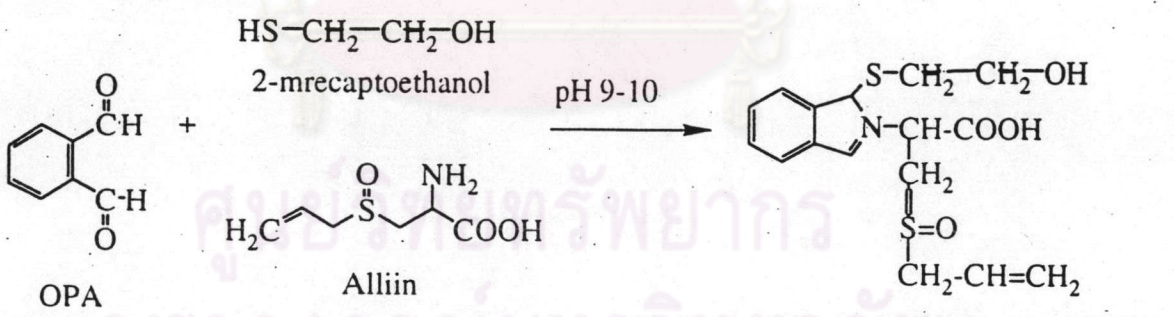
และมีค่า Correlation coefficient (r) = 0.997

ส่วนที่ 2 การวิเคราะห์หาปริมาณ อัลลิอิน ในกระเทียมโดยใช้เทคนิคเอชพีแอลซี

2.1 การเกิดปฏิกริยาอนุพันธ์ของสาร อัลลิอิน ก่อนฉีดเข้าคอลัมน์

เนื่องจาก อัลลิอิน เป็นสารที่ไม่สามารถดูดกลืนแสง หรือเรืองแสงได้ จึงต้องอาศัยการเกิดปฏิกริยาอนุพันธ์กับสารที่เหมาะสม เนื่องจากอัลลิอินมีลักษณะสูตรโครงสร้างเป็นกรดอะมิโน จึงใช้ O-Phthaldialdehyde reagent (OPA) ซึ่งเป็นผลิตภัณฑ์ที่มีความจำเพาะจงสำหรับการเกิดปฏิกริยาอนุพันธ์ก่อนฉีดเข้าคอลัมน์กับสารจำพวกกรดอะมิโน หรือ เอมีนปฐมภูมิ โดยเฉพาะปฏิกริยาที่เกิดขึ้นนี้ จะแสดงผลเนื่องจากหมู่ alkylthiol ซึ่งส่วนมากจะเป็น 2-mercaptoethanol ซึ่งจะเป็นวิธีการที่นิยมใช้ในการเกิดอนุพันธ์สำหรับการวิเคราะห์สารจำพวกกรดอะมิโนโดยเทคนิคลิควิดโครมาโทกราฟี โดยเมื่อเปรียบเทียบกับวิธีการเกิดอนุพันธ์แบบอื่นๆแล้ว จะพบว่าวิธีนี้มีข้อดีคือ สามารถเตรียมได้ง่าย เป็นสารที่มีความคงตัว เกิดปฏิกริยาได้รวดเร็ว และให้ผลผลิตที่สูง

โดยขบวนการเกิดอนุพันธ์นี้ จะใช้สำหรับการตรวจวัดด้วยเครื่องตรวจวัดการเรืองแสง (fluoriometric detector) สำหรับพวกกรดอะมิโน (Roth, M. , 1971) อนุพันธ์ที่เกิดขึ้นนี้ จะเป็นอนุพันธ์ของ N-substituted isoindole derivatives ดังสมการรูปที่ 24 (Allison, L. 1984, Ziegler and Sticher O. 1989)



รูปที่ 24 ปฏิกิริยาการเกิดอนุพันธ์ของสารอัลลิอินกับ OPA

2.2 ระบบตัวทำละลายของวัฏภาคเคลื่อนที่ (mobile phase) ที่เหมาะสม

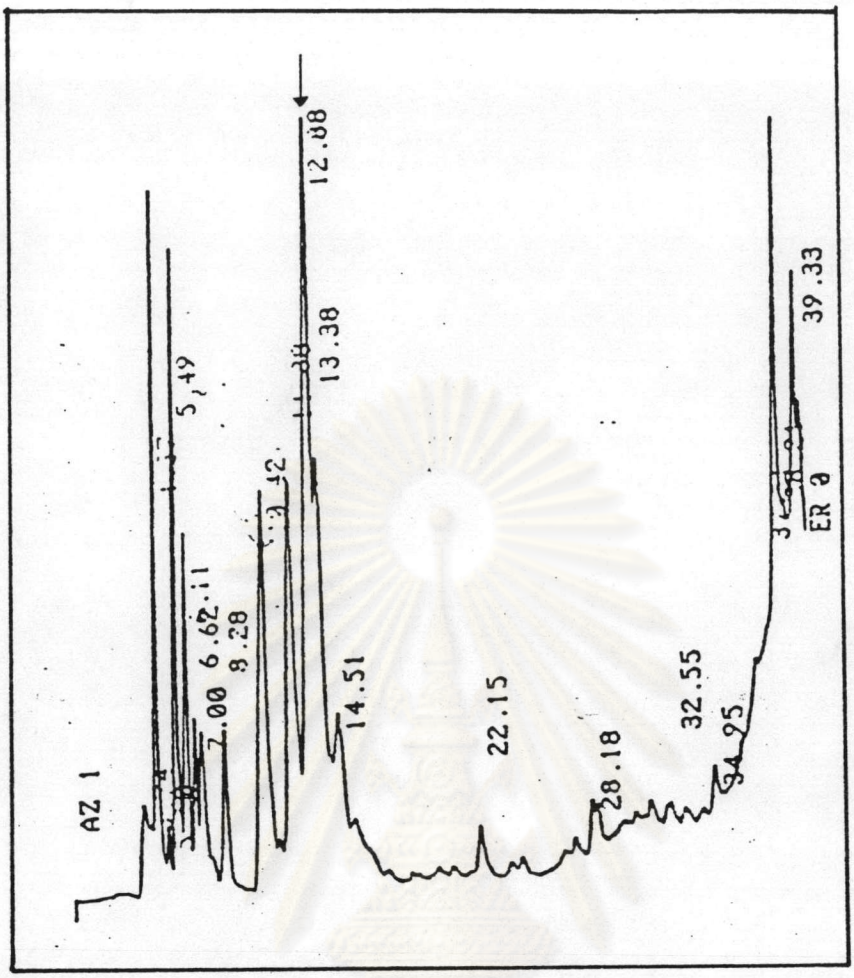
การศึกษาการแยกของสารอัลลิอินโดยเทคนิคเอชพีแอลซี ด้วยระบบตัวทำละลายของวัฏภาคเคลื่อนที่ ที่ประกอบไปด้วยระบบตัวทำละลาย ก. ซึ่งประกอบด้วยสารละลายไซเดียมอะซิเตด 0.1 โมลาร์ พีเอช 7.2 ในน้ำ : เมธานอลสัมบูรณ์ : เตตราไฮโครฟิวแรน ในอัตราส่วน 900:95:5 (0.1 M sodium acetate pH 7.2 /MeOH/tetrahydrofuran = 900/95/5) และระบบตัวทำละลาย ข. คือเมธานอลสัมบูรณ์ (Absolute methanol) โดยทำการชะสารออกจากคอลัมน์โดยเปลี่ยนความแรง (strenght) ของวัฏภาคเคลื่อนที่ ไปในระยะเวลาต่างๆกัน (Step-gradient elution) โดยทำการปรับอัตราส่วน อัตราการไหลของวัฏภาคเคลื่อนที่ จากระบบตัวทำละลายของวัฏภาคเคลื่อนที่ เดิม คือ

เวลาที่ (นาที)	เปอร์เซนต์ของระบบตัวทำละลาย	
	ก	ข
0	100	0
1	75	25
12	75	25
17	60	40
22	60	40
27	40	60
32	40	60
37	0	100
40	0	100
41	100	0
42	100	0

โดยมีอัตราการไหลของระบบเป็น 1 มล./นาที

เพื่อให้ได้ลักษณะโครมาโทแกรม ที่มีการแยกของพีคของอัลลิอินออกจากพีคของสารอื่นๆ ได้ดีที่สุดโดยทำการทดลองเปรียบเทียบกับสารละลายมาตรฐานอัลลิอิน ซึ่งจะได้ลักษณะต่างๆของโครมาโตแกรมของสารสกัดกระเทียมดังนี้ (รูปที่ 25 - 32)

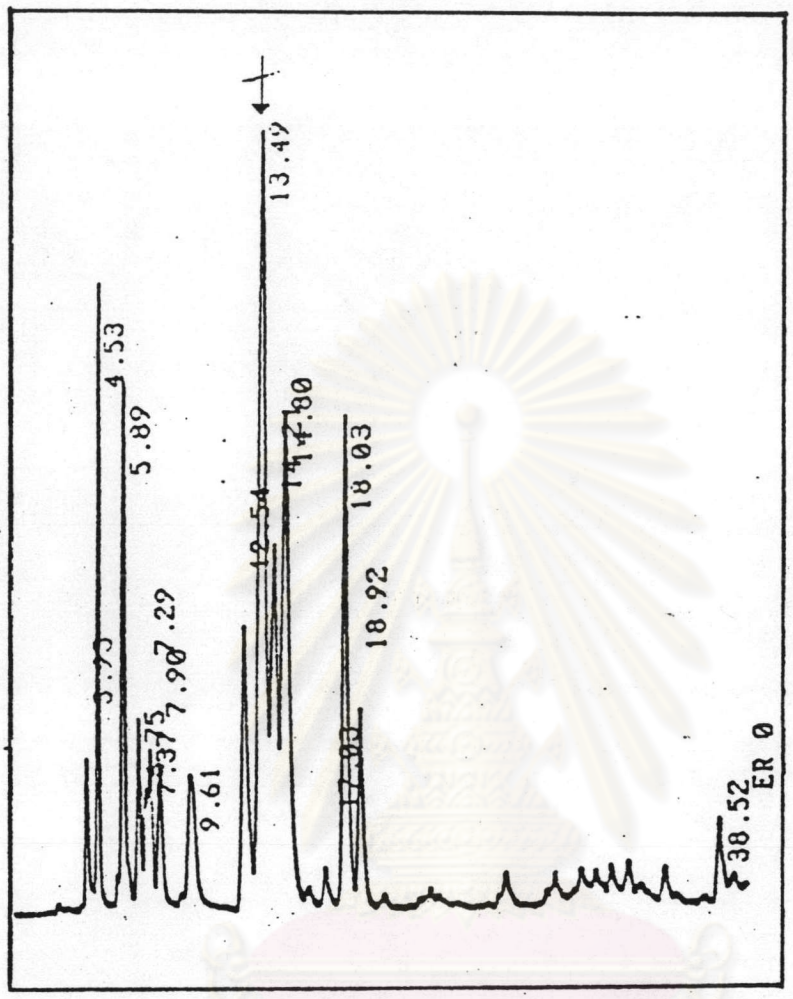
ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่25 แสดงโครมาโทแกรมของสารสกัดกระเทียมที่วิเคราะห์โดยเทคนิคHPLC โดยใช้ระบบตัวทำละลายดังนี้

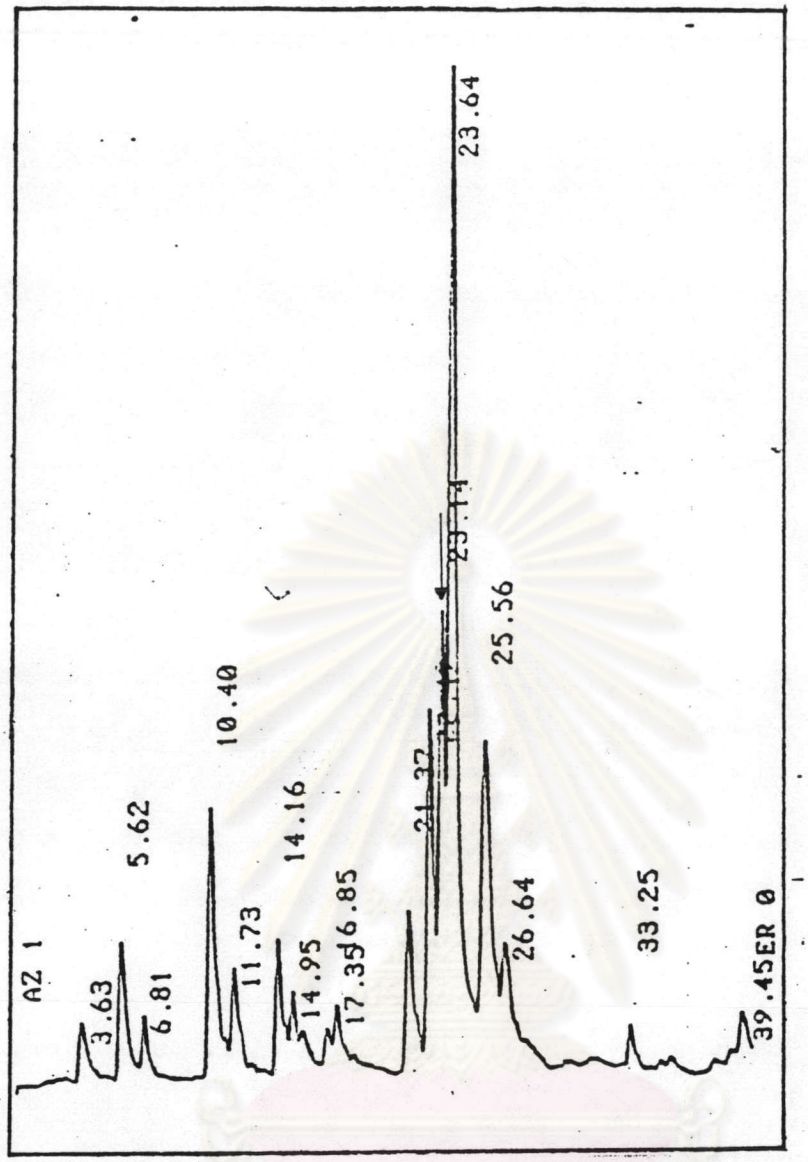
เวลาที่ (นาที)	เปอร์เซนต์ของระบบตัวทำละลาย	
	ก.	ข.
0	100	0
1	75	25
12	75	25
17	60	40
22	60	40
27	40	60
32	40	60
37	0	100
40	0	100
41	100	0
42	100	0

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



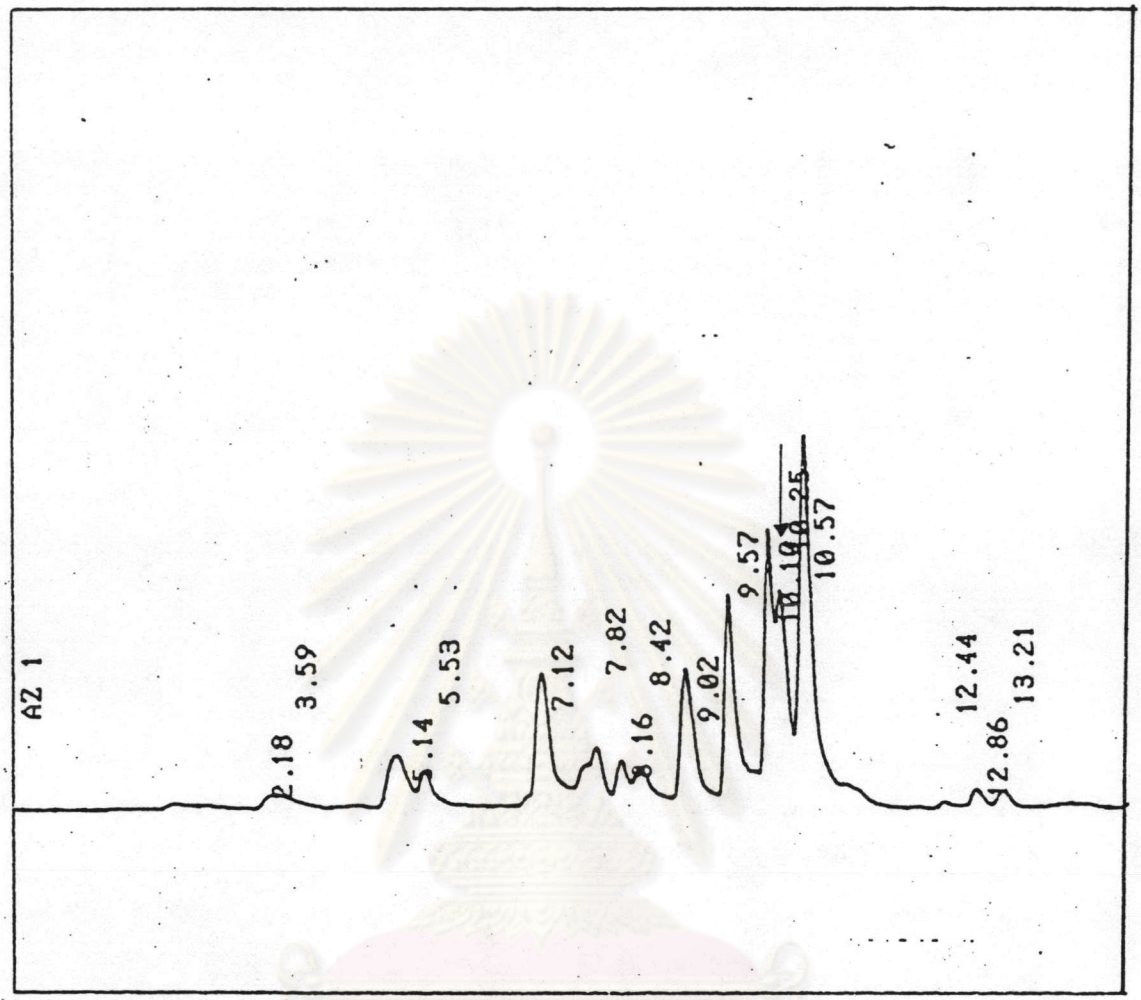
รูปที่ 26 แสดงโครมาโทแกรมของสารสกัดกระเทียมที่วิเคราะห์โดยเทคนิคHPLC โดยใช้ระบบตัวทำละลายดังนี้

เวลาที่ (นาที)	เปอร์เซนต์ของระบบตัวทำละลาย	
	ก.	ข.
0	100	0
1	75	25
12	75	25
20	60	40
25	60	40
30	40	60
35	40	60
40	0	100
45	0	100
46	100	0
47	100	0



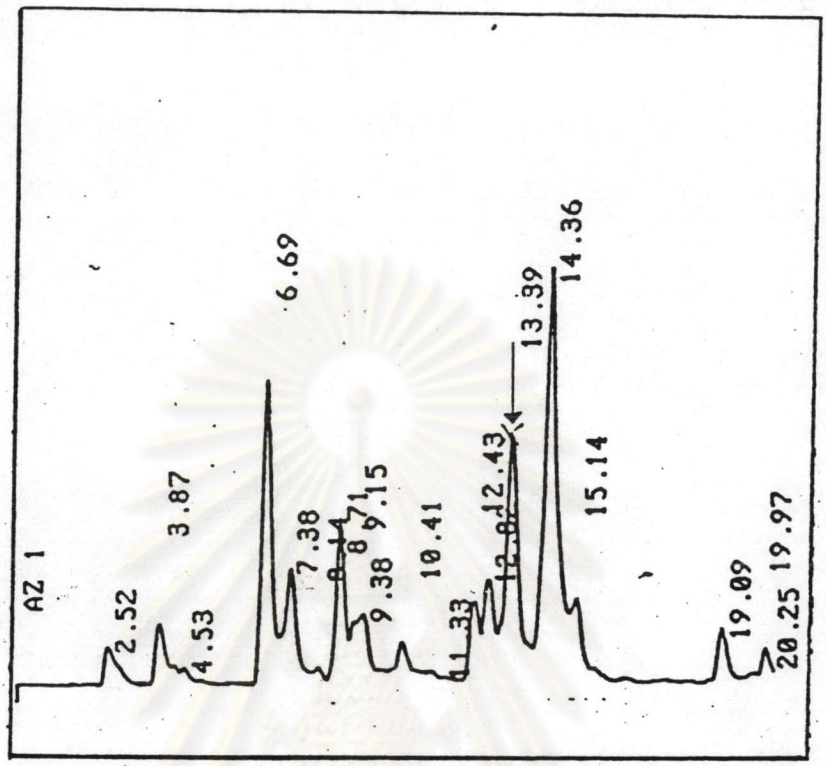
รูปที่27 แสดงโครมาโทแกรมของสารสกัดกระเทียมที่วิเคราะห์โดยเทคนิคHPLC โดยใช้ระบบตัวทำละลายดังนี้

เวลาที่ (นาที)	เปอร์เซนต์ของระบบตัวทำละลาย	
	ก.	ข.
0	100	0
20	75	25
23	75	25
28	60	40
34	60	40
39	40	60
44	40	60
48	0	100
50	0	100
51	100	0
52	100	0



รูปที่ 28แสดงโครมาโทแกรมของสารสกัดกระเทียมที่วิเคราะห์โดยเทคนิคHPLC โดยใช้ระบบตัวทำละลายดังนี้

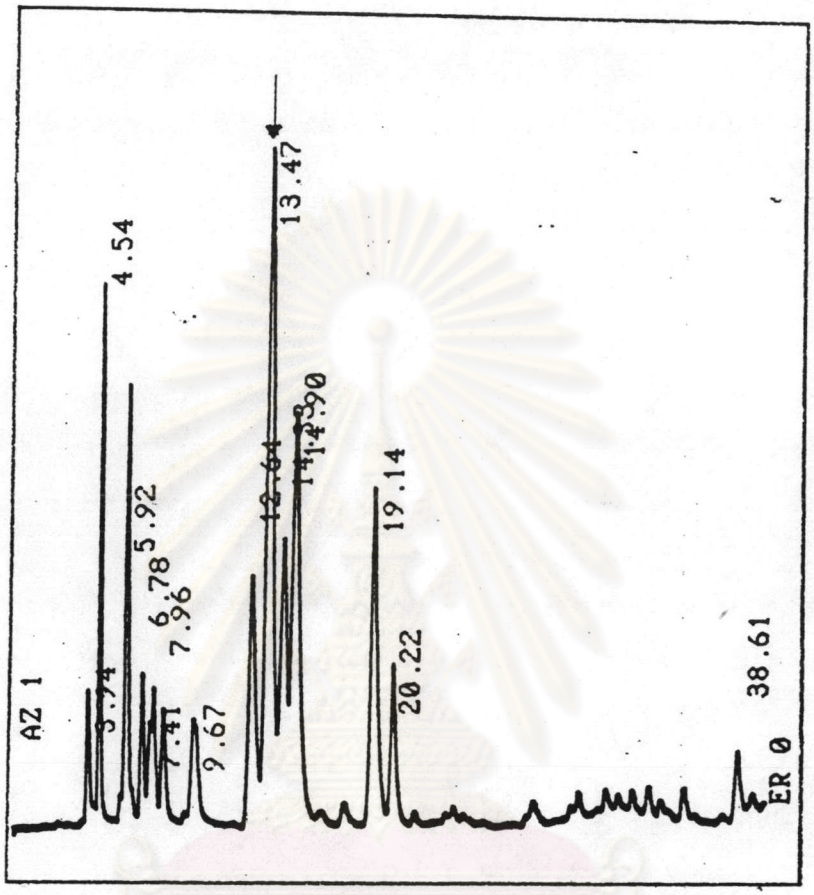
เวลาที่ (นาที)	เปอร์เซนต์ของระบบตัวทำละลาย	
	ก.	ข.
0	100	0
10	40	60
15	40	60
20	0	100
21	0	100
22	100	0
23	100	0



รูปที่29 แสดงโครมาโทแกรมของสารสกัดกระเทียมที่วิเคราะห์โดยเทคนิคHPLC โดยใช้ระบบตัวทำละลายดังนี้

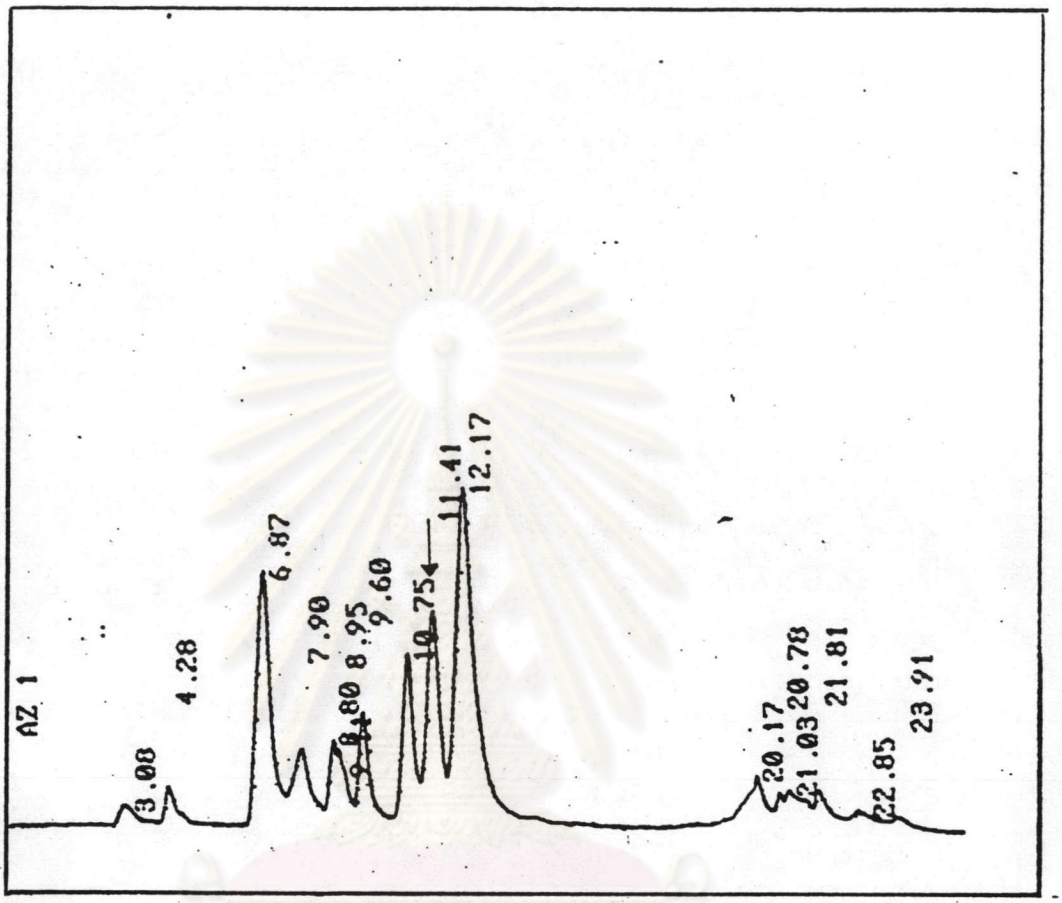
เวลาที่ (นาที)	เปอร์เซนต์ของระบบตัวทำละลาย	
	ก.	ข.
0	100	0
25	40	60
30	0	100
35	100	0

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



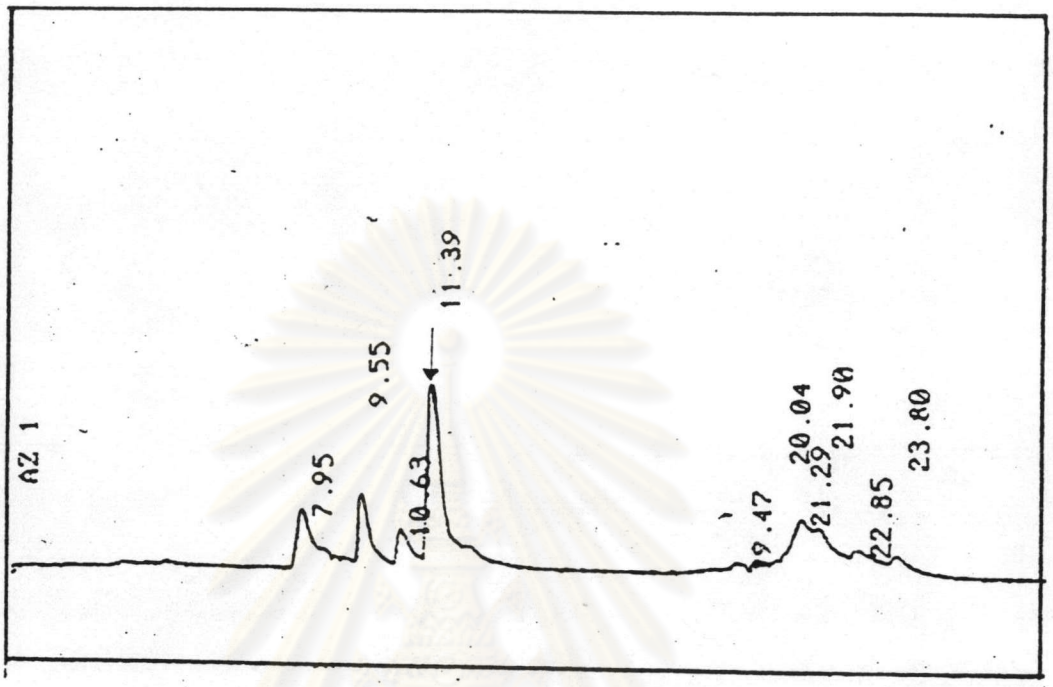
รูปที่30 แสดงโครมาโทแกรมของสารสกัดกระเทียมที่วิเคราะห์โดยเทคนิคHPLC โดยใช้ระบบตัวทำละลายดังนี้

เวลาที่ (นาที)	เปอร์เซนต์ของระบบตัวทำละลาย	
	ก.	ข.
0	100	0
1	75	25
15	75	25
20	60	40
25	60	40
30	40	60
35	40	60
40	0	100
43	0	100
45	100	0



รูปที่ 31 แสดงโครมาโทแกรมของสารสกัดกระเทียมที่วิเคราะห์โดยเทคนิคHPLC โดยใช้ระบบตัวทำละลายดังนี้

เวลาที่ (นาที)	เปอร์เซนต์ของระบบตัวทำละลาย	
	ก.	ข.
0	100	0
1	90	10
5	90	10
6	70	30
15	70	30
20	0	100
25	100	0
30	100	0



รูปที่32 แสดงโครมาโทแกรมของสารมาตรฐานอัลลิอินที่วิเคราะห์โดยเทคนิคHPLC โดยใช้ระบบตัวทำละลายดังนี้

เวลาที่ (นาที)	เปอร์เซนต์ของระบบตัวทำละลาย	
	ก.	ข.
0	100	0
1	90	10
5	90	10
6	70	30
15	70	30
20	0	100
25	100	0
30	100	0

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

จากลักษณะของโครมาโตแกรมที่แสดงดังรูปที่ 25 - 32 พบว่าระบบตัวทำละลายของวัฏภาคเคลื่อนที่ ที่ให้โครมาโทแกรมที่มีการแยกของพีคอัลลิอินออกจากพีคของสารอื่นๆได้ดีที่สุด คือ

เวลาที่ (นาที)	เปอร์เซนต์ของระบบตัวทำละลาย	
	ก	ข
0	100	0
1	90	10
5	90	10
6	70	30
15	70	30
20	0	100
25	100	0
30	100	0

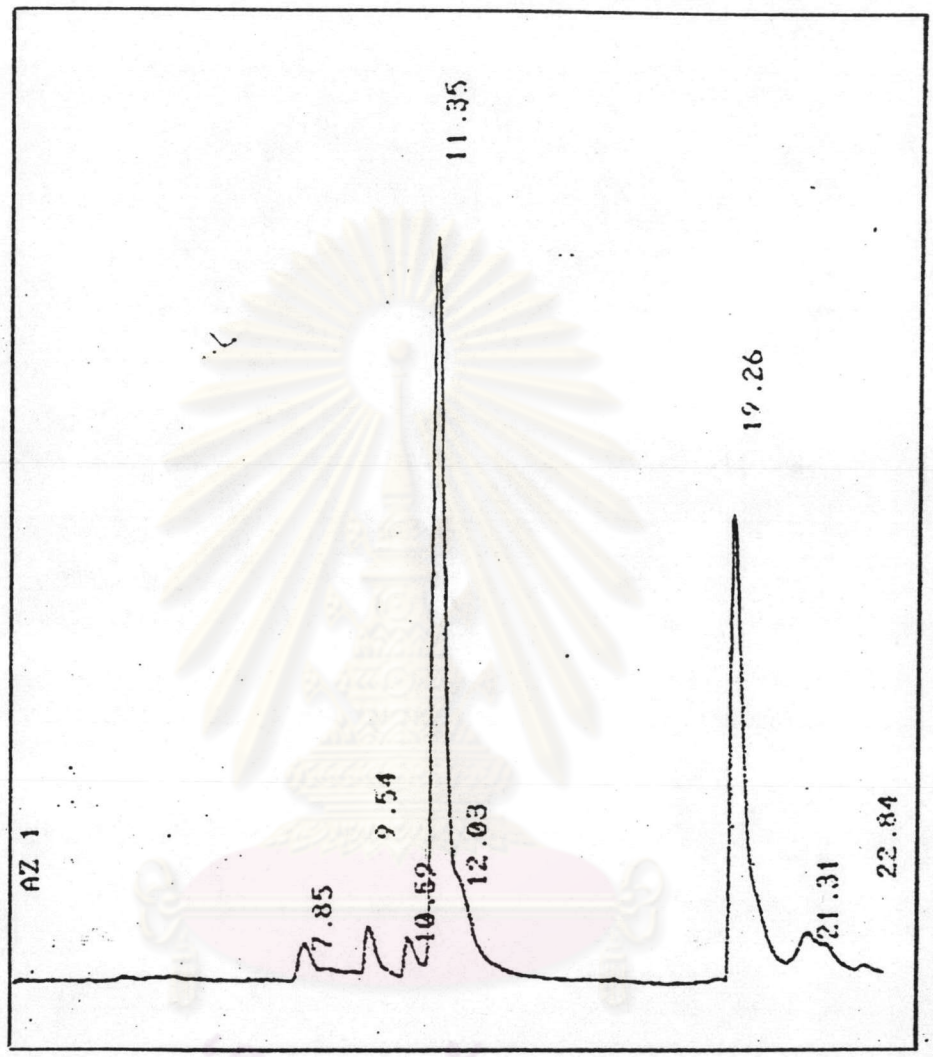
หอสมุดกลาง สถาบันวิทยบริการ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

โดยมีอัตราการไหลเป็น 1.2 มิลลิลิตร/นาที โดยพบว่าสารอัลลินอินจะถูกชะออกจากคอลัมน์ที่เวลาประมาณ 11.47 นาที (Retention time, RT = 11.47 min) ดังรูปที่ 31-32

2.3 สารมาตรฐานภายในที่ใช้ในการทดลอง

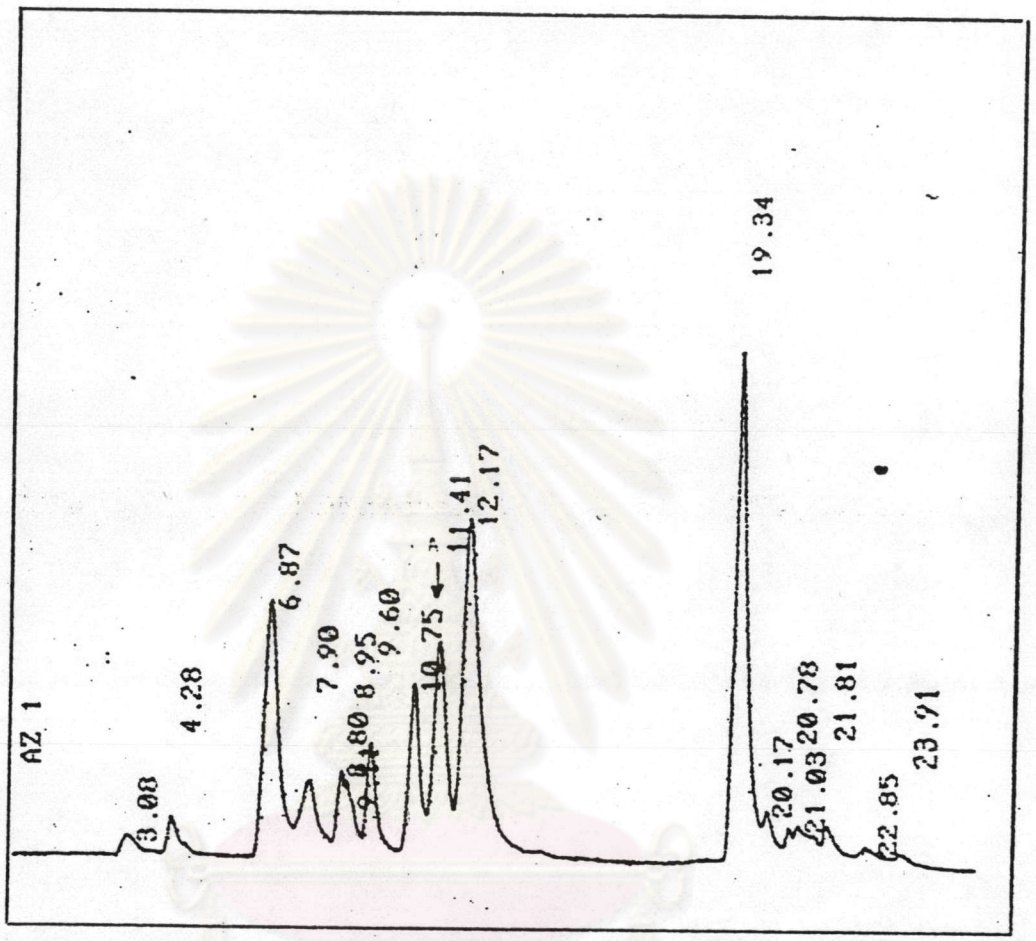
ในการเลือกสารที่จะใช้เป็นสารมาตรฐานภายใน ที่เหมาะสมในการวิเคราะห์หาปริมาณอัลลิอิน โดยใช้เทคนิคเอชพีแอลซี การทดลองได้ใช้ เมไธโอนีน เป็นสารมาตรฐานภายในและตำแหน่งของพีคของ เมไธโอนีนก็สามารถแยกออกจากพีคของอัลลิอิน ได้อย่างสมบูรณ์ แสดงดังรูปที่ 33 และ 34

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 33 โครมาโทแกรมของสารมาตรฐานอัลลิอินและสารมาตรฐานภายใน

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 34 โครมาโทแกรมของสารสกัดกระเทียมและสารมาตรฐานภายใน

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

2.4 กราฟมาตรฐานของสารอัลลิอิน (Calibration Curve of Alliin)

จากการทดลองหาช่วงความเข้มข้นของสารอัลลิอิน ที่ให้ความสัมพันธ์กับพื้นที่ใต้พีคในลักษณะที่เป็นเส้นตรง พบว่าทั้งความเข้มข้นของอัลลิอินระหว่าง 14.7-470 มคก./มล. จะให้ความสัมพันธ์ในลักษณะที่เป็นเส้นตรง (รูปที่ 35)

การสร้างกราฟมาตรฐานของสารอัลลิอินในครั้งนี้ ได้ใช้วิธีการการเติมสารมาตรฐานภายใน ลงในตัวอย่างที่ทำการวิเคราะห์โดยเติมสารมาตรฐานภายในที่ใช้คือ เมไธโอนีน ในปริมาณ 1 มคก. ต่อการหาปริมาณอัลลิอินในแต่ละครั้ง จากกราฟมาตรฐานที่ได้ จะให้สมการเส้นตรงเป็น

$y = 161.8552 x - 3.7833 \quad (n = 6)$

และได้ค่า correlation coefficient (r) = 0.9969

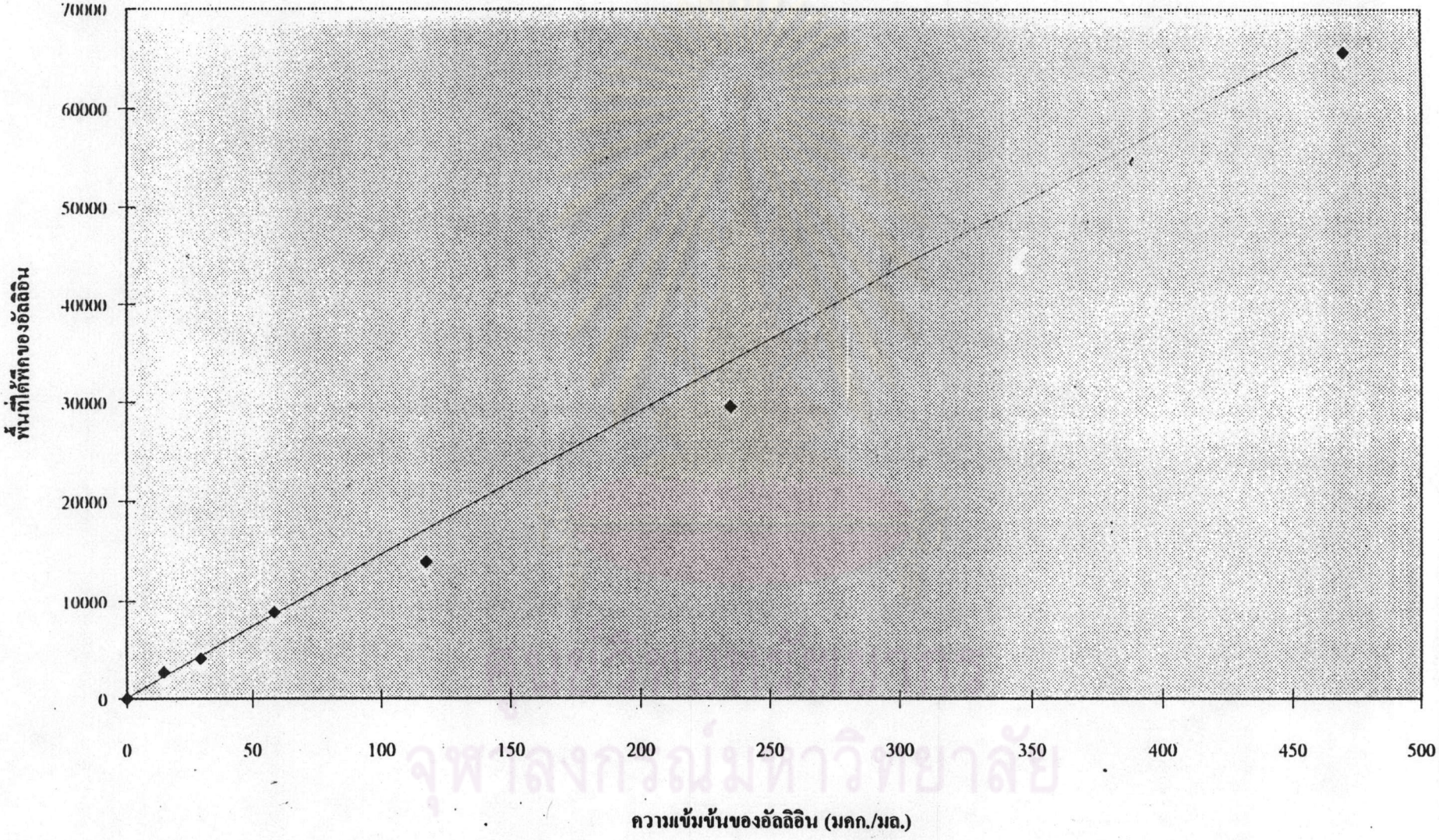
เมื่อ y = อัตราส่วนพื้นที่ใต้พีคของอัลลิอินกับเมไธโอนีน (Peak area ratios between alliin and methionine)

x = ความเข้มข้นของสารมาตรฐานอัลลิอิน มีหน่วยเป็น มคก./มล.

n = ช่วงความเข้มข้นของสารมาตรฐานอัลลิอิน 6 ความเข้มข้น

r = correlation coefficiont (r)

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 35 แสดงกราฟมาตรฐานของสารอัลลิอิน

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ส่วนที่ 3. การเปรียบเทียบความแม่นยำของเทคนิค ทีแอลซี-เดนซิโตเมตรี กับเทคนิค เอชพีแอลซี

เพื่อดูความแม่นยำของเทคนิค ทีแอลซี-เดนซิโตเมตรี ที่ใช้ในการวิเคราะห์หาปริมาณอัลลิอิน ในตัวอย่างกระเทียม จึงได้ทำการเปรียบเทียบกับเทคนิคของเอชพีแอลซี เพื่อเป็นการยืนยัน โดยใช้สารสกัดกระเทียม จำนวน 5 ตัวอย่าง มาทำการวิเคราะห์หาปริมาณอัลลิอินโดยใช้เทคนิคทั้ง 2 นี้ แล้วนำปริมาณอัลลิอินที่ได้ มาทำการเปรียบเทียบกัน ผลการทดลองพบว่าปริมาณอัลลิอินที่หาได้ จากเทคนิคทั้ง 2 นี้ มีค่าใกล้เคียงกัน โดยมี %coefficient of variation = 0.9682 (ตารางที่ 12) ดังนั้นจึงสามารถสรุปได้ว่า เทคนิคทาง ทีแอลซี-เดนซิโตเมตรี นี้มีความแม่นยำในการวิเคราะห์หาปริมาณอัลลิอินได้เท่าเทียบกับเทคนิค เอชพีแอลซี

ตารางที่ 12 ปริมาณอัลลิอิน จากสารสกัดกระเทียมที่ทำการวิเคราะห์โดยเทคนิค TLC-densitometry เปรียบเทียบกับเทคนิค เอชพีแอลซี

ตัวอย่าง	ปริมาณอัลลิอินในสารสกัดกระเทียมโดยใช้เทคนิค (% โดยน้ำหนักแห้ง)		%CV
	HPLC	TLC-densitometry	
1	2.17 ± 0.076	2.19 ± 0.096	0.552
2	1.86 ± 0.021	1.81 ± 0.031	1.746
3	2.13 ± 0.053	2.09 ± 0.146	1.198
4	1.79 ± 0.071	1.80 ± 0.090	0.082
5	1.08 ± 0.025	1.07 ± 0.010	1.263

ในแง่ของความเที่ยงตรง (Precision) ได้ใช้เทคนิค ทีแอลซี-เดนซิโตเมตรี ในการวิเคราะห์หาปริมาณ อัลลิอิน ในตัวอย่างกระเทียม คิดคำนวณโดยการวิเคราะห์ตัวอย่าง ตัวอย่างหนึ่งซ้ำๆ จำนวน 10 ครั้ง โดยวิธี ทีแอลซี-เดนซิโตเมตรี ผลที่ได้จะแสดงดังตารางที่ 13 จากการศึกษาความเที่ยงตรงของการใช้เทคนิค ทีแอลซี-เดนซิโตเมตรี ในการวิเคราะห์หาปริมาณ อัลลิอิน นี้ จะได้ค่า coefficient of varialion เท่ากับ 2.9680 ซึ่งเป็นค่าที่สามารถยอมรับได้ (ตารางที่ 13) ดังนั้นจึงสรุปได้ว่าเทคนิค ทีแอลซี-เดนซิโตเมตรี มีความเที่ยงตรงในการหาปริมาณ อัลลิอิน ในกระเทียม

ตารางที่ 13 การวิเคราะห์ความเที่ยงตรงของการใช้เทคนิค ทีแอลซี-เดนซิโตเมตรี ในการวิเคราะห์หาปริมาณ อัลลิอิน ในตัวอย่างกระเทียม

ตัวอย่าง	ปริมาณ อัลลิอิน (% โดยน้ำหนักแห้ง)
1	2.2617
2	2.3047
3	2.0887
4	2.1858
5	2.0956
6	2.1873
7	2.2107
8	2.1985
9	2.1857
10	2.1850
Mean (x)	2.19037
Standard deviation (SD)	0.0650
% Coefficient of variation (%CV)	2.9680

จากปริมาณ อัลลิอิน ในตัวอย่างกระเทียม ที่วิเคราะห์ได้จากเทคนิคทั้ง 2 นี้ คือเทคนิคทาง ทีแอลซี-เดนซิโตเมตรี และเทคนิคทาง เอชพีแอลซี ได้ผลดังตาราง จะเห็นว่าปริมาณ อัลลิอิน ที่หาได้เทคนิคทาง ทีแอลซี-เดนซิโตเมตรี มีค่าใกล้เคียงกับผลที่วิเคราะห์โดยเทคนิคทาง เอชพีแอลซี ดังแสดงในตารางที่ 14

โดยมี %coefficient of variation รวมของตัวอย่างทั้งหมด = 1.3137 ซึ่งเป็นค่าที่สามารถยอมรับได้ นอกจากนั้น จากผลการทดลองเปรียบเทียบนี้จะเห็นได้ว่า วิธีการทาง ทีแอลซี-เดนซิโตเมตรี จะไม่สามารถตรวจสอบปริมาณสาร อัลลิอิน ที่มีความเข้มข้นน้อยๆได้ (ต่ำกว่า 0.5%) ดังนั้นจึงเป็นข้อจำกัดของวิธีการนี้

ตารางที่ 14 เปรียบเทียบปริมาณอัลลิอินที่ได้โดยวิธี ทีแอลซี-เดนซิโตมีทรี และวิธีไฮเปอร์ฟอร์แมนซ์ลิควิดโครมาโทกราฟีในกระเทียมพันธุ์ต่างๆ

พันธุ์	ปริมาณอัลลิอิน * (%โดยน้ำหนักแห้ง)		% CV
	TLC	HPLC	
จีน 1	1.77 ± 0.15	1.77 ± 0.10	0
จีน 2	2.19 ± 0.10	2.17 ± 0.08	0.5517
บางช้าง	1.81 ± 0.03	1.85 ± 0.02	1.7459
ไต้หวัน	2.09 ± 0.15	2.13 ± 0.05	1.1976
เชียงตุง	1.94 ± 0.07	1.84 ± 0.22	3.771
เชียงใหม่	1.80 ± 0.09	1.79 ± 0.07	0.0824

* จำนวนตัวอย่าง (n) = 5

ส่วนที่ 4 การสกัดสารอัลลิอิน จากกระเทียมตัวอย่าง

คุณสมบัติในการละลายของ อัลลิอิน พบว่า อัลลิอิน สามารถละลายได้ดีในน้ำ หรือในสารละลายที่มีขั้วค่อนข้างสูง แต่ไม่ละลายในตัวทำละลายอินทรีย์อื่นๆ (Rahway, N.J. 1976. The Merch Index, 9th ed U.S.A. : Merck Et Co) นอกจากนั้นจากการศึกษาที่ผ่านมาพบว่าในหัวกระเทียมเมื่อถูกทำให้ช้ำ อัลลิอิน ที่มีอยู่จะถูกเอนไซม์ ที่เฉพาะเจาะจงที่มีชื่อว่าเอนไซม์อัลลิอินเนส ย่อยสลายได้เป็น อัลลิซิน และสารอื่นๆ จากรายงานการวิเคราะห์ต่างๆพบว่าสารผสมระหว่างน้ำและ เมธานอล จะเป็นวิธีหนึ่งที่จะสามารถยับยั้งขบวนการการทำงานของเอนไซม์ชนิดนี้ได้ ดังนั้นในการศึกษาครั้งนี้จึงจำเป็นต้องหาอัตราส่วนและความแรงของเมธานอล ที่จะสามารถยับยั้งปฏิกิริยาของเอนไซม์และสามารถสกัดสาร อัลลิอิน ออกมาได้มากที่สุด

การหาความแรงของเมธานอล ที่เหมาะสมในการทดลอง จากผลิตภัณฑ์กระเทียม ทำการทดลองโดยนำสารตัวอย่างมาสกัดด้วยเมธานอล ที่มีความแรงต่างๆกัน ดังนี้คือ 95%, 80%, 70% และ 50% จากผลการทดลองพบว่า 70% และ 50% เมธานอล สามารถสกัด อัลลิอิน ออกมาได้ในปริมาณที่ใกล้เคียงกัน ซึ่งทำการตรวจวัดโดยใช้ทางเทคนิค ทีแอลซี-เดนซิโตเมตรี แต่ในการสกัดโดยใช้หัวกระเทียมพบว่า การใช้ 70% และ 50%เมธานอล จะให้ปริมาณอัลลิอิน ที่น้อยกว่าเมื่อสกัดด้วย 95% เมธานอล ทั้งนี้เนื่องมาจากในหัวกระเทียมจะมีน้ำเป็นองค์ประกอบอยู่ตั้งแต่ 59-72% ซึ่งหาโดยวิธี Azeotropic Distillation Method ซึ่งเป็นข้อแตกต่างระหว่างตัวอย่างทั้ง 2 ชนิดนี้ นั่นแสดงถึงว่าเมธานอลที่มีความแรงต่ำกว่า 70% จะให้ผลในการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ได้ไม่ดีเท่าที่ควร

ดังนั้นจากขั้นตอนนี้จึงสามารถสรุปได้ว่าเมธานอลที่มีความแรง 70% และ 95% จะมีความเหมาะสมในการสกัดสารอัลลิอินออกจากผลิตภัณฑ์กระเทียมและจากหัวกระเทียมตามลำดับ การหาอัตราส่วนที่เหมาะสมระหว่างตัวสกัดและสารตัวอย่าวเพื่อให้ได้สารสกัดที่มีความเข้มข้นที่เหมาะสมเพื่อใช้ในการทดลองต่อไป จากการทดลองพบว่าผลิตภัณฑ์กระเทียม 100 มก. ใน10 มล. 70% เมธานอล และหัวกระเทียม 1 กรัมใน 10 มล. 95 % เมธานอล จะให้สารสกัดที่มีความเข้มข้นที่เหมาะสม

ส่วนที่ 5 ปริมาณน้ำในตัวอย่างกระเทียม

จากหัวกระเทียมตัวอย่างต่างๆที่นำมาศึกษาในครั้งนี้ พบว่าปริมาณน้ำที่ทำการวิเคราะห์ได้อยู่ในช่วงร้อยละ 59.17-71.98 รายละเอียดดังแสดงในตารางที่ 15

จากตารางแสดงผลการทดลอง พบว่าในหัวกระเทียมจะมีน้ำเป็นองค์ประกอบมากกว่าร้อยละ50 โดยน้ำหนัก โดยหัวกระเทียมแต่ละพันธุ์จะมีปริมาณน้ำที่แตกต่างกันอกไป ทั้งนี้เนื่องมาจากกระบวนการหลังการเก็บเกี่ยว ซึ่งมีความจำเป็นต้องนำหัวกระเทียมสดที่เก็บได้นั้นมาทำการผึ่งให้แห้ง เพื่อที่จะสามารถเก็บผลผลิตได้นาน มิฉะนั้นผลผลิตที่เก็บเกี่ยวมาได้นั้นจะเกิดความเสียหายเนื่องจากการเน่าเสียหรือมีแมลงมากัดกินได้

โดยจุดประสงค์ของการศึกษาในขั้นนี้คือ การหาปริมาณน้ำเพื่อนำมาคำนวนหาปริมาณสารสำคัญโดยน้ำหนักแห้ง เพื่อลดข้อผิดพลาดในการสรุปหรือวิเคราะห์ผลการทดลอง

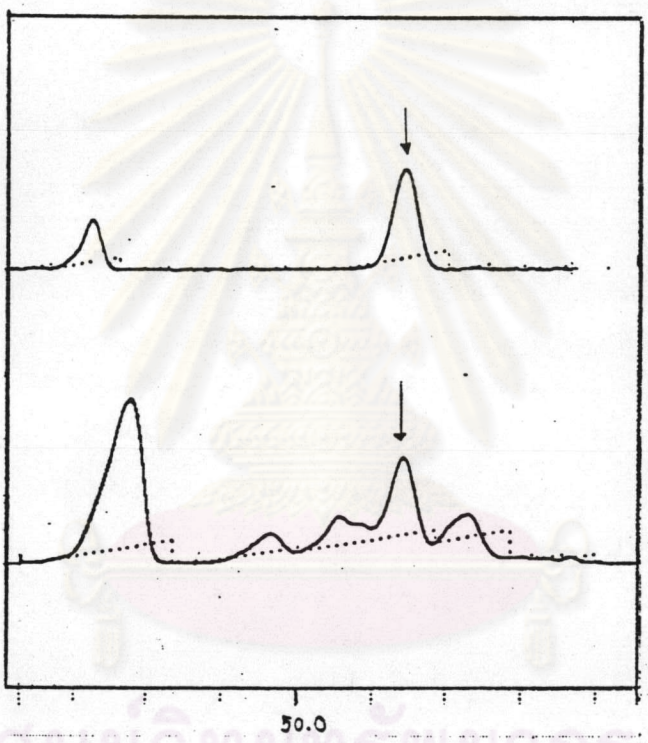
ตารางที่ 15 ปริมาณน้ำในตัวอย่างกระเทียมพันธุ์ต่างๆ

พันธุ์	จำนวนตัวอย่าง (n)	ปริมาณน้ำ (ร้อยละโดยน้ำหนัก)
จากแปลงทดลอง จ. เชียงใหม่		
จีน1	5	70.10±0.031
จีน2	5	69.0±0.045
บางช้าง	5	69.55±0.010
ไต้หวัน	5	71.05±0.078
เชียงตุง	5	68.00±0.047
ศรีสะเกษ	5	59.17±0.021
เชียงใหม่	5	71.98±0.120
จากแปลงทดลองจ.ศรีสะเกษ		
ศรีสะเกษ	5	68.55±0.071
จากตลาดจ.ศรีสะเกษ		
ศรีสะเกษ	5	65.66±0.068
จากตลาด จ.กรุงเทพ		
เชียงใหม่	5	63.92±0.075

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ส่วนที่ 6 ปริมาณสารอัลลิอินในกระเทียมที่ปลูกในประเทศไทย

ผลการวิเคราะห์หาปริมาณอัลลิอินในกระเทียมที่ปลูกในประเทศไทยโดยใช้เทคนิค ทีแอลซี-เดนซิโตเมตรี และ เอชพีแอลซี จากลักษณะของโครมาโทแกรมของสารสกัดกระเทียมที่ได้ (รูปที่ 36) นำค่าพื้นที่ใต้พีคของสารอัลลิอินมาทำการคำนวนหาปริมาณของสารอัลลิอิน ที่ได้ดังแสดงดังตารางที่ 16

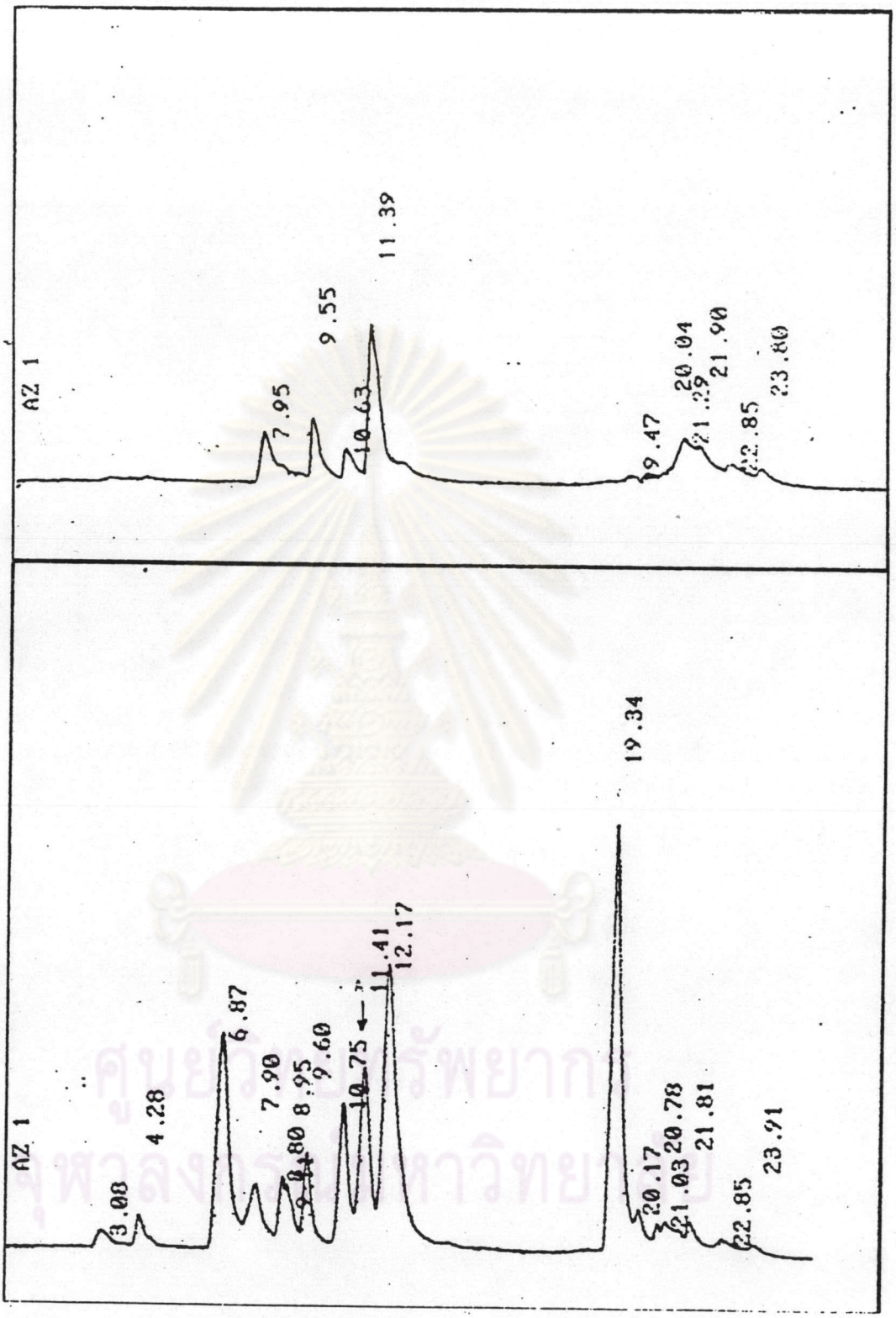


รูปที่ 36 ลักษณะโครมาโทแกรมของสารสกัดกระเทียมที่วิเคราะห์โดย ทีแอลซี-เดนซิโตเมตรี

1) โครมาโทแกรมของสารมาตรฐานอัลลิอิน

2) โครมาโทแกรมของสารสกัดกระเทียมในเมธานอล 95%

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 37 ลักษณะโครมาโทแกรมของสารสกัดกระเทียมที่วิเคราะห์โดยเทคนิค เอชพีแอลซี

1) โครมาโทแกรมของสารมาตรฐานอัลลิอิน

2) โครมาโทแกรมของสารสกัดกระเทียมใน เมธานอล95%

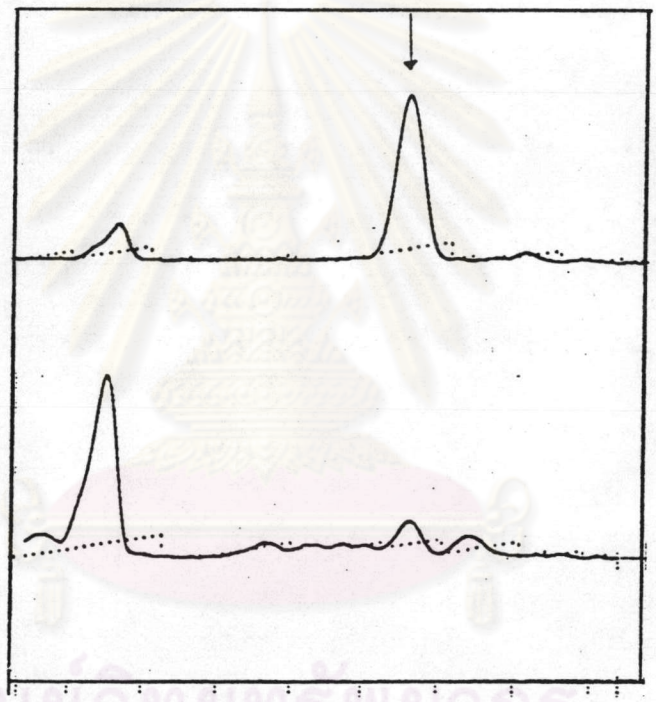
ตารางที่ 16 แสดงปริมาณอัลลิอินของกระเทียมพันธุ์ต่างๆที่ปลูกในประเทศไทย ซึ่งวิเคราะห์โดยเทคนิค ทีแอลซี-เดนซิโตเมตรี และ เอชพีแอลซี

พันธุ์	จำนวนตัวอย่าง (n)	ปริมาณอัลลิอินที่วิเคราะห์โดยเทคนิค (ร้อยละโดยน้ำหนักแห้ง)	
		TLC-densitometry	HPLC
จากแปลงทดลองจ.เชียงใหม่			
จีน1	5	1.77±0.16	1.77±0.13
จีน2	5	2.19±0.10	2.17±0.08
บางช้าง	5	1.81 ± 0.03	1.86 ± 0.02
ไต้หวัน	5	2.09 ± 0.15	2.13 ± 0.05
เชียงตุง	5	1.94 ± 0.07	1.84 ±0.22
ศรีสะเกษ	5	1.56 ± 0.06	1.55± 0.05
เชียงใหม่	5	1.80±0.09	1.79 ± 0.07
จากแปลงทดลองจ.ศรีสะเกษ			
ศรีสะเกษ	5	1.59 ± 0.13	1.52 ± 0.07
จากตลาดในจ.ศรีสะเกษ			
ศรีสะเกษ	5	1.07 ± 0.01	1.08 ± 0.03
จากตลาดในจ. กรุงเทพ			
เชียงใหม่	5	2.25 ± 0.04	2.25±0.12

จากตารางที่ 16 จะเห็นว่าในกระเทียมพันธ์ต่างๆจะมีปริมาณสารอัลลิอินที่มากน้อยแตกต่างกันไป เมื่อเปรียบเทียบเป็นร้อยละโดยน้ำหนักแห้ง โดยพันธุ์ที่มีปริมาณอัลลิอินมากกว่าร้อยละ 2 โดยน้ำหนักแห้งคือ พันธุ์จีน2 พันธุ์ไต้หวัน จากแปลงทดลองปลูกจังหวัดเชียงใหม่ และพันธุ์เชียงใหม่ จากตลาดในกรุงเทพมหานคร

ส่วนที่ 7 ปริมาณสารอัลลิอินในผลิตภัณฑ์กระเทียมที่ใช้เป็นอาหารเสริมสุขภาพ

7.1 ผลการวิเคราะห์หาปริมาณอัลลิอินในผลิตภัณฑ์กระเทียมที่ใช้เป็นอาหารเสริมสุขภาพ โดยใช้เทคนิค ทีแอลซี-เดนซิโตเมตรี และ เอชพีแอลซี จากลักษณะของโครมาโตแกรมของสารสกัดกระเทียมที่ได้ (รูปที่ 38) นำค่าพื้นที่ใต้พีคของสารอัลลิอินมาทำการคำนวนหาปริมาณของสาร อัลลิอิน ที่ได้ดังแสดงดังตารางที่ 17

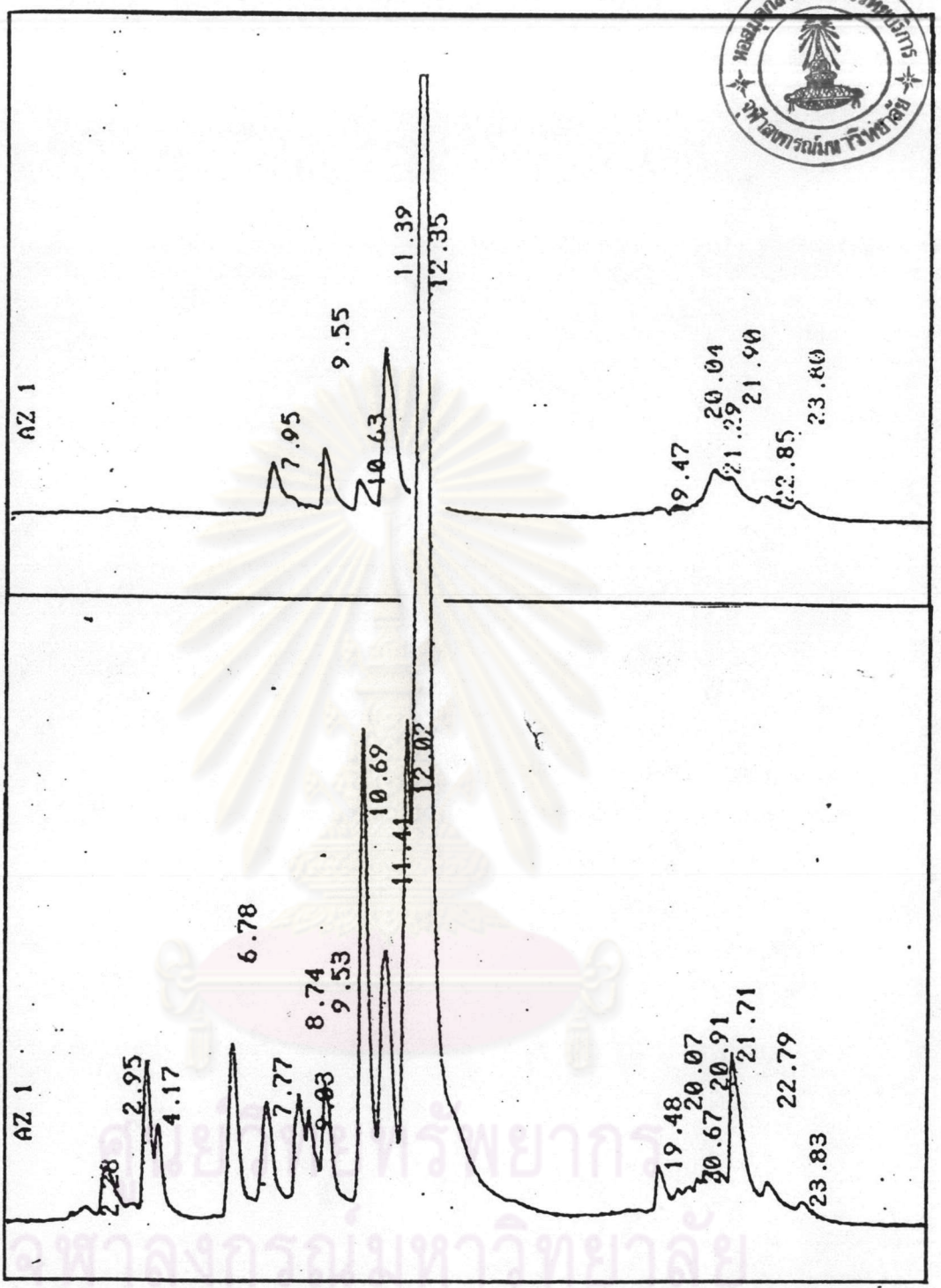


รูปที่ 38 ลักษณะโครมาโทแกรมของสารสกัดกระเทียมที่วิเคราะห์โดย ทีแอลซี-เดนซิโตเมตรี

1) โครมาโทแกรมของสารมาตรฐานอัลลิอิน

2) โครมาโทแกรมของสารสกัดกระเทียมใน เมธานอล70%

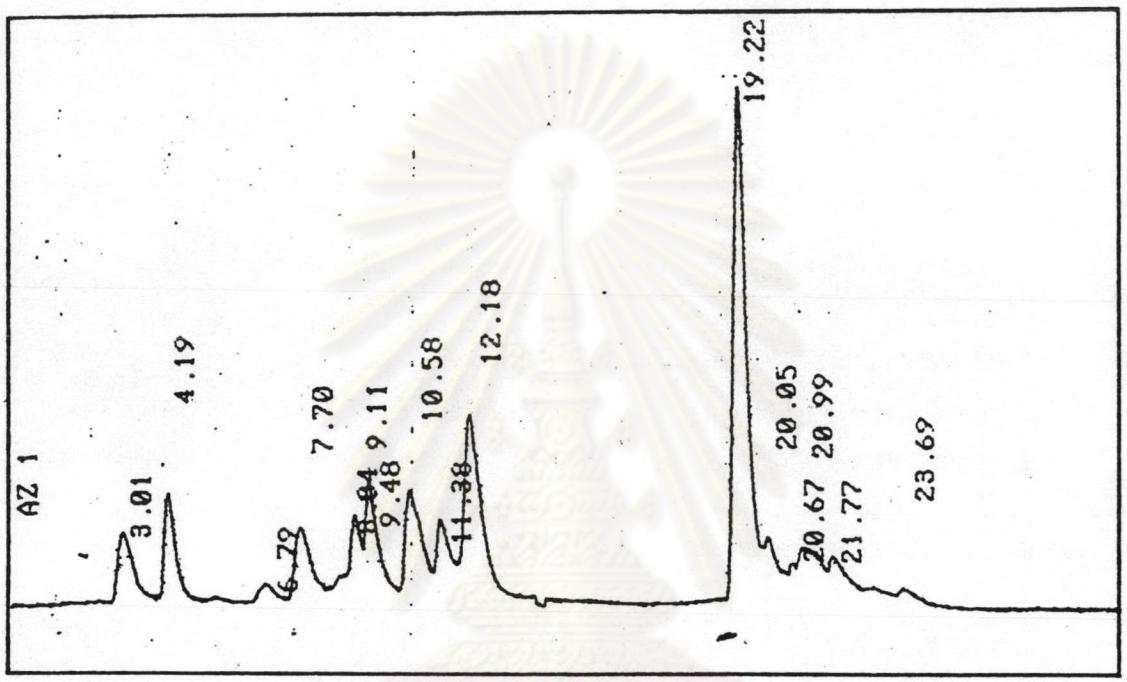
ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 39 ลักษณะโครมาโทแกรมของสารสกัดกระเทียมที่วิเคราะห์โดยเทคนิค เอชพีแอลซี

1) โครมาโทแกรมของสารมาตรฐานอัลลิอิน

2) โครมาโทแกรมของสารสกัดกระเทียมในเมธานอล70%



รูปที่ 40 ลักษณะโครมาโทแกรมของสารสกัดกระเทียมที่วิเคราะห์โดยเทคนิค เอชพีแอลซี

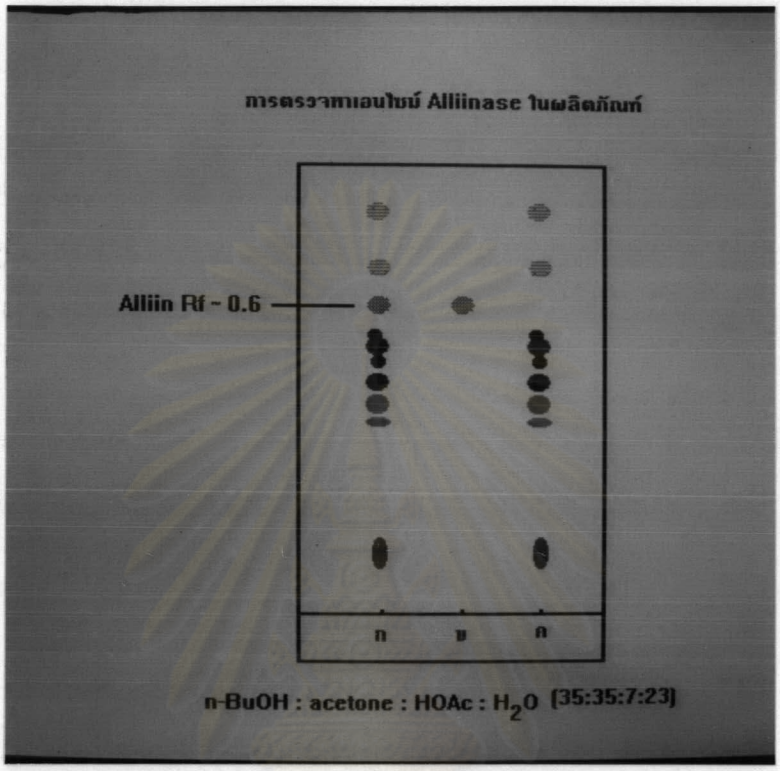
ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 17 ปริมาณอัลลิอินของผลิตภัณฑ์กระเทียมที่ใช้เป็นอาหารเสริมสุขภาพ ซึ่งวิเคราะห์โดยเทคนิค ทีแอลซี-เดนซิโตเมตรี และ เอชพีแอลซี

ตัวอย่างที่	จำนวนตัวอย่าง (n)	ปริมาณอัลลิอินที่วิเคราะห์โดยเทคนิค (ร้อยละโดยน้ำหนักแห้ง)	
		TLC-densitometry	HPLC
1	5	1.75 ± 0.07	1.85 ± 0.03
2	5	1.30 ± 0.01	1.32 ± 0.12
3	5	ตรวจไม่พบ	0.57 ± 0.04
4	5	1.18 ± 0.13	1.25 ± 0.01
5	5	1.85 ± 0.06	2.01 ± 0.06
6	5	2.05 ± 0.13	2.34 ± 0.05
7	5	2.15 ± 0.08	2.24 ± 0.08
8	5	ตรวจไม่พบ	0.48 ± 0.01
9	5	1.87 ± 0.07	2.12 ± 0.08
10	5	ตรวจไม่พบ	0.23 ± 0.01
11	5	1.37 ± 0.07	1.45 ± 0.13

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

7.2 การตรวจหาการมีอยู่ของเอนไซม์อัลลิอินเนสในผลิตภัณฑ์กระเทียมที่ตรวจพบสารอัลลิอิน



รูปที่ 41 ลักษณะโครมาโทแกรมของผลิตภัณฑ์กระเทียมที่นำมาตรวจหาการมีอยู่ของเอนไซม์อัลลิอินเนส ในสภาวะที่เหมาะสม

ก) โครมาโทแกรมของผลิตภัณฑ์กระเทียมที่ตรวจพบสารอัลลิอิน

ข) โครมาโทแกรมของสารมาตรฐานอัลลิอิน

ค) โครมาโทแกรมของผลิตภัณฑ์กระเทียมที่ตรวจพบสารอัลลิอิน หลังนำไปทำการ incubate ในสภาวะเหมาะสมของการทำงานของเอนไซม์อัลลิอินเนส