บทที่ 3
วัสดุอุปกรณ์ และวิธีการ

วัสดุอุปกรณ์

1. กระเทียมตัวอย่าง

กระเทียมตัวอย่างที่ใช้ในการศึกษาครั้งนี้ มีอยู่ 2 รูปแบบ คือ หัวกระเทียม (Garlic Bulbs) และผลิตภัณฑ์ของกระเทียม (Garlic Preparations) ตัวอย่างหัวกระเทียมพันธุ์ต่างๆนี้ ได้รับความอนุเคราะห์จากสถาบันวิจัยพืชสวน กรมวิชาการเกษตร ซึ่งเก็บมาจากสถานีทดลองพืชสวนฝาง อ.ฝาง จังหวัดเชียงใหม่ และสถานีทดลองพืชสวน จังหวัดศรีสะเกษ นอกจากนั้นยังได้ทำการเก็บตัวอย่างจากท้องตลาดในจังหวัดศรีสะเกษและกรุงเทพมหานคร โดยรายละเอียดต่างๆของหัวกระเทียมที่ใช้ในการทดลองได้สรุปไว้ในตารางที่ 8

ตารางที่ 8 รายละเอียดของกระเทียมพันธุ์ต่างๆที่ใช้ในการวิจัย

แหล่งที่มา	พันธุ์ *	ช่วงระยะเวลาในการเพาะปลูก	ระยะเวลาในการเพาะปลูก
สถานีทดลองพืชสวนฝาง	จีน1	29 ตค. - 11 มีค. 37	4 เดือน 15 วัน
	จีน2	29 ตค. - 11 มีค. 37	4 เดือน 15 วัน
	ไต้หวัน	29 ตค. - 11 มีค. 37	4 เดือน 15 วัน
	เชียงใหม่	29 ธค. 36 - 7 เมย. 37	3 เดือน 14 วัน
	เชียงตุง	29 ตค. - 11 มีค. 37	4 เดือน 15 วัน
	บางช้าง	10 พย. 36 - 2 มีค. 37	3 เดือน 26 วัน
	ศรีสะเกษ	10 พย. 36 - 1 มีค. 37	3 เดือน 25 วัน
สถานีทดลองพืชสวนศรีสะเกษ	ศรีสะเกษ	18 ตค. 36 - 23 กพ. 37	4 เดือน 15 วัน
ตลาดในจังหวัดศรีสะเกษ	ศรีสะเกษ	ไม่ทราบแน่นอน	ไม่ทราบแน่นอน
ตลาดในจังหวัดกรุงเทพ	เชียงใหม่	ไม่ทราบแน่นอน	ไม่ทราบแน่นอน

*ทุกพันธุ์ทำการเพาะปลูกจากหัว

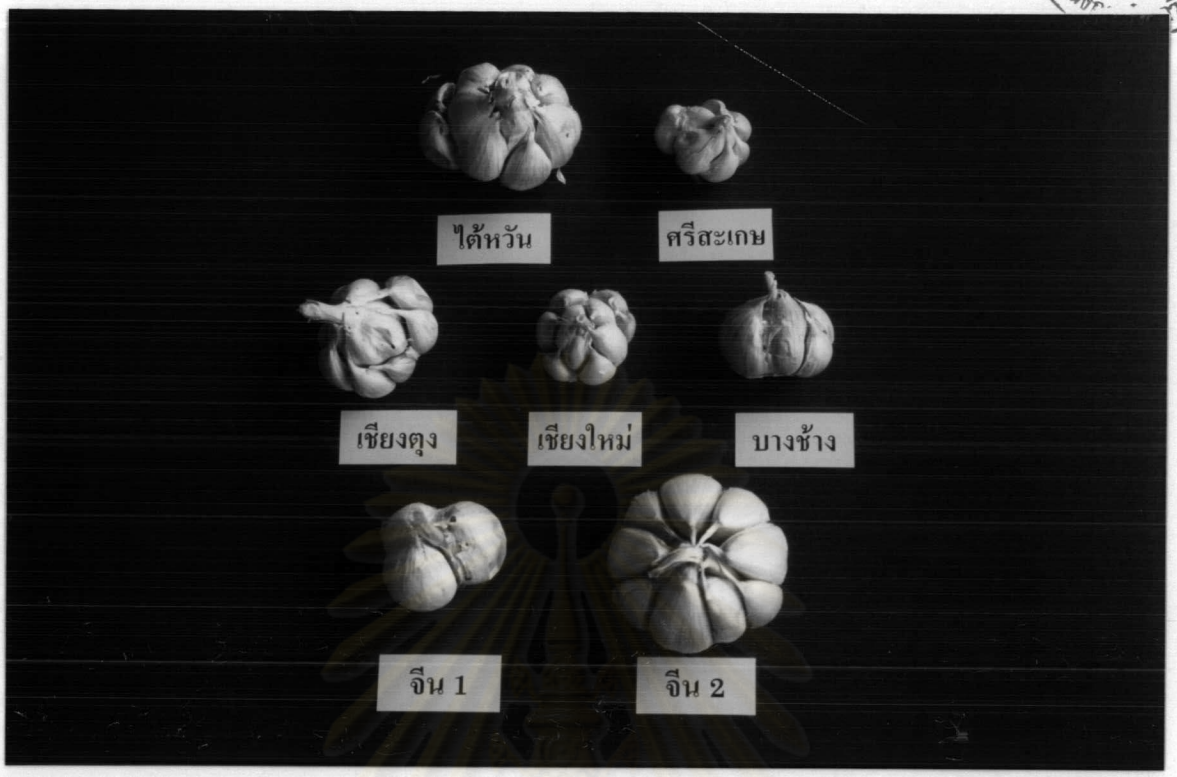
I16701112

สำหรับตัวอย่างผลิตภัณฑ์กระเทียมที่ใช้ในการศึกษาครั้งนี้ จะเลือกเฉพาะผลิตภัณฑ์ที่เป็นอาหารเสริมสุขภาพ (Health Food) ที่มีลักษณะเป็นผงในแคปซูล หรือเป็นยาตอกเม็ดเท่านั้น เนื่องจากจุดมุ่งหมายของการศึกษานี้มุ่งเน้นที่การหาปริมาณ อัลลิอิน ดังนั้นผลิตภัณฑ์ในรูปแบบของน้ำมันกระเทียมสกัดบรรจุแคปซูล จึงไม่ได้นำมาเป็นตัวอย่างในการศึกษาโดยตัวอย่างของผลิตภัณฑ์ต่างๆเหล่านี้ ได้มาจากร้านขายยาในกรุงเทพมหานครและจากต่างประเทศบ้างบางส่วน โดยรายละเอียดของผลิตภัณฑ์กระเทียมได้แสดงดังตารางที่ 9

ตารางที่ 9 รายละเอียดของผลิตภัณฑ์กระเทียมที่ใช้ในการวิจัย

ชื่อการค้า	แหล่งผลิต	รูปแบบของผลิตภัณฑ์
Immunytop	บริษัท ขาวละออ ประเทศไทย	ผงในแคปซูล
Cholfibrin	องค์การเภสัชกรรม ประเทศไทย	ผงในแคปซูล
Kyolic formular 100	สหรัฐอเมริกา	ผงในแคปซูล
Kwai	เยอรมัน	ยาเม็ดเคลือบน้ำตาล
Nature Plus (Garlite)	สหรัฐอเมริกา	ผงในแคปซูล
Natuse Herb	สหรัฐอเมริกา	ผงในแคปซูล
Nature Made	สหรัฐอเมริกา	ยาตอกอัดเม็ด
Concentrate Garlic (Boots)	อังกฤษ	ยาเม็ดเคลือบน้ำตาล
Garlique	สหรัฐอเมริกา	ยาตอกอัดเม็ด
Thrifty	สหรัฐอเมริกา	ยาตอกอัดเม็ด
Your Life	สหรัฐอเมริกา	ยาตอกอัดเม็ด

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 12 ภาพถ่ายของกระเทียมพันธุ์ต่างๆ

รูปที่ 13 ภาพถ่ายผลิตภัณฑ์กระเทียมชนิดต่างๆ

2. สารเคมี : สารเคมีทั้งหมดที่ใช้ตลอดการศึกษานี้

2.1 สารมาตรฐาน อัลลิอิน เกรดสำหรับเอชพีแอลซี (Authentic Alliin จาก Extrasynthese 69730 Genay, France) Lot number 93050601

2.2 เมไธโอนีน (Methionine ; Sigma Chemical Company , Montana , USA.)

2.3 ซีสเตอีน (Cysteine ; Sigma Chemical Company , Montana , USA.)

2.4 โซเดียมอะซิเตด เกรดสำหรับวิเคราะห์ (Soldium acetate, CH_3COONa ,AR ; E. Merck, Damstadt, Germany)

2.5 นินไฮดรีน (Ninhydrin , $C_4H_9O_3.H_2O$,AR ; AJAX Chemical PTY Limited, Australia)

2.6 กรดแอซีติกล้วน เกรดสำหรับวิเคราะห์ (98% Glacial Acetic Acid,AR. ; E. Merck, Damstadt, Germany)

2.7 เมธานอล เกรดสำหรับวิเคราะห์ (Methanol, AR ; E. Merck, Damstadt, Germany)

2.8 เมธานอล เกรดสำหรับเอชพีแอลซี (Methanol, HPLC; E. Merck, Damstadt, Germany)

2.9 อะซีโตน เกรดสำหรับวิเคราะห์ (Acetone, AR ; E. Merck, Damstadt, Germany)

2.10 นอร์แมล-บิวทานอล เกรดสำหรับวิเคราะห์ (n-Butanol ; E. Merck, Damstadt, Germany)

2.11 O-phthaldialdehyde (OPA ;Sigma Chemical Company , Montana , USA.)

2.12 น้ำกลั่น 3 ครั้ง

2.13 แผ่นซิลิกาเจล 60 F_{254} (TLC aluminium sheets Silica gel 60 F_{254} no. 1.05554; E. Merck, Damstadt, Germany)

2.14 โทลูอีน เกรดสำหรับวิเคราะห์ (Toluene ,AR ; E. Merck, Damstadt, Germany)

2.15 นอร์แมล-โพรพานอล เกรดสำหรับวิเคราะห์ (n-Propanol,AR; E. Merck, Damstadt, Germany)

3. เครื่องมือ : เครื่องใช้ในการศึกษาครั้งนี้ได้แก่

3.1 เครื่องชั่งสำหรับการวิเคราะห์ (Sartorious-Werke GMBH, Germany)

3.2 เครื่องกลั่นหาปริมาณน้ำ (Toluene Moistuse Apparatus, 1992)

3.3 เครื่องวัดความเป็นกรด-ด่าง (pH meter)

3.4 ตู้อบ (Hot Air oven)

3.5 เครื่องทีแอลซี-เดนซิโตเมตรี (Dual-Wavelenght TLC -Scanner model CS - 930 ; Shimadsu)

3.6 ไฮเปอร์ฟอร์แมนซิลิควิดโครมาโทกราฟี (High Performance Liquid Chromatography, Varian Chromatograp System ; Varian U.S.A.) HPLC ประกอบไปด้วย :

3.6.1 ระบบการควบคุมตัวทำละลาย (Solvent Delivery System) เป็นรุ่น Varian model 9010 ternary solvent delivery system

3.6.2 เครื่องตรวจสอบสาร (Detector) เป็น Fluorichrom IIITM detector

3.6.3 เครื่องแปลข้อมูล (Integrator) เป็น Varian model 4400 integrator ซึ่งอ่านค่าเป็นพื้นที่ใต้พีค

3.6.4 เครื่องฉีดสารตัวอย่างอัตโนมัติ (Autosampler) เป็น Varian model 9095 Autosampler

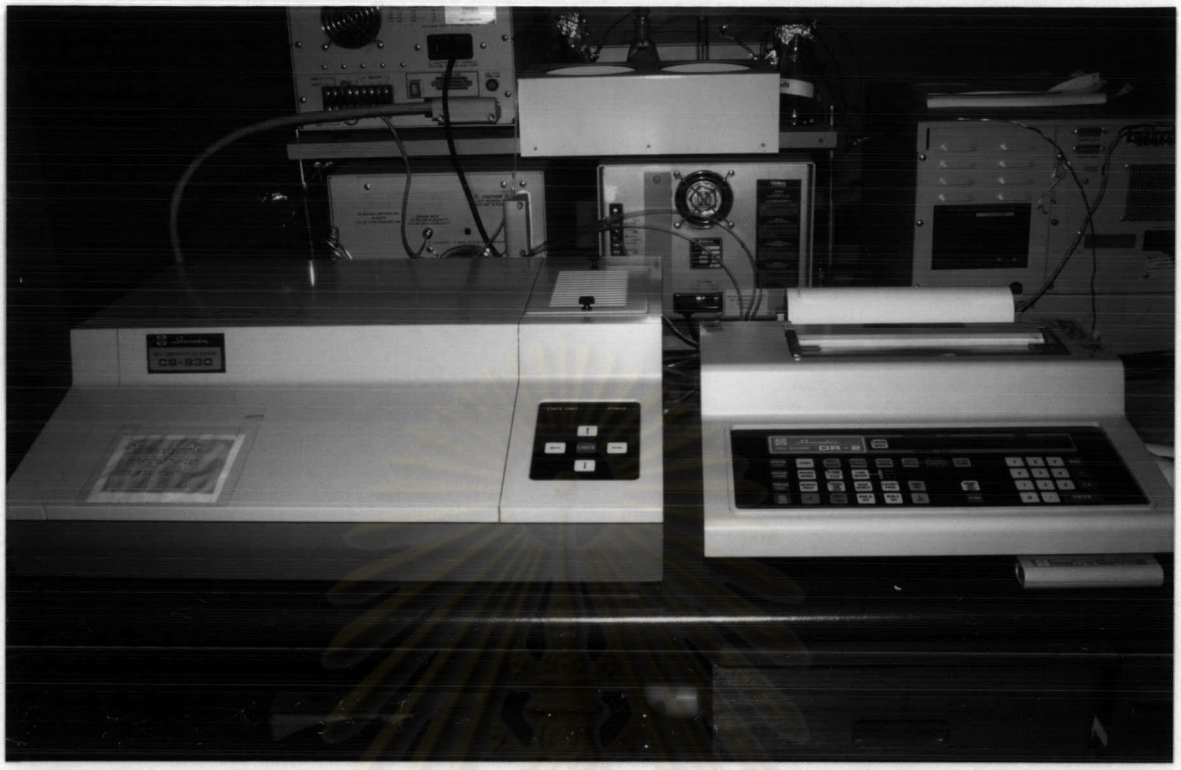
3.7 โครมาโตกราฟิกคลอลัมน์ (Chromatographic column)

เป็นคอลัมน์แบบเหล็กกล้าไร้สนิม เป็น octadecylsilane (C18) Reverse phase column ขนาดอนุภาค 4.5 ไมครอน ความยาว 150 มม. เส้นผ่าศูนย์กลางภายใน 4.0 มม. (Octadecylsilane (C18) reverse phase column, 4.5 μm in particle size, 150 mm.x 4.0 mm. I.D. ; Varian U.S.A.)

3.8 การ์ดคอลัมน์ (Guard-column)

เป็นคอลัมน์แบบเหล็กกล้าไร้สนิม เป็น octadecylsilane (C18) Reverse phase column ขนาดอนุภาค 37 - 50 ไมครอน ความยาว 50 มม. เส้นผ่าศูนย์กลางภายใน 4.0 มม. (Octadecylsilane (C18) reverse phase column, 37 -50 μm in particle size, 50 mm.x 4.0 mm. I.D. ; Varian U.S.A.)

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 14 ภาพถ่ายเครื่องทีแอลซี-เดนซิโตเมตรี

รูปที่ 15 ภาพถ่ายเครื่องเอชพีแอลซี

วิธีการ

ขั้นตอนการศึกษานี้เพื่อให้ได้มาซึ่งวิธีการวิเคราะห์หาปริมาณสารอัลลิอิน โดยเทคนิคทางทีแอลซี-เดนซิโตเมตรี สามารถแบ่งออกเป็น 4 ส่วนได้ดังนี้

ส่วนที่ 1 การสุ่มตัวอย่าง

ส่วนที่ 2 การหาปริมาณน้ำในตัวอย่างหัวกระเทียม

ส่วนที่ 3 การหาสภาวะที่เหมาะในการหาปริมาณอัลลิอิน ด้วยเทคนิค ทีแอลซี-เดนซิโตเมตรี

3.1 การทดลองเพื่อเลือกระบบตัวทำละลายของวัฏภาคเคลื่อนที่ (Mobile Phase) ที่เหมาะสม

3.2 การตรวจหาตำแหน่งสารที่ต้องการวิเคราะห์บนแผ่นโครมาโทกราฟีฉาบบาง(SiO_2)

3.3 ศึกษาหาความยาวคลื่น (λ max) ที่เหมาะสมในการตรวจวัดสารอัลลิอินที่ปรากฏบนแผ่นโครมาโทกราฟีฉาบบาง

3.4 สภาวะการวิเคราะห์สารอัลลิอินของเครื่องมือ TLC-Densitometer

3.5 การศึกษาสัดส่วนที่เหมาะสมของสารละลายนินไฮดรินกับพื้นที่ของแผ่นโครมาโทกราฟีฉาบบางที่ใช้ในการตรวจสอบหาปริมาณอัลลิอิน

3.6 การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการสกัดสารอัลลิอิน

3.7 การสร้างกราฟมาตรฐานของอัลลิอินเพื่อหาช่วงความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐานอัลลิอินที่มีความสัมพันธ์กับพีนที่ใต้พีคในลักษณะเส้นตรง

3.8 การวิเคราะห์หาปริมาณสารอัลลิอินจากตัวอย่างกระเทียม

3.9 การศึกษาหาการมีอยู่ของเอนไซม์อัลลิอินเนสในผลิตภัณฑ์

ส่วนที่ 4 การศึกษาวิธีวิเคราะห์การหาปริมาณอัลลิอินโดยเทคนิคไฮเปอร์ฟอร์แมนซ์ลิควิดโครมาโทกราฟี (High Performance Liquid Chromatography, HPLC)

4.1 การเตรียมอนุพันธ์ของสารอัลลิอินก่อนฉีดเข้าคอลัมน์(Pre-Column Derivatization)

4.2 การเลือกระบบตัวทำละลายของวัฏภาคเคลื่อนที่ที่เหมาะสมในการแยกสารอัลลิอิน

4.3 การตรวจวัด(Detection)สารอัลลิอิน

4.4 องค์ประกอบของเครื่องไฮเปอร์ฟอร์แมนซ์ลิควิดโครมาโทกราฟี(HPLC) สำหรับการวิเคราะห์สารอัลลิอิน

4.5 การหาสารมาตรฐานภายใน (Internal Standard) ที่เหมาะสม

4.6 การสร้างกราฟมาตรฐานของอัลลิอินโดยวิธี เอชพีแอลซี

ส่วนที่ 1 การสุ่มตัวอย่าง

การสุ่มตัวอย่างเป็นขั้นตอนที่สำคัญขั้นตอนแรก เพื่อให้ได้ตัวอย่างกระเทียมที่เป็นตัวแทนของตัวอย่างทั้งหมดที่จะนำมาทำการศึกษา หัวกระเทียมพันธุ์ต่างๆที่ได้มาโดยที่เก็บมาได้จากแต่ละแหล่งจะมีน้ำหนักประมาณ 6-7 กก. จากนั้นกระเทียมแต่ละพันธุ์จะถูกแบ่งออกเป็น 5 กลุ่ม โดยการสุ่ม กลุ่มละประมาณ 1 กก. แล้วจึงทำการเลือกกระเทียมจากแต่ละกลุ่มเพื่อนำมาทำการทดลองต่อไป

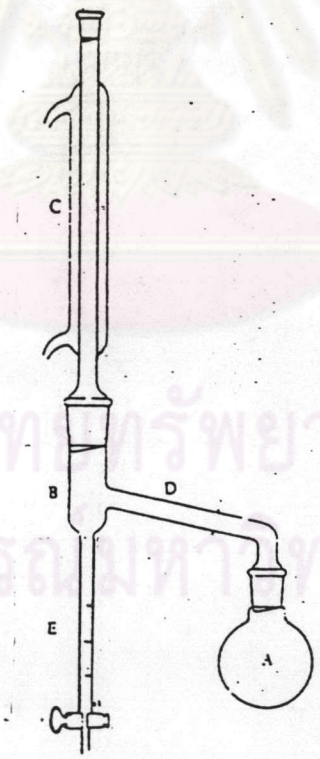
สำหรับผลิตภัณฑ์กระเทียม จะทำการสุ่มตัวอย่างโดยนำผลิตภัณฑ์มาครั้งละ 5 เม็ดหรือแคปซูล แล้วนำมาบด (ผงกระเทียมอัดเม็ด)หรือแยกเอาตัวแคปซูลออก แล้วจึงนำมาชั่งให้ได้น้ำหนักตามที่ต้องการ ทำเช่นนี้ทั้งหมด 5 ครั้งในแต่ละตัวอย่าง เพื่อนำผลที่ได้ไปหาค่าเฉลี่ยต่อไป

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ส่วนที่ 2 การหาปริมาณน้ำในตัวอย่างกระเทียม

การหาปริมาณน้ำในตัวอย่างนี้นมีอยู่หลายวิธีด้วยกัน เช่น การวัดปริมาตร (Volumetric method) วิธีการไตรเตรด (Tritrimetric method) และวิธีกราวิเมตริค (Gravimetric method) เป็นต้น ในการศึกษาครั้งนี้ การหาปริมาณน้ำจะใช้วิธีการวัดปริมาตร ที่เรียกกันว่า Azeotropic Distillation Method โดยมีวัตถุประสงค์เพื่อการคำนวนหาปริมาณสารที่ทำการศึกษาซึ่งคำนวนโดยคิดจากพืชตัวอย่างที่ปราศจากน้ำ ซึ่งหากไม่คำนวนบนพื้นฐานนี้ ปริมาณความชื้นที่แตกต่างกันไปในแต่ละตัวอย่างจะทำให้ได้ผลหรือการวิเคราะห์ผลการทดลองผิดพลาดจากความเป็นจริงได้

เครื่องมือที่ใช้ในการหาปริมาณน้ำในการศึกษาหาปริมาณน้ำในครั้งนี้เป็นชุดกลั่นมาตรฐานแบบ Toluene Moisture Apparatus ซึ่งเป็นแบบมาตรฐานของ British Pharmacopoiea, 1992 ซึ่งแสดงดังรูปที่ 16



รูปที่ 16 เครื่องมือชุดกลั่นมาตรฐานแบบ Toluene Moisture Apparatus ซึ่งเป็นแบบมาตรฐานของ British Pharmacopoiea, 1992 .

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

วิธีการหาปริมาณน้ำในหัวกระเทียม ได้ดำเนินการการตามวิธีการของ BP 1992 ซึ่งมีขั้นตอนดังนี้

1. ทำความสะอาดหลอดวัดปริมาตรน้ำและ condenser ให้สะอาดอย่างแท้จริงด้วย cleaning mixture ล้างน้ำให้สะอาด แล้วอบให้แห้ง

2. เตรียม Toluene ที่จะใช้ โดยนำมาเขย่ากับน้ำจำนวนเล็กน้อย, แยกชั้นน้ำออก แล้วกลั่นให้น้ำส่วนเกินแยกออกจากชั้น toluene

3. ชั่งตัวอย่างหัวกระเทียมให้ได้น้ำหนักประมาณ 2-3 กรัม ใส่ลงในขวดกลั่น ต่อขวดกลั่นเข้ากับเครื่องมือครบชุด เติม toluene ที่กลั่นแล้วตามข้อ (2) ลงในขวดกลั่น 200 มล. โดยรินให้ไหลลงทางปลาย condenser (หากตัวอย่างเป็นผงละเอียดหรือชนิดที่จะเกิดการ bump ได้ง่ายเมื่อได้รับความร้อนควรใส่หลอด capillary ที่ลนปลายให้ตันข้างหนึ่งลงด้วย)

4. ให้ความร้อนอ่อนๆแก่ขวดกลั่นเป็นเวลา 15 นาที เมื่อ toluene เริ่มเดือดจึงเพิ่มความร้อนให้กลั่นได้ 2 หยด/วินาที จนกระทั่งน้ำเกือบทั้งหมดผ่านออกมาสู่หลอดรับแล้ว จึงเพิ่มอัตราเร็วของการกลั่นเป็นประมาณ 4 หยด/วินาที

5. เมื่อน้ำระเหยออกมาหมดแล้ว (ปริมาตรน้ำในหลอดรับคงที่) ให้ล้างภายในของหลอด condenser ด้วย toluene โดยเติมลงทางปลายทาง condenser แล้วกลั่นต่ออีก 5 นาทีแล้วจึงหยุดกลั่น ปล่อยให้หลอดรับเย็นลงจนถึงอุณหภูมิห้อง เมื่อชั้นของน้ำแยกจากชั้น toluene อย่างสมบูรณ์แล้ว จึงอ่านปริมาตรน้ำที่ได้รับคำนวนปริมาณน้ำในตัวอย่างสมุนไพรเป็นร้อยละปริมาตรต่อน้ำหนัก

ส่วนที่ 3 ศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการหาปริมาณอัลลิอิน ด้วยเทคนิคทีแอลซี-เดนซิโตเมตรี

3.1 การทดลองเพื่อเลือกระบบตัวทำละลายของวัฏภาคเคลื่อนที่ (Mobile Phase) ที่เหมาะสม

เพื่อให้การแยกของสาร อัลลิอิน ออกจากสารอื่นๆในสารสกัดกระเทียมตัวอย่าง โดยใช้วิธีการทางโครมาโทกราฟีฉาบบาง (Thin Layer Chromatography) การศึกษาถึงระบบตัวทำละลายของวัฏภาคเคลื่อนที่ จึงมีความสำคัญมาก การศึกษาครั้งนี้ได้ทำการทดลองแยกสารสกัดของกระเทียมในระบบตัวทำละลายของวัฏภาคเคลื่อนที่ และวัฏภาคคงที่ต่างๆ(Stationary phase) ดังแสดงรายละเอียดตามตารางที่ 10

ตารางที่ 10 รายละเอียดของระบบตัวทำละลายของวัฏภาคเคลื่อนที่ พร้อมอัตราส่วนและวัฏภาคคงที่ต่างๆ ของระบบที่นำมาศึกษา

วัฏภาคเคลื่อนที่ (Mobile Phase)	อัตราส่วน (Ratios)	วัฏภาคคงที่ (Stationary Phase)
n-BuOH: acetone: 98%HOAc:H_2O	35:35:7:23	Silica gel 60 F_{254}
	35:35:10:20	Silica gel 60 F_{254}
n-BuOH: 98%HOAc:H_2O (ใช้ส่วนบน)	50:10:40	Silica gel 60 F_{254}
n-BuOH:MeOH 98%HOAc:H_2O	40:10:10:10	Silica gel 60 F_{254}
		Cellulose
n-BuOH:n-PrOH 98%HOAc:H_2O	30:10:10:10	Silica gel 60 F_{254}
		Cellulose

3.2 การตรวจหาตำแหน่งสารที่ต้องการวิเคราะห์บนแผ่นโครมาโทกราฟีฉาบบาง

อัลลิอิน เป็นสารที่มีสูตรโครงสร้างเป็นสารจำพวกกรดอะมิโน อัลลิอิน ไม่สามารถดูดกลืนแสงหรือเรืองแสง ภายใต้แสงเหนือม่วง(UV-light) ได้ ดังนั้นในการตรวจวัดหาตำแหน่งของอัลลิอิน จึงต้อง อาศัยการเกิดปฏิกริยาอนุพันธ์ (Derivatization) เพื่อให้ได้อนุพันธ์ของอัลลิอิน ที่มีสี หรือเกิดการเรืองแสงเกิดขึ้น การเกิดปฏิกริยาอนุพันธ์ที่ใช้สำหรับเทคนิคการแยกสารด้วยโครมาโทกราฟีฉาบบางมีอยู่ 2 วิธี คือ

1. การเกิดปฏิกริยาอนุพันธ์ก่อนทำการแยก (Prechromatographic denivatization)
2. การเกิดปฏิกริยาอนุพันธ์หลังการแยก (Postchromatographic derivatization)

โดยทั่วๆไปมักนิยมใช้เทคนิคการเกิดปฏิกริยาอนุพันธ์หลังทำการแยก เนื่องจากมีข้อดี คือ สารที่ตรวจสอบนั้นไม่ได้ถูกเปลี่ยนรูปก่อนทำการแยก เมื่อทำการแยกสารด้วยเทคนิคโครมาโท-กราฟีฉาบบาง แล้วอาศัยการเกิดปฏิกริยาได้อนุพันธ์ที่มีสี หรือเรืองแสงเกิดขึ้น ค่า Rf value ที่ได้นั้นก็จะเป็นค่าที่แท้จริงของสารนั้นในระบบตัวทำละลายหนึ่งๆ ดังนั้นในการศึกษานี้จึงเลือกใช้วิธีการเกิดปฏิกริยาอนุพันธ์หลังการแยก โดยใช้สาร นินไฮดริน ซึ่งเป็นสารที่นิยมใช้ในการตรวจสอบสารจำพวกกรดอะมิโน เพื่อให้ได้อนุพันธ์ที่มีสีเกิดขึ้น

วิธีเตรียมสารละลายนินไฮดริน

ละลายสาร นินไฮดริน 60 มก. ในเมธานอลสัมบูรณ์(absolute methanol) 10 มล. จะได้สารละลาย นินไฮดริน ความเข้มข้น 6 มก./มล. สารละลายนี้ควรเตรียมขึ้นใหม่ๆก่อนการใช้เพื่อลดความผิดพลาดของผลการทดลอง เนื่องจากการสลายตัวของสาร เมื่อเก็บไว้เป็นเวลานาน

วิธีการทดลอง

นำสารสกัดกระเทียมที่ได้มาแต้ม ลงบนแผ่นโครมาโทกราฟีฉาบบาง จำนวน 5 มคล. จากนั้นนำไปทำการแยกในระบบตัวทำละลายของวัฏภาคเคลื่อนที่ที่เหมาะสม จำนวน 2 ครั้ง (double developed) นำแผ่นโครมาโทกราฟีฉาบบางที่ได้มาพ่นด้วยสารละลายนินไฮดริน แล้วนำไปอบที่ 100°ซ นาน 5 นาที สังเกตุตำแหน่งของ อัลลิอิน โดยเปรียบเทียบกับสารมาตรฐานอัลลิอิน ที่ทำควบคู่กันไป

3.3 ศึกษาหาความยาวคลื่นที่เหมาะสม (λ_{max}) ในการตรวจวัดสารที่ปรากฏบนแผ่นโครมาโท-กราฟีฉาบบาง

จากการเกิดปฏิกริยาอนุพันธ์หลังทำการแยก ระหว่างอัลลิอินกับสารนินไฮดริน จะได้อนุพันธ์ที่มีสีเกิดขึ้นแล้ว อนุพันธ์ของสารอัลลิอินที่เกิดขึ้นนี้จะมีความสามารถในการดูดกลืนแสงในความยาวคลื่นหนึ่งๆได้สูงสุด เนื่องจากในการศึกษาครั้งนี้เป็นการวิเคราะห์เชิงปริมาณ (Quantitative) ของสารอัลลิอิน ด้วยเทคนิคทีแอลซี-เดนซิโตเมตรี การหาความยาวคลื่นของสารอนุพันธ์อัลลิอิน จึงมีความสำคัญมากเนื่องจากการเลือกความยาวคลื่นที่เหมาะสมในการตรวจวัด จะทำให้เกิดความไวในการตรวจวัดสูงสุด

การหาความยาวคลื่นของสารอนุพันธ์ อัลลิอิน จะใช้เครื่องมือ Dual-Wavelenght TLC-scanner model CS-930 ของบริษัท Shimadsu โดยมีสภาวะของการตั้งเครื่องมือตามหัวข้อถัดไป

3.4 สภาวะการวิเคราะห์สารอัลลิอิน ของเครื่องมือ TLC-densitometer

ในการวิเคราะห์หาปริมาณอัลลิอิน จากตัวอย่างกระเทียมในการศึกษานี้ ได้ใช้เครื่องมือ Dual-Wavelength TLC-scanner model CS-930 ของบริษัท Shimadsu โดยมีรายละเอียดการตั้งเครื่องมือดังนี้

Lamp source	: Tungsten
Determination Mode	: Absorption-reflection mode

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

Scan width	: x = 6.0 มม.
	y = 0.05 มม.
Sensitivity	: High
Slit width	: 1.2 x 1.2 มม.^{2}
Wave lenght detector	: λ_{max} ของสารที่ทำการตรวจสอบ ซึ่งจากการทดลองพบว่ามีค่าเป็น 475 นาโนเมตร.

3.5 การศึกษาสัดส่วนที่เหมาะสมของสารละลายนินไฮดรินกับพื้นที่ของแผ่นโครมาโทกราฟีฉาบบางที่ใช้ในการตรวจสอบหาปริมาณอัลลิอิน

ในการศึกษาครั้งนี้เป็นการศึกษาเชิงปริมาณ (Quantitative) ของสารอัลลิอิน ดังนั้นการศึกษาถึงสัดส่วนที่เหมาะสมของสารละลายนินไฮดริน กับพื้นที่ผิวของแผ่นโครมาโทกราฟีฉาบบางที่ใช้ในการตรวจสอบหาปริมาณอัลลิอิน จึงมีความสำคัญมาก เนื่องจากในการตรวจสอบในแต่ละครั้ง ขนาดของแผ่นโครมาโทกราฟีฉาบบาง ที่ใช้จะมีความแตกต่างกันไป โดยจะใช้หลักการที่ว่าในความเข้มข้นของสารอัลลิอินที่คงที่ แต่มีความแตกต่างของปริมาณนินไฮดริน ที่ใช้จะมีผลต่อปริมาณ อัลลิอิน ที่ผ่านค่าได้จากเครื่อง TLC-densitometer อย่างไร

<u>วิธีการทดลอง</u>

นำสารละลายอัลลิอินมาตรฐานความเข้มข้นหนึ่งมาแต้มลงบนแผ่นโครมาโทกราฟีฉาบบาง ที่มีขนาด 2 x 10 ซม.^{2} แล้วนำมาทำการแยกโดยเทคนิคโครมาโทกราฟีฉาบบาง ในระบบตัวทำละลายที่เหมาะสมจำนวน 2 ครั้ง นำพ่นด้วยสารละลายนินไฮดริน ปริมาตรต่างๆโดยคำนวนหาสัดส่วนของ นินไฮดริน เป็น มก. ต่อพื้นที่ของแผ่นโครมาโทกราฟีฉาบบาง เป็นซม.^{2} ดังนี้คือ

0.5 มก. 1.0 มก. 2.0 มก. และ 3.0 มก./ซม.^{2}

นำแผ่นโครมาโทกราฟีฉาบบาง ต่างๆนี้มาอบที่ 100°ซ นาน 5 นาที แล้วนำไปอ่านค่าโดยใช้เครื่อง TLC-densitometer ตามสภาวะที่เหมาะสม นำผลที่ได้มาวิเคราะห์หาสัดส่วนที่เหมาะสมของสารละลาย นไฮดริน กับพื้นที่ของแผ่นโครมาโทกราฟีฉาบบาง ที่ใช้ในการตรวจสอบ

3.6 การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการสกัดสาร อัลลิอิน

เป็นที่ทราบกันดีว่า อัลลิอิน สามารถละลายได้ดีในน้ำ แต่ไม่ละลายในตัวทำละลายอินทรีย์อื่นๆ นอกจากนั้นอัลลิอิน ยังสามารถถูกทำละลายได้ด้วยขบวนการทางเอนไซม์ที่มีชื่อว่าเอนไซม์อัลลิอินเนสได้เป็นสาร อัลลิซินและสารอื่นๆ ดังนั้นในการวิแคราะห์หาปริมาณอัลลิอิน จึงจำเป็น

ต้องหาสภาวะที่จะทำการสกัดสารอัลลิอินออกมาได้หมดหรือมากที่สุดเท่าที่จะทำได้ พร้อมทั้งยับยั้งสภาวะที่อาจทำให้เกิดการสลายตัวของ อัลลิอิน โดยเฉพาะอย่างยิ่งที่เกิดจากการทำงานของเอนไซม์อัลลิอินเนส

จากรายงานการศึกษาพบว่า สารผสมระหว่างน้ำกับเมธานอลสามารถยับยั้งการทำงานของเอนไซม์อัลลิอินเนสได้ ดังนั้นในการศึกษาครั้งนี้ จึงทำการทดลองสกัดสารอัลลิอิน ออกจากตัวอย่างกระเทียมและผลิตภัณฑ์ ด้วยสารละลายเมธานอลในน้ำที่ความเข้มข้นต่างๆกัน ว่าสารละลายเมธานอลในน้ำความเข้มข้นเท่าใด ที่สามารถสกัดสารอัลลิอิน ออกมาได้มากที่สุด

<u>วิธีการทดลอง</u>

นำตัวอย่าง ถ้าเป็นหัวกระเทียมให้นำมาปอกเปลือกก่อน และถ้าเป็นผลิตภัณฑ์กระเทียมให้แยกเอาเฉพาะผงในแคปซูล หรือถ้าเป็นยาเม็ดให้นำมาบดให้ละเอียดแล้วนำมาทำการสกัดด้วยสารละลายเมธานอลในน้ำในสัดส่วนต่างๆกัน (95% 70% 80%และ 50%) ในกรณีที่เป็นหัวกระเทียมให้นำมาบดปั่นพร้อมสารละลายเมธานอลในเครื่องบดปั่นนานประมาณ 3 นาที จากนั้นนำสารที่สกัดได้มาเข้าเครื่องเหวี่ยงแรงสูง (Centrifuge) เก็บสารละลายใสส่วนบนมาทำการแยกโดยใช้เทคนิคโครมาโทกราฟีฉาบบางในวัฏภาคเคลื่อนที่ที่เหมาะสมแล้วนำมาวิเคราะห์หาปริมาณอัลลิอินโดยเทคนิคทาง ทีแอลซี-เดนซิโตเมตรีต่อไป

3.7 การสร้างกราฟมาตรฐานของอัลลิอิน เพื่อหาช่วงความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐานอัลลิอิน ที่มีความสัมพันธ์กับพื้นที่ใต้พีค ในลักษณะเส้นตรง

ทำการทดลองหาช่วงความเข้มข้นของสารอัลลิอิน ที่เป็นสัดส่วนโดยตรงกับการดูดกลืนแสงตามกฎของเบียร์ (Beer's Law) ในช่วงที่กว้างพอที่ใช้ในการวิเคราะห์โดยทำการทดลองในช่วงความเข้มข้น 12.5 - 1000.0 มคก./มล. เพื่อนำมาสร้างกราฟมาตรฐาน (Calibration Curve) ของอัลลิอิน ต่อไป

<u>วิธีการเตรียมสารละลายมาตรฐานของอัลลิอิน</u>

จากสารมาตรฐาน อัลลิอิน เกรด HPLC Lot number 93050601 ชั่งมาอย่างแม่นยำ 10.0 มลก. แล้วนำมาละลายใน เมธานอล70% จนครบปริมาตร 10 มล. ในขวดปรับปริมาตร จะได้สารละลายมาตรฐานอัลลิอิน ที่มีความเข้มข้น 1 มก./มล. แล้วนำสารละลายที่ได้นี้มาทำการเจือจางด้วย

เมธานอล70% เพื่อให้ได้สารละลายมาตรฐาน อัลลิอิน ที่มีความเข้มข้น ดังต่อไปนี้ 12.5 25 50 100 200 400 800 และ 1000 มคก./มล.

วิธีการสร้างกราฟมาตรฐานของอัลลิอิน

นำสารละลายมาตรฐาน อัลลิอิน ที่มีความเข้นข้นต่างๆกันที่เตรียมไว้มาแต้ม ลงบนแผ่นโครมาโทกราฟีฉาบบาง จำนวน 5 มคล. โดยใช้เข็มฉีดยาขนาดเล็ก (micro syringe) จากนั้นนำไปทำแยกในระบบตัวทำละลายของวัฏภาคเคลื่อนที่ที่เหมาะสม เป็นจำนวน 2 ครั้ง (double development) แล้วจึงนำแผ่นโครมาโทกราฟีฉาบบาง ที่ได้มาพ่นด้วยสารละลาย นินไฮดริน ในสัดส่วนที่เหมาะสมดังที่กล่าวไปแล้วในข้างต้น จากนั้นนำมาอบที่ 100°ซ นาน 5 นาที นำแผ่นโครมาโทกราฟีฉาบบาง ที่ผ่านขบวนการต่างๆมาตรวจวัดโดยใช้เครื่อง TLC-densitometer ตามสภาวะที่กล่าวไปแล้วข้างต้น โดยสารละลายแต่ละความเข้มข้นจะถูกทำการทดลองอย่างน้อย 3 ครั้ง ผลที่ได้จะถูกนำมาเขียนกราฟระหว่างพื้นที่ใต้พีคของอัลลิอิน กับความเข้มข้นของอัลลิอิน เพื่อหาช่วงความเข้มข้นของสาร อัลลิอิน ที่ให้ความสัมพันธ์ในลักษณะเส้นตรง

3.8 การวิเคราะห์หาปริมาณสาร อัลลิอิน จากตัวอย่างกระเทียม

วิธีการทดลอง

นำสารสกัดกระเทียมตัวอย่างที่ได้มาทำการแต้ม ลงบนแผ่นโครมาโทกราฟีฉาบบาง โดยใช้ปริมาตร 5 มคล. แล้วนำมาผ่านกระบวนการแยกโดยใช้เทคนิคโครมาโทกราฟีฉาบบาง ในระบบตัวทำละลายที่เหมาะสมจำนวน 2 ครั้ง นำแผ่นโครมาโทกราฟีฉาบบาง ที่ได้มาพ่นด้วนสารละลาย นไฮดริน ในสัดส่วนที่คำนวนได้ แล้วนำไปอบที่ 100°ซ นาน 5 นาที นำแผ่นโครมาโท-กราฟีฉาบบาง ที่ได้ผ่านกระบวนการข้างต้นนี้ มาทำการอ่านค่าโดยใช้เครื่องมือ TLC-densitometer ผลที่ได้จะแสดงออกมาเป็นค่าของพื้นที่ใต้พีค นำค่าที่ได้นี้มาคำนวนเป็นปริมาณอัลลิอิน โดยอาศัยค่าความสัมพันธ์ระหว่างกราฟมาตรฐาน สำหรับตัวอย่างที่เป็นหัวกระเทียมให้หาปริมาณอัลลิอินในน้ำหนักแห้ง โดยใช้ค่าปริมาณน้ำที่หาได้มาคำนวณ

3.9 การศึกษาหาการมีอยู่ของเอนไซม์อัลลิอินเนสในผลิตภัณฑ์กระเทียม

จากแนวทางในการพัฒนาผลิตภัณฑ์ เนื่องจากต้องการให้ผลิตภัณฑ์ที่ได้มีองค์ประกอบเทียบเท่ากระเทียมสดมากที่สุด จึงศึกษาถึงการมีอยู่ของเอนไซม์อัลลิอินเนสในผลิตภัณฑ์กระเทียม โดยการศึกษานี้จะทำการดูความสามารถของเอนไซม์อัลลิอินเนสในการเปลี่ยน อัลลิอิน ในสภาวะที่เหมาะสม

วิธีการทดลอง

นำผลิตภัณฑ์กระเทียมที่ต้องการทดสอบมาบดให้ละเอียด แล้วนำมาชั่งอย่างแม่นยำหนัก 0.1 กรัม ละลายในน้ำกลั่น 3 มล. ตั้งทิ้งไว้ 10 นาที เพื่อให้การเกิดปฏิกริยาของเอนไซม์ในผลิตภัณฑ์เกิดได้อย่างสมบูรณ์ (ถ้ามี) จากนั้นทำการปรับปริมาตรด้วยเมธานอลสัมบูรณ์ จนครบ 10 มล. เพื่อให้ได้ความเข้มข้นสุดท้ายของเมธานอลเป็น 70% นำสารละลายที่ได้มาใส่เครื่องหมุนเหวี่ยงความเร็วสูง นำสารละลายใสส่วนบนมาทำการแยกด้วยเทคนิคโครมาโทกราฟีฉาบบาง และทำการตรวจสอบหาสารอัลลิอิน ด้วยสารละลาย นินไฮดริน เช่นที่กล่าวไปแล้ว

ส่วนที่ 4 การศึกษาวิธีวิเคราะห์การหาปริมาณ อัลลิอิน โดยเทคนิคโฮเปอร์ฟอร์แมนซ์ลิควิดโครมาโทกราฟี (High Porformance Liquid Chromatography, HPLC)

การศึกษาในขั้นนี้จะประกอบด้วยขั้นตอนย่อยๆ 6 ขั้นตอนดังมีรายละเอียดต่อไปนี้

4.1 การเตรียมอนุพันธ์ของสาร อัลลิอิน ก่อนฉีดสู่คอลัมน์ (Pre-column derivatization)

การเตรียมอนุพันธ์ของสารก่อนฉีดเข้าคอลัมน์ (Pre-column derivatization) คือเป็นขั้นตอนที่เกิดขึ้นก่อนที่จะทำการแยกโดยเอชพีแอลซี โดยมีจุดประสงค์เพื่อใช้เพิ่มchromatographic performance เช่น การแยกที่ดีขึ้น (resolution) และ/หรือการเกิดความสมมาตรของพีค (peak symmetry) การเพิ่มความคงตัวของสารที่ไม่คงตัว การเปลี่ยน retention time ของสารและการเพิ่ม selectivity และ/หรือ sensitivity ของสารที่ต้องการวิเคราะห์

ในกรณีของการศึกษาครั้งนี้ อัลลิอิน เป็นสารที่ไม่ดูดกลืนแสงหรือเรืองแสงได้ด้วยตัวเอง จึงต้องอาศัยการเกิดปฏิกริยาอนุพันธ์กับสารที่เหมาะสมในที่นี้จึงเลือกใช้ O-Phthaldialdehyde reagent solution (OPA) ซึ่งเป็นสารที่มีความจำเพาะเจาะจงต่อสารจำพวกเอมีน และกรดอะมิโน ซึ่งทำให้เกิดอนุพันธ์ก่อนฉีดเข้าสู่คอลัมน์ ที่วิเคราะห์ด้วย reverse-phase HPLC โดยอนุพันธ์ที่เกิดขึ้นนี้สามารถตรวจสอบด้วยเครื่องตรวจวัดการเรืองแสงได้ (Fluorescence Detector)ซึ่งมีความไวสูง

สารละลาย OPA จะมีความเป็นกรด-ด่าง ที่ 10.4 (pH = 10.4) ประกอบไปด้วย Brij 35, O-phthaldialdehyde, methanol, 2-mercaptoethanol, potassium hydroxide และ boric acid

วิธีการทดลอง

นำสารละลายตัวอย่างจำนวน 20 มคล. มาผสมกับสาร OPA จำนวน 400 มคล. ซึ่งเป็นปริมาณ OPA ที่มากเกิดพอในการเกิดปฏิกริยา ทำการผสมสารโดยใช้ mode automix ของเครื่อง Autosampler ของบริษัท Varian model 9095 ซึ่งสามารถฉีดตัวอย่างได้จำนวน 105 ตัวอย่าง อย่างต่อเนื่อง จากนั้นให้เวลาในการเกิดปฏิกริยานาน 1 นาที แล้วจึงฉีดเข้าสู่คอลัมน์โดยเครื่องเดียวกันนี้

4.2 การเลือกระบบตัวทำละลายของวัฏภาคเคลื่อนที่ ที่เหมาะสมในการแยก อัลลิอิน

ในการศึกษาการแยกของสาร อัลลิอิน โดยใช้เทคนิคเอชพีแอลซี ได้ทำการปรับปรุงวัฏภาคเคลื่อนที่ ที่ใช้ในการวิเคราะห์สารจำพวกกรดอะมิโน คือ สารละลายโซเดียมอะซิเตด 0.1 M pH 7.2 ในน้ำ เมธานอล และ เตตราไฮโดรฟิวแรน (THF) ในอัตราส่วน900:95:5กับเมธานอลสัมบูรณ์ แทนที่จะใช้ระบบวัฏภาคเคลื่อนที่ ที่เคยรายงานไว้ในวารสารต่างๆเช่น Tetrahydrofuran (THF) / 1,4-dioxane / Acetronitrile / 0.045 M phosphate bufer pH 7.15 เนื่องจากสารต่างๆที่ใช้นี้มีราคาค่อนข้างสูงเมื่อเปรียบเทียบกับ เมธานอล

การศึกษาการแยกของสารอัลลิอิน โดยเทคนิคเอชพีแอลซี ด้วยวัฏภาคเคลื่อนที่ที่กล่าวไปแล้วนั้น จะทำการชะสารออกจากคอลัมน์โดยเปลี่ยนความแรงของวัฏภาคเคลื่อนที่ไปตามระยะเวลา (Step-gradient elution) โดยทำการปรับอัตราส่วน, อัตราการไหลของวัฏภาคเคลื่อนที่เพื่อให้ได้โครมาโทแกรม ที่มีการแยกของพีคอัลลิอิน ออกจากพีคของสารอื่นๆได้ดีที่สุด โดยทำการทดลองเปรียบเทียบกับสารละลายมาตรฐาน อัลลิอิน

การเตรียม 0.1 M โซเดียมอะซิเตด pH 7.2

ชั่งโซเดียมอะซิเตด (sodium acetate AR grade) อย่างแม่นยำ 8.204 กรัม ละลายในน้ำกลั่น 3 ครั้ง แล้วปรับปริมาตรจนครบ 1000 มล. ในขวดปรับปริมาตร แล้วจึงนำไปปรับค่าความเป็นกรด-ด่าง ด้วยเครื่อง pH-meter ด้วยกรดแอซีติกล้วน จนได้ค่าความเป็นกรด-ด่าง ที่ 7.2 (pH = 7.2)

การเตรียมวัฏภาคเคลื่อนที่

ในการศึกษานี้จะใช้วัฏภาคเคลื่อนที่ที่ประกอบไปด้วย สารละลาย 2 ชนิดคือ สารละลายผสมระหว่าง 0.1 M โซเดียมอะซิเตด pH 7.2 : เมธานอล และ เตตราไฮโดรฟิวแรน ในอัตราส่วน 900:95:5 (ก) กับเมธานอลสัมบูรณ์ เกรดเอชพีแอลซี (ข)

การเตรียมวัฏภาคเคลื่อนที่ ก.

ตวงสารละลายโซเดียมอะซิเตด ที่เตรียมไว้ปริมาตร 900 มล. นำมาเติม เมธานอลสัมบูรณ์ เกรดเอชพีแอลซี จำนวน 95 มล. และ เตตราไฮโดรฟิวแรน 5 มล. ผสมให้เข้ากันแล้วนำมากรองผ่าน membrane filter ขนาด 0.45 ไมโครเมตร 2 ครั้ง นำไปไล่ก๊าซออก (degas) ใน ultrasonic bath นาน 30 นาที แล้วจึงนำมาใช้

การเตรียมวัฏภาคเคลื่อนที่ ข.

นำเมธานอลสัมบูรณ์ เกรดเอชพีแอลซี มากรองผ่าน membrane filler ขนาด 0.45 ไมโครเมตร 2 ครั้งแล้วนำไปไล่ก๊าซออก (degas) ใน ultrasonic bath ก่อนนำมาใช้

4.3 การตรวจสอบ(Detection)สาร อัลลิอิน

เนื่องจากการเกิดปฏิกริยาอนุพันธ์ก่อนทำการฉีด ของสารอัลลิอิน กับ OPA จะได้อนุพันธ์ที่สามารถเรืองแสงได้ ในการศึกษานี้จึงเลือกใช้เครื่องตรวจวัดการเรืองแสง (Varian Flurichrom III™ detector Walnul Greek, california, USA.) ซึ่ง detector ชนิดนี้จะมีความไวสูงกว่า UV และ RI detector ถึง 1000 เท่า

4.4 องค์ประกอบของเครื่อง เอชพีแอลซี สำหรับการวิเคราะห์สาร อัลลิอิน

เครื่อง เอชพีแอลซี ที่ใช้ในการศึกษาครั้งนี้เป็นเครื่องของ Varian Chromatograph System (Varian, U.S.A.) จะประกอบไปด้วยส่วนต่างๆดังนี้คือ

1. ระบบการควบคุมตัวทำละลาย (Solvent Delivery System) เป็นรุ่น Varian model 9010 ternary solvent delivery system
2. เครื่องตรวจสอบสาร (Detector) เป็น Fluorichrom III™ detector
3. เครื่องแปลข้อมูล (Integrator) เป็น Varian model 4400 integrator ซึ่งอ่านค่าเป็นพื้นที่ใต้พีค
4. เครื่องฉีดสารตัวอย่างอัตโนมัติ (Autosampler) เป็น Varian model 9095 Autosampler

คอลัมน์ที่ใช้จะเป็น octadecylsilane (C18) reverse phase column ขนาดอนุภาค 4.5 ไมโครเมตร ขนาด 150 มม. x 4 มม. I.D. ของบริษัท Varian U.S.A.
โดยมีสภาวะของการตั้งเครื่องมือดังนี้

End time	:	30 นาที
อัตราการไหล	:	1.2 มล./นาที
ปริมาตรของสารที่ฉีดเข้าคอลัมน์	:	20 มคล.
ความไวของการเลื่อนกระดาษ (Chart speed)	:	0.5 ซม./นาที
Peak threshold	:	200
Attenuate	:	32

4.5 การหาสารมาตรฐานภายในที่เหมาะสม

ในการศึกษาปริมาณสารอัลลิอิน โดยใช้เทคนิคเอชพีแอลซี ในครั้งนี้ใช้วิธีการเติมสารมาตรฐานภายใน ลงในตัวอย่างที่ทำการวิเคราะห์ การใส่สารมาตรฐานภายใน เพื่อลดความผิดพลาดที่จะเกิดขึ้นจากการวิเคราะห์ โดยการเติมสารที่รู้ความเข้มข้นแน่นอนและให้พีคที่แยกจากสารที่ทำการวิเคราะห์ โดยสารตัวนี้จะทำหน้าที่เป็น marker เพื่อหักความผิดพลาดที่จะมีผลต่อขนาดของพีค เช่น ขนาดของตัวอย่างที่ฉีด นอกจากนี้จะมีประโยชน์มากในกรณีที่ต้องมีการ pretreatmentของสารตัวอย่างก่อน เช่น การเกิดปฏิกริยาอนุพันธ์เช่นในการศึกษาครั้งนี้ เพื่อที่จะ correct ผลจาก recovery ของสาร ทำโดยการเติมสารมาตรฐานภายใน ลงในตัวอย่างก่อนการ pretreatment จากนั้นจึงวิเคราะห์ปริมาณสารต่อไป ถ้ามีการสูญเสียสารที่จะวิเคราะห์ไปในช่วงการเตรียมตัวอย่าง ก็จะมีการสูญเสียสารมาตรฐานภายใน ไปด้วย

การเลือกสารเคมีที่จะใช้เป็นสารมาตรฐานภายใน ที่เหมาะสมในการวิเคราะห์หาปริมาณสารอัลลิอิน เมื่อพิจารณาจากสารอัลลิอิน สารมาตรฐานภายในที่สามารถใช้ได้ควรจะเป็นสารประเภทเอมีนปฐมภูมิ หรือกรดอะมิโนที่มีกำมะถันในองค์ประกอบคล้ายๆ อัลลิอิน สารเคมีที่มีคุณสมบัติดังกล่าวก็คือ เมไธโอนีน และ ซีสเตอีน แต่เนื่องจาก ซีสเตอีน สามารถละลายได้ไม่ดีเมธานอล 70% ส่วน เมไธโอนีน จะสามารถละลายได้ดี และ พีคก็แยกออกจากสารที่ต้องการวิเคราะห์อย่างสมบูรณ์ ในการศึกษานี้จะเลือกใช้ เมไธโอนีน เป็นสารมาตรฐานภายใน

<u>การเตรียมสารละลาย สารมาตรฐานภายใน</u>

ทำการชั่งสาร เมไธโอนีน อย่างแม่นยำ 10 มก. ในเมธานอลความแรง 70% ปรับปริมาตรจนครบ 10 มล. ในขวดปรับปริมาตร จะได้สารละลายมาตรฐานเมไธโอนีนความเข้มข้น 1 มก./มล. นำสารมาตรฐาน เมไธโอนีน ที่ได้นี้มาทำการเจือจางด้วยเมธานอลความแรง 70% ให้มีความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐานเมไธโอนีน ต่างๆกัน 9 ความเข้มข้น คือ 12.5 25 50 100 200 400

800 และ 1000 มคก./มล. เพื่อนำไปวิเคราะห์หาความเข้มข้นที่เหมาะสมที่ใช้เป็น สารมาตรฐานภายใน ในการศึกษานี้ดังสภาวะการทดลองดังนี้

นำสารละลายมาตรฐานเมไธโอนีน ในความเข้มข้นต่างๆกัน เติมลงในสารละลายมาตรฐานอัลลิอิน ความเข้มข้นต่างๆกันในปริมาตรที่เท่ากัน นำไปผ่านกระบวนการการเกิดปฏิกิริยาของสารก่อนฉีดเข้าคอลัมน์ ในอัตราส่วน สารละลายผสม 40 มคล. ต่อ OPA 400 มคล. แล้วฉีดเข้าเครื่อง เอชพีแอลซี จำนวน 20 มคล. เพื่อหาความสูงของพีคสารมาตรฐานภายใน ที่มีขนาดใกล้เคียงกับสารละลายมาตรฐานความเข้มข้นหนึ่ง

4.6 การสร้างกราฟมาตรฐานของอัลลิอินโดยเทคนิค เอชพีแอลซี

ทำการทดลองหาช่วงความเข้มข้นของสารอัลลิอิน ที่เป็นสัดส่วนโดยตรงกับการดูดกลืนแสงตามกฎของเบียร์ในช่วงที่คาดว่ากว้างพอที่ใช้ในการวิเคราะห์ได้ โดยได้ทำการทดลองในช่วงความเข้มข้น 12.5-1000 มก./มล. และใช้สารมาตรฐานภายใน ที่เหมาะสมที่เลือกจากการทดลองในข้อ 4.5 โดยได้ทำการทดลองหาความเข้มข้นของสารมาตรฐานภายใน ที่จะให้อัตราส่วนพื้นที่ใต้พีคของสารอัลลิอินต่อสารมาตรฐานภายใน (peak area ratio, PAR) ที่เหมาะสมเมื่อทำการทดสอบในช่วงความเข้มข้นดังกล่าว จากการทดลองพบว่าความเข้มข้นที่เหมาะสมของสารมาตรฐานภายในคือ 50 มก./มล. โดยทดลองหาช่วงความเข้มข้นที่เป็นสัดส่วนโดยตรงกับการดูดกลืนแสงตามกฎของเบียร์ดังนี้

เตรียมสารละลายมาตรฐานซึ่งเป็นสารละลายผสมของสารอัลลิอิน และ สารมาตรฐานภายใน ในเมธานอล โดยมีความเข้มข้นของสารอัลลิอิน ต่างๆกัน 9 ความเข้มข้นคือ 12.5 25 50 100 200 400 800 และ 1000 มคก./มล. และความเข้มข้นของสารมาตรฐานภายใน คือ 50 มก./มล. ในปริมาตรที่เท่ากัน

สารละลายแต่ละความเข้มข้นจะถูกนำมาเปลี่ยนให้อยู่ในรูปของอนุพันธ์ด้วย OPA ก่อนที่จะถูกฉีดเข้าคอลัมน์เอชพีแอลซี โดยมีสภาวะการทดลองเหมือนข้อ 4.4 โดยใช้วัฏภาคเคลื่อนที่ ที่ได้จากการทดลองในข้อ 4.2 โดยสารละลายแต่ละความเข้มข้นจะถูกฉีดเข้า เอชพีแอลซี อย่างน้อย 3 ครั้ง ผลที่ได้นำมาเขียนกราฟระหว่างอัตราส่วนพื้นที่ใต้พีคของอัลลิอิน ต่อสารมาตรฐานภายในกับความเข้มข้นของอัลลิอิน เพื่อหาช่วงความเข้มข้นของสารอัลลิอิน ที่ให้ความสัมพันธ์ในลักษณะที่เป็นเส้นตรง