

การพัฒนาวิธีวิเคราะห์ปริมาณ Alliin ในกระเทียม โดยวิธี Ultra Performance Liquid Chromatography

ณิชภัทร ปัตตะพงศ์ อภิรักษ์ ศักดิ์เพชร วิไลลักษณ์ ชื่นนางสี สิริกาญจน์ ธนอริยโรจน์ และ นุจรี ศรีสนาม
สถาบันวิจัยสมุนไพร กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ ถนนพหลโยธิน 11000

บทคัดย่อ Alliin เป็นสารสำคัญหลักที่พบในกระเทียม (*Allium sativum* L.) มีฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรีย ต้านอักเสบ และช่วยลดภาวะความดันโลหิตสูง ดังนั้นการวิเคราะห์ปริมาณ alliin ในกระเทียมจึงสามารถนำมาใช้ในการประเมินคุณภาพของกระเทียม การศึกษานี้มีวัตถุประสงค์เพื่อพัฒนาวิธีวิเคราะห์ปริมาณ alliin ในกระเทียม โดยวิธี Ultra Performance Liquid Chromatography (UPLC) โดยซึ่งตัวอย่างกระเทียม 150 มิลลิกรัม เติมน้ำ 50% methanol ปริมาตร 25 มิลลิลิตร สกัดโดยการผสมแบบ vortex เป็นเวลา 1 นาที ดูดส่วนใสเหนือตะกอนมากรองผ่าน syringe filter ชนิด PTFE ฝัดสารละลายตัวอย่างที่ได้ ปริมาตร 1 ไมโครลิตร เข้าสู่ระบบโครมาโทกราฟี ประกอบด้วยคอลัมน์ Acquity™ BEH® Amide 2.1 × 100 มิลลิเมตร, 1.7 ไมโครเมตร วัฏภาคเคลื่อนที่ คือ ส่วนผสมของ acetonitrile และน้ำ โดยระยะแยกอยู่ในช่วงเวลา 0.00–2.30 นาที เริ่มต้นที่อัตราส่วน 85:15 นาน 0.65 นาที จากนั้นปรับเป็น 75:25 และ 86:14 ภายในเวลา 1.42 นาที และ 1.52 นาที ตามลำดับ และคงที่ที่อัตราส่วน 86:14 จนถึงนาทีที่ 2.30 ด้วยอัตราการไหล 0.55 มิลลิลิตรต่อนาที อุณหภูมิคอลัมน์ เท่ากับ 40 องศาเซลเซียส ตรวจวัดสารด้วยตัวตรวจวัดชนิด Photodiode Array (PDA) ที่ความยาวคลื่น 220 นาโนเมตร ค่า retention time ของ alliin เท่ากับ 2.02 นาที และเมื่อทำการทดสอบความใช้ได้ของวิธี พบว่ากราฟมาตรฐานของ alliin มีความเป็นเส้นตรงในช่วง 0.049–0.582 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร มีค่าสัมประสิทธิ์การตัดสีนใจ (R^2) เท่ากับ 0.999791 ค่าความแม่นยำในช่วงร้อยละ 98.64–106.02 ค่าความเที่ยงอยู่ในช่วงร้อยละ 0.51–1.19 มีค่าขีดจำกัดของการตรวจพบและขีดจำกัดของการหาปริมาณ เท่ากับ 0.006 และ 0.033 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ เมื่อศึกษาปริมาณ alliin ในกระเทียม จำนวน 8 ตัวอย่าง พบว่ามีค่าเฉลี่ย เท่ากับ 9.87 ± 2.75 มิลลิกรัมต่อกรัม การศึกษานี้สามารถนำไปใช้ในการวิเคราะห์ปริมาณ alliin ในกระเทียมเพื่อใช้ในการควบคุมคุณภาพ รวมถึงใช้ในการคัดเลือกกระเทียมที่มีคุณภาพเพื่อเข้าสู่กระบวนการผลิตยาหรือผลิตภัณฑ์สุขภาพต่อไป

คำสำคัญ: กระเทียม, *Allium sativum*, Alliin, UPLC

Corresponding author E-mail: nichapat.p@dmsc.mail.go.th

Received: 8 August 2025

Revised: 17 November 2025

Accepted: 19 November 2025

บทนำ

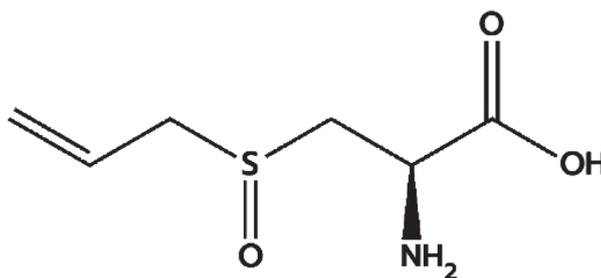
กระเทียมมีชื่อทางวิทยาศาสตร์ว่า *Allium sativum* L. จัดอยู่ในวงศ์ Amaryllidaceae⁽¹⁾ ชื่อสามัญว่า Garlic ชื่ออื่นๆ ได้แก่ กระเทียมขาว เทียม หัวเทียม หอมเทียม เป็นต้น⁽²⁾ จัดเป็นไม้ล้มลุก สูงประมาณ 30-60 เซนติเมตร หัวใต้ดินกลมแบน มีเยื่อสีขาวหรือสีม่วงอมชมพูหุ้มอยู่ซึ่งลอกออกได้ แต่ละหัวประกอบด้วยหลายกลีบ รูปไข่ ขอบเหลี่ยม 3-4 เหลี่ยม ลักษณะกลีบโค้ง ด้านนอก ด้านอื่นๆ ค่อนข้างตรง ผิวและเนื้อด้านในสีนวลถึงสีเหลืองอ่อน มีกลิ่นฉุนเฉพาะตัว รสเผ็ดร้อน ใบเดี่ยว ขึ้นมาจากดิน เรียงซ้อนสลับ แบน ปลายแหลม ข้อดอกแบบช่อซี่ร่ม ส่วนที่นำมาใช้ประโยชน์ทางยา คือ ลำต้นใต้ดิน (หัว) หรือกลีบ โดยในตำราสรรพคุณยาไทย กระเทียมมีรสร้อน เป็นยาแก้ไข้ ขับปัสสาวะ ขับโลหิตระดู เป็นยาระบาย แก้ไอ แก้กืดเสมหะ แก้กโรคผิวหนัง บางอย่าง เป็นยาขับลมในลำไส้ ขับเนื้อร้าย บำรุงธาตุ ใช้ภายนอกคั้นเอาน้ำจากหัวกระเทียมเป็นยาหยอดหู แก้ปวดหูและหูอื้อ ขับพยาธิในท้อง บ้วนปากฆ่าเชื้อโรคในปาก จากข้อมูลการวิจัยพรีคลินิก พบว่ากระเทียมสดสามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรียและเชื้อรา มีฤทธิ์ขับพยาธิ ลดไขมันในเลือด ลดภาวะความดันโลหิตสูง ต้านการจับตัวของเกล็ดเลือด สลายไฟบริน ลดน้ำตาลในเลือด ยับยั้งเซลล์มะเร็ง ข้อมูลจากการศึกษาวิจัยทางคลินิก พบว่ากระเทียมและหรือผลิตภัณฑ์จากกระเทียมมีฤทธิ์ลดการจับตัวของเกล็ดเลือด เพิ่มความสามารถในการสลายไฟบริน มีฤทธิ์อ่อนๆ ในการลดไขมันในเลือดและลดความดันโลหิต ช่วยลดการเกิดออกซิเดชันของไลโปโปรตีน จึงอาจช่วยลดความเสี่ยงของการเกิดไขมันอุดตันในหลอดเลือด ดังนั้นจึงมีการใช้กระเทียมเป็นผลิตภัณฑ์เสริมอาหาร เพื่อช่วยบรรเทาภาวะไขมันในเลือดสูง ป้องกันโรคหลอดเลือดแดงแข็งตัว และช่วยลดความดันโลหิตในผู้ป่วยที่ความดันโลหิตสูงเล็กน้อย (mild hypertension)^(2,3) หัวกระเทียมสด ประกอบด้วย น้ำ (~65%) คาร์โบไฮเดรต โปรตีน กรดอะมิโน (Arginine, glutamic acid, aspartic acid, leucine) ใยอาหาร กรดไขมัน (Palmitic acid, oleic acid, linoleic acid,

linolenic acid) สารประกอบฟีนอล วิตามิน (B1, B6, C) และสารที่มีกำมะถันเป็นองค์ประกอบ (Organosulfur) โดยสารตั้งต้นที่พบในธรรมชาติ ได้แก่ alliin แต่เมื่อกระเทียมถูกบด สับ หรือเคี้ยว เซลล์จะแตก ทำให้ alliin และเอนไซม์ alliinase ที่อยู่ในเซลล์สัมผัสกันเกิดปฏิกิริยาทำให้ alliin เปลี่ยนเป็น allicin ที่มีความเสถียรต่ำและสลายตัวอย่างรวดเร็วกลายเป็นสารอื่นๆ เช่น ajoene, dithiols, allyl methyl trisulfide, diallyl sulfide, diallyl disulfide, diallyl trisulfide, S-allyl L-cysteine เป็นต้น⁽³⁻¹²⁾ ดังนั้นในงานวิจัยต่างๆ จึงสนใจสาร alliin ที่เป็นสารตั้งต้นและมีความเสถียรมากกว่า จากงานวิจัยที่ผ่านมา พบว่ามีการใช้วิธีวิเคราะห์ที่หลากหลายในการหาปริมาณ alliin ในกระเทียม ซึ่งเทคนิคที่นำมาใช้โดยส่วนมากจะใช้หลักการทางโครมาโทกราฟี ได้แก่ โครมาโทกราฟีชนิดผิวบางประสิทธิภาพสูง (HPTLC)⁽¹³⁻¹⁵⁾ แก๊สโครมาโทกราฟี⁽¹⁶⁾ โครมาโทกราฟีของเหลวประสิทธิภาพสูง (HPLC) โดยใช้คอลัมน์ชนิด C₁₈^(15,17,18) และจำเป็นต้องเตรียม alliin ให้อยู่ในรูปอนุพันธ์เชิงซ้อนกับ o-phthalaldehyde⁽¹⁵⁾ หรือ 4-mercapto-pyridine⁽¹⁸⁾ ก่อนวิเคราะห์ (Pre-column derivatization) รวมถึงมีการเลือกใช้ตัวตรวจวัดเป็นชนิด MS/MS⁽¹⁹⁾

จากโครงสร้างของ alliin ซึ่งเป็น S-allyl-L-cysteine sulfoxide ดังแสดงในภาพที่ 1 พบว่ามีหมู่ฟังก์ชันหลักเป็น sulfoxide (S=O), amino (-NH₂) และ carboxylic acid (-COOH) ซึ่งมีความเป็นขั้วสูง สามารถละลายในน้ำได้ดี (Freely soluble) แต่ไม่ละลายใน ethanol, chloroform, acetone, ether และ benzene (Practically insoluble)⁽²⁰⁾ โดยเมื่อพิจารณาจากลักษณะทางเคมีฟิสิกส์ดังกล่าว พบว่าการเลือกใช้คอลัมน์ชนิด polar มีความเหมาะสมสำหรับการแยก alliin และง่ายต่อการพัฒนาวิธี เมื่อเปรียบเทียบการเตรียมให้อยู่ในรูปอนุพันธ์ก่อนการวิเคราะห์ ซึ่งเป็นการวัดทางอ้อม (Indirect method) หรือใช้เครื่องมือขั้นสูง เช่น LC-MS/MS ที่มีความยุ่งยากและซับซ้อนในการปฏิบัติมากกว่า

ปัจจุบันมีการนำสมุนไพรกระเทียมมาใช้ประโยชน์อย่างแพร่หลาย ดังนั้นเพื่อยกระดับด้านมาตรฐานคุณภาพของผลิตภัณฑ์จากสมุนไพรและสร้างความเชื่อมั่นให้แก่ผู้บริโภค จึงจำเป็นต้องมีการควบคุมคุณภาพวัตถุดิบกระเทียม อย่างไรก็ตามมโนกราฟของกระเทียมในตำรามาตรฐานยาสมุนไพรไทย ฉบับปี พ.ศ. 2564

ยังไม่มีวิธีวิเคราะห์และข้อกำหนดมาตรฐานของปริมาณสารสำคัญ⁽¹⁾ การศึกษานี้มีวัตถุประสงค์เพื่อพัฒนาวิธีวิเคราะห์ปริมาณ alliin ในวัตถุดิบกระเทียม เพื่อนำไปใช้ประโยชน์ในการควบคุมคุณภาพของกระเทียม รวมถึงใช้ในการคัดเลือกกระเทียมที่มีคุณภาพเพื่อเข้าสู่กระบวนการผลิตยาหรือผลิตภัณฑ์สุขภาพต่อไป



ภาพที่ 1 โครงสร้างทางเคมีของ alliin

วัสดุและวิธีการ

สารมาตรฐานและสารเคมี

สารมาตรฐาน: Alliin (Chengdu Biopurify Phytochemicals, China) ความบริสุทธิ์ $\geq 98\%$

สารเคมี: Acetonitrile ชนิด LCMS (J.T.Baker, USA) และ Methanol ชนิด AR (Merck®, Germany)

เครื่องมือและอุปกรณ์

เตาอบร้อน รุ่น ULE 800 (Memmert, Germany), เครื่องบดป่น รุ่น 1029-C (Yoshida Seisakusho, Japan), แร้ง ASTM E11 เบอร์ 180 (Endecotts, England), เครื่อง UPLC-PDA detector รุ่น Acquity™ (Waters®, USA), โปรแกรมจัดการข้อมูลโครมาโทกราฟี Empower 2 Build No. 2154 (Waters®, USA), คอลัมน์ รุ่น Acquity™ UPLC BEH Amide, 2.1×100 มิลลิเมตร, 1.7 ไมโครเมตร (Waters®, USA), เครื่องชั่งไฟฟ้า ความละเอียด 0.01 มิลลิกรัม รุ่น XPR205DR (Mettler-Toledo, Switzerland), เครื่องผสมสาร รุ่น 37600 Mixer (Thermolyne, USA), ขวดรูปชมพู่ รุ่น DURAN (Schott AG, Germany), ปิเปตวัดปริมาตร Class A (Witeg, Germany), ขวดวัดปริมาตร Class A (Witeg, Germany) และ syringe filter ชนิด PTFE ขนาด 0.2 ไมโครเมตร รุ่น Acrodisc (Waters®, USA)

ตัวอย่าง

รวบรวมตัวอย่างกระเทียมจากแหล่งต่างๆ จากแหล่งธรรมชาติและร้านขายยาสมุนไพร จำนวน 8 ตัวอย่าง ในเดือนมีนาคม พ.ศ. 2564 แปรรูปตัวอย่างกระเทียมโดยการลอกเปลือกออก ผ่านกลีบตามแนวยาวเป็นแผ่นบางๆ ตากในที่ร่มและมีอากาศถ่ายเทสะดวกเป็นเวลา 2 วัน จากนั้นนำไปอบแห้งที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส วันละ 8 ชั่วโมง เป็นเวลา 3 วัน นำตัวอย่างที่ได้ไปบดเป็นผงละเอียด ผ่านแร้งเบอร์ 180 และเก็บในภาชนะแก้วสีขาปิดฝาสนิทที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

การพัฒนาวิธีวิเคราะห์ปริมาณ alliin ในกระเทียม

การสำรวจเพื่อหาสภาวะที่เหมาะสมของระบบโครมาโทกราฟี (Chromatographic scouting) ชนิดของคอลัมน์

เปรียบเทียบคอลัมน์ที่มีชนิดของวัฏภาคคงที่ (Stationary phase) แตกต่างกันได้แก่ amide, C_8 , C_{18} และ phenyl โดยใช้วิธี scouting แบบ isocratic เพื่อหาคอลัมน์ที่เหมาะสมสำหรับการแยกสาร alliin ในตัวอย่าง

วัฏภาคเคลื่อนที่

ศึกษาชนิดและอัตราส่วนของตัวทำละลายที่จะใช้เป็นวัฏภาคเคลื่อนที่ โดยพิจารณาจากรูปร่างของพีค alliin และ retention time ของสารดังกล่าว

การหาสภาวะที่เหมาะสมของระบบโครมาโทกราฟี (Chromatographic optimization)

ใช้วิธี segmented gradient และ focused gradient โดยศึกษาอัตราส่วนของตัวทำละลาย และ flow rate ที่เหมาะสม โดยคำนึงถึงความสามารถในการแยกพีคของ alliin ออกจากสารอื่นๆ ในสารละลาย ตัวอย่าง การล้างคอลัมน์หลังการแยก (Post separation wash) และขีดจำกัดของคอลัมน์ นอกจากนี้ได้ศึกษาความยาวคลื่นในการตรวจวัดที่เหมาะสม

การเตรียมตัวอย่างวิเคราะห์

จากการทบทวนงานวิจัยที่ผ่านมา พบว่าเมื่อละลายผงกระเทียมในน้ำ alliin จะถูกเปลี่ยนเป็น allicin ผ่านเอนไซม์ alliinase กระบวนการนี้จะเกิดขึ้นโดยสมบูรณ์ภายในระยะเวลา 0.2–0.5 นาที ที่อุณหภูมิห้อง⁽²¹⁾ และการใช้ methanol สามารถยับยั้งการทำงานของ alliinase โดยการทำให้โปรตีนเสียสภาพ (Denature) และลดกิจกรรมของเอนไซม์ดังกล่าว⁽²²⁾

การศึกษาครั้งนี้ได้ทำการเปรียบเทียบตัวทำละลายที่ใช้ในการสกัด alliin ในกระเทียม จำนวน 2 ชนิด ได้แก่ น้ำ และ 50% methanol โดยใช้วิธีสกัด จำนวน 4 วิธี ได้แก่ วิธีผสมแบบ vortex วิธีแช่สกัด วิธีหมุนเหวี่ยง และวิธีการใช้คลื่นอัลตราโซนิก ในขั้นตอนการเตรียมสารละลายตัวอย่างก่อนฉีดเข้าสู่ระบบโครมาโทกราฟี ต้องมีการกรองสารละลายตัวอย่าง จึงทำการเปรียบเทียบผลกระทบของชนิดตัวกรองต่อปริมาณ alliin ในการศึกษาครั้งนี้ด้วย

การทดสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์

การทดสอบความจำเพาะเจาะจงของวิธี (Specificity)

เตรียมสารละลายมาตรฐานและสารละลายตัวอย่างที่มีความเข้มข้นใกล้เคียงกัน วิเคราะห์โดยใช้สภาวะของระบบโครมาโทกราฟีที่พัฒนาขึ้นเปรียบเทียบค่า retention time และ UV spectrum ที่ได้

การทดสอบช่วงของการวัด และความเป็นเส้นตรง (Working range and linearity)

เตรียมสารละลาย stock ของสารมาตรฐาน alliin จำนวน 3 stock ที่ความเข้มข้น 0.5, 0.75 และ 1 มิลลิกรัม

ต่อมิลลิลิตร โดยซึ่งสารมาตรฐาน ปริมาณ 25, 37.5 และ 50 มิลลิกรัม ลงในขวดวัดปริมาตร ขนาด 50 มิลลิลิตร ละลายและปรับปริมาตรด้วย 50% methanol เตรียมสารละลายมาตรฐาน จำนวน 6 ระดับ จากแต่ละ stock โดยปิเปตสารละลาย stock ปริมาตร 1, 2, 3, 4, 5 และ 6 มิลลิลิตร ลงในขวดวัดปริมาตร ขนาด 10 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรด้วย 50% methanol กรองผ่าน syringe filter ชนิด PTFE ขนาด 0.2 ไมโครเมตร ทำการวิเคราะห์โดยใช้สภาวะของระบบโครมาโทกราฟีที่พัฒนาขึ้น สร้างกราฟมาตรฐานแสดงความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณ alliin และค่า response area พิจารณาความเป็นเส้นตรงจากค่าสัมประสิทธิ์การตัดสินใจ (Coefficient of determination; R^2) และ residual plots

การทดสอบผลกระทบของเมทริกซ์ (Matrix effect)

เตรียม spiked sample โดยการเติมสารมาตรฐาน ให้มีความเข้มข้นระดับต่างๆ ในช่วงของการวัด จำนวน 6 ระดับ ระดับละ 2 ซ้ำ ประเมินผลกระทบของเมทริกซ์ โดยการทดสอบความเป็นเส้นตรงของความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณ alliin ในสารละลายมาตรฐาน (x) และ ปริมาณ alliin ใน spiked sample (y) และการทดสอบด้วย paired t-test

การทดสอบความแม่นยำ (Accuracy) และความเที่ยง (Precision)

ทดสอบความแม่นยำและความเที่ยงในสภาวะการทวนซ้ำ (Repeatability) ทำโดยการวิเคราะห์ spiked sample ที่ได้จากการเติมสารมาตรฐาน alliin ลงใน unspiked sample (ที่ทราบปริมาณ alliin ที่แน่นอน) ให้มีความเข้มข้น 3 ระดับ ครอบคลุมช่วงของการวัด วิเคราะห์ระดับละ 6 ซ้ำ คำนวณค่าร้อยละการกลับคืน (%Recovery) และร้อยละของค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ (%RSD_r)

ทดสอบ within laboratory reproducibility โดยวิเคราะห์ตัวอย่างจากนักวิเคราะห์ 2 คน จำนวน 10 ซ้ำ คำนวณความแตกต่างร้อยละสัมพัทธ์ (Relative percent difference; RPD)

การหาขีดจำกัดของการตรวจพบ (Limit of detection; LOD) และขีดจำกัดของการหาปริมาณ (Limit of quantitation; LOQ)

จากกราฟมาตรฐานสามารถหาค่า LOD และ LOQ โดยคำนวณจากค่า $y_{Intercept} + 3S_{y/x}$ และ $y_{Intercept} + 10S_{y/x}$ ตามลำดับ และยืนยันค่า LOQ โดยวิเคราะห์ที่ระดับความเข้มข้นที่คำนวณได้ จำนวน 10 ซ้ำ คำนวณ %Error และค่าร้อยละของการเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ (%RSD)

การวิเคราะห์ปริมาณ alliin ในกระเทียม

ซั่งตัวอย่าง ปริมาณ 150 มิลลิกรัม ลงในขวดรูปชมพู่ ปิเปต 50% methanol ปริมาตร 25 มิลลิลิตร สกัดโดยการผสมแบบ vortex เป็นเวลา 1 นาที กรองผ่าน syringe filter ชนิด PTFE ขนาด 0.2 ไมโครเมตร นำสารละลายตัวอย่างไปวิเคราะห์ด้วยวิธีที่พัฒนาขึ้น

การทดสอบความคงตัวของสารละลายตัวอย่าง

ซั่งตัวอย่าง ปริมาณ 150 มิลลิกรัม ลงในขวดรูปชมพู่ ปิเปต 50% methanol ปริมาตร 25 มิลลิลิตร สกัดโดยการผสมแบบ vortex เป็นเวลา 1 นาที ตูดส่วนใสเหนือตะกอนมากรองผ่าน syringe filter ชนิด PTFE ขนาด 0.2 ไมโครเมตร นำสารละลายตัวอย่างไปวิเคราะห์ด้วยวิธีที่พัฒนาขึ้นที่ระยะเวลาเริ่มต้น 15 นาที 30 นาที

และ 24 ชั่วโมงหลังการเตรียม จำนวนละ 3 ซ้ำ คำนวณค่าร้อยละโดยเปรียบเทียบกับผลวิเคราะห์เริ่มต้น (%Compare) และร้อยละของค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ (%RSD)

การประมาณค่าความไม่แน่นอนของการวิเคราะห์ (Estimation of measurement uncertainty)

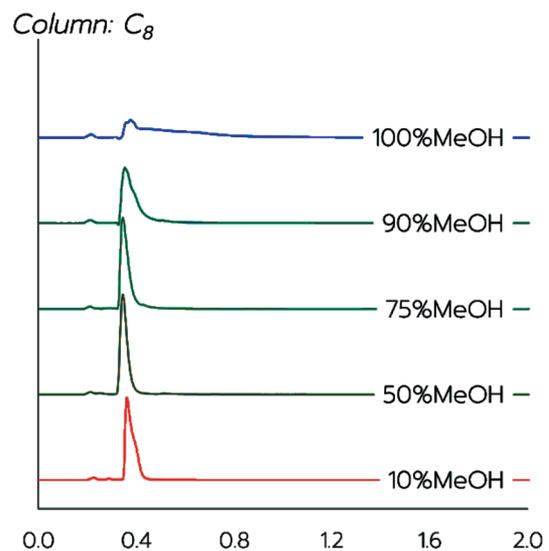
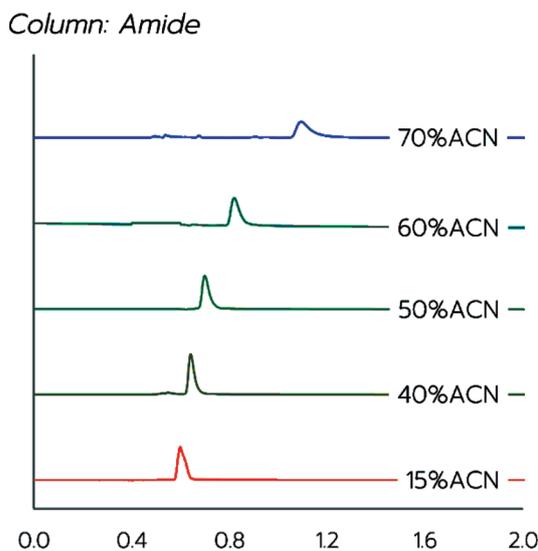
ศึกษาโดยการระบุสิ่งที่ต้องการวิเคราะห์ในที่นี้หมายถึง ปริมาณ alliin ระบุแหล่งที่มา องค์ประกอบ และปริมาณของความไม่แน่นอน คำนวณค่าไม่แน่นอนรวม (Combined standard uncertainty) และความไม่แน่นอนขยาย (Expanded uncertainty)

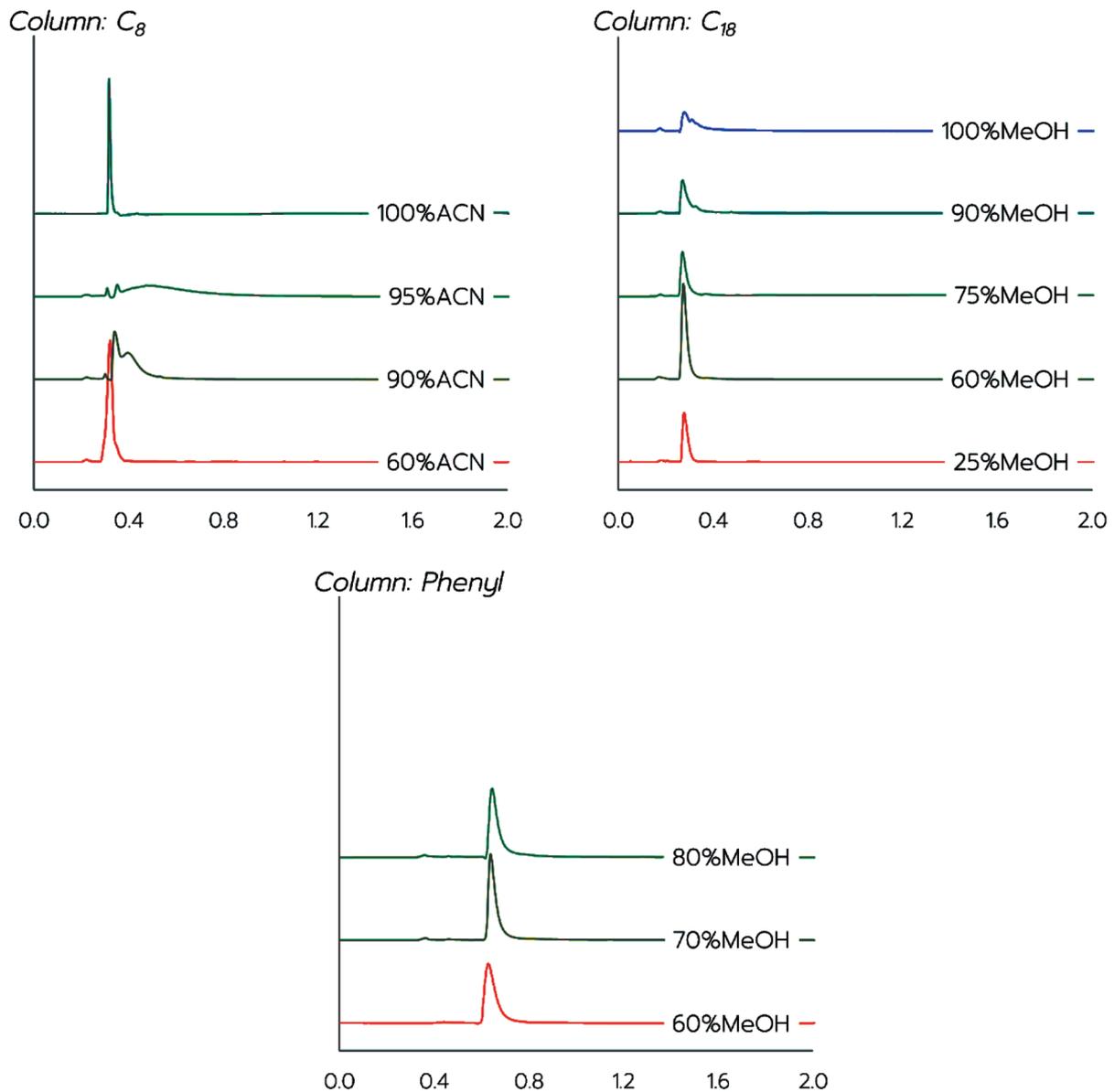
ผล

การพัฒนาวิธีวิเคราะห์ปริมาณ alliin ในกระเทียม

การสำรวจเพื่อหาสภาวะที่เหมาะสมของระบบโครมาโทกราฟี (Chromatographic scouting) ชนิดของคอลัมน์

ผลการเปรียบเทียบคอลัมน์ พบว่าวัสดุภาคคงที่ชนิด amide มีความเหมาะสมสำหรับการแยกสารในตัวอย่าง เนื่องจากมีความสามารถในการกักเก็บ alliin โดยขึ้นกับชนิดและอัตราส่วนของตัวทำละลายที่ใช้เป็นวัสดุภาคเคลื่อนที่ ในขณะที่วัสดุภาคคงที่ชนิด C_8 , C_{18} และ phenyl ไม่สามารถกักเก็บสารดังกล่าวได้ ดังแสดงในภาพที่ 2





ภาพที่ 2 โครมาโทแกรมของ alliin ที่ได้จากการ scouting โดยคอลัมน์ชนิด amide, C₈, C₁₈ และ phenyl

วัสดุภาคเคลื่อนที่

ผลการศึกษานิตและอัตราส่วนของตัวทำละลายที่จะใช้เป็นวัสดุภาคเคลื่อนที่ พบว่าชนิดและอัตราส่วนของ acetonitrile/water เหมาะสมสำหรับการใช้ในระบบ

โครมาโทกราฟ เมื่อเปรียบเทียบกับ methanol/water หรือ acetonitrile/methanol/water เนื่องจากให้ช่วงของ retention time ที่กว้างกว่ารูปร่างของพีคที่ยอมรับได้ และความหนืดต่ำกว่า ดังแสดงในตารางที่ 1

ตารางที่ 1 ผลการศึกษานิตและอัตราส่วนของตัวทำละลายที่จะใช้เป็นวัสดุภาคเคลื่อนที่

Flow rate: 0.45 mL/min, Column temp: 40°C

Acetonitrile (%)	Water (%)	Retention time (min)	Pressure (psi)	Peak shape
40	60	0.641	6830	Good
50	50	0.699	6320	Good
60	40	0.819	5840	Good

ตารางที่ 1 ผลการศึกษาชนิดและอัตราส่วนของตัวทำละลายที่จะใช้เป็นวัฏภาคเคลื่อนที่ (ต่อ)

Acetonitrile (%)	Water (%)	Retention time (min)	Pressure (psi)	Peak shape
70	30	1.093	4970	Tail
80	20	2.022	4240	Tail
85	15	3.632	3900	Tail

Flow rate: 0.4 mL/min, Column temp: 40°C

Methanol (%)	Water (%)	Retention time (min)	Pressure (psi)	Peak shape
40	60	0.694	10240	Good
50	50	0.706	10345	Good
60	40	0.725	9900	Tail
70	30	0.755	9050	Tail
80	20	0.804	7830	Tail
90	10	0.904	6440	Tail

Flow rate: 0.65 mL/min, Column temp: 40°C

Acetonitrile (%)	Methanol/Water; 3:1 (%)	Retention time (min)	Pressure (psi)	Peak shape
40	60	0.588	8120	Fail
50	50	0.698	7175	Fail
60	40	0.942	6360	Fail
70	30	1.581	5690	Fail
80	20	4.118	5200	Fail
85	15	9.352	5020	Fail

Acetonitrile/Methanol; 1:1 (%)	Water (%)	Retention time (min)	Pressure (psi)	Peak shape
50	50	0.440	12000	Good
65	35	0.476	10570	Fair
75	25	0.523	9240	Tail
85	15	0.626	7680	Tail
95	5	0.932	6000	Tail

การหาสภาวะที่เหมาะสมของระบบโครมาโทกราฟี (Chromatographic optimization)

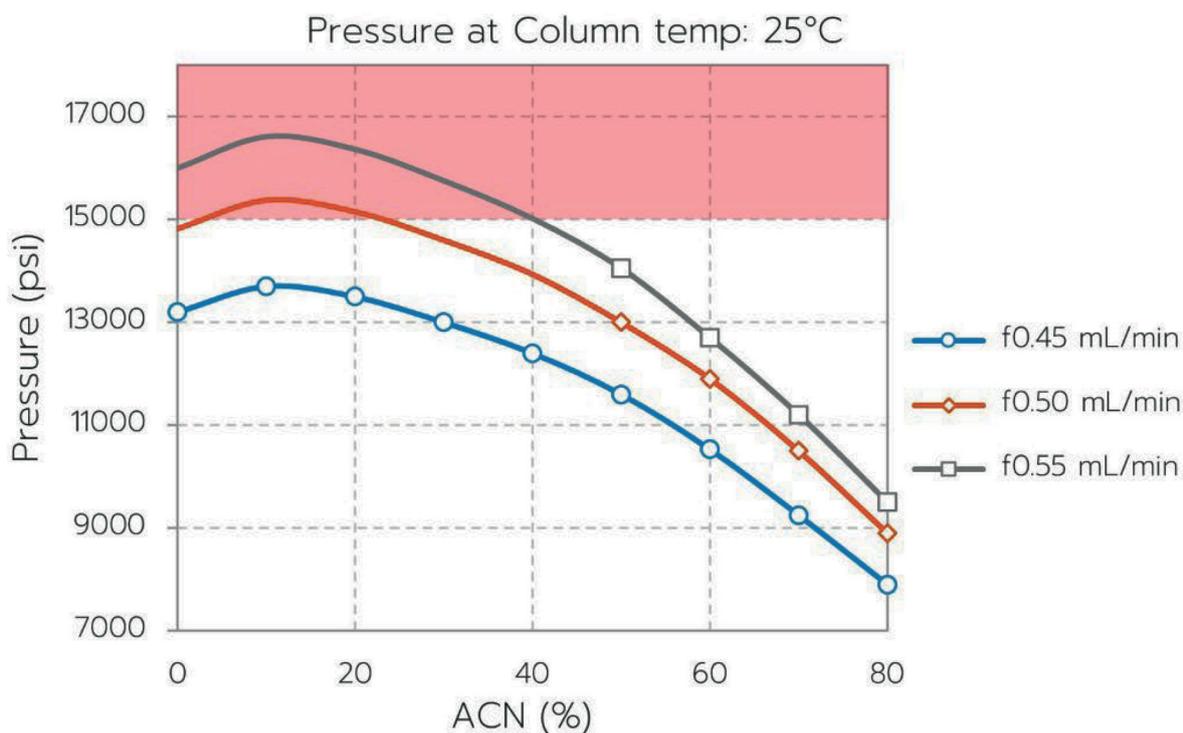
ผลการศึกษาอัตราส่วนของ acetonitrile/water และ flow rate ที่เหมาะสม โดยคำนึงถึงความสามารถในการแยกพีคของ alliin ออกจากสารอื่นๆ ในสารละลายตัวอย่าง การล้างคอลัมน์หลังการแยก (Post separation wash) และซีตจำกัดของคอลัมน์ นอกจากนี้ได้ศึกษา

ถึงความยาวคลื่นในการตรวจวัดที่เหมาะสม พบว่าอัตราส่วนของ acetonitrile/water ที่ประมาณ 10:90 มีความหนืดสูงสุด และจากการประมาณค่า Backpressure ที่ flow rate ตั้งแต่ 0.50 มิลลิลิตรต่อนาทีขึ้นไป พบว่ามีค่ามากกว่า 15,000 psi (ที่อุณหภูมิคอลัมน์ 25 องศาเซลเซียส) ซึ่งเกินขีดจำกัดของคอลัมน์และเครื่องมือ ดังแสดงในตารางที่ 2 และภาพที่ 3

ตารางที่ 2 Backpressure ของระบบที่อัตราส่วน acetonitrile/water และ flow rate ต่าง ๆ

Column temp: 25°C

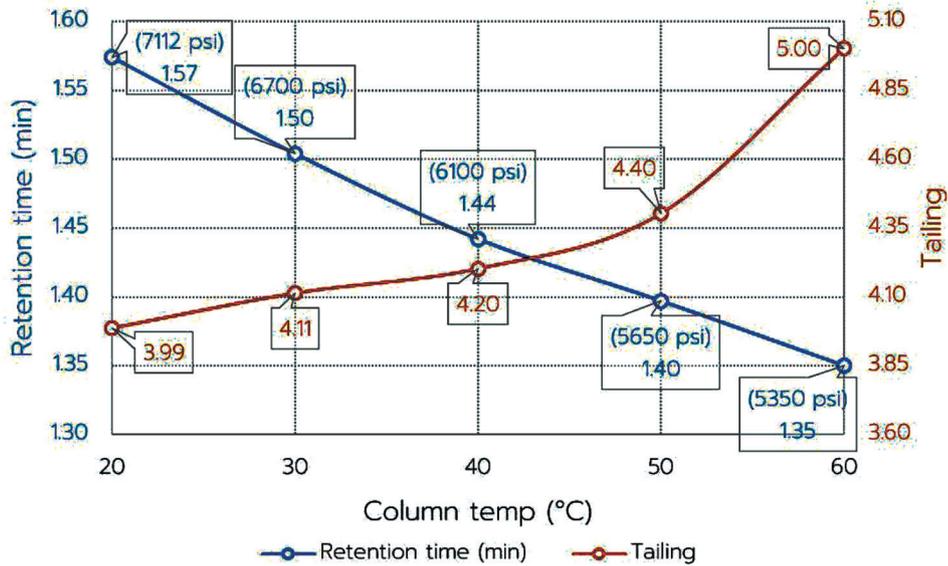
Acetonitrile (%)	Water (%)	Pressure (psi)		
		0.45 mL/min	0.50 mL/min	0.55 mL/min
0	100	13200	-	-
10	90	13700	-	-
20	80	13500	-	-
30	70	13000	-	-
40	60	12400	-	-
50	50	11600	13000	14050
60	40	10530	11900	12700
70	30	9250	10500	11200
80	20	7900	8900	9500



ภาพที่ 3 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่าง %acetonitrile และ backpressure ของระบบ

ผลการศึกษาอุณหภูมิคอลัมน์ที่อัตราส่วนของ acetonitrile/water 20:80 และ flow rate 0.60 มิลลิลิตรต่อนาที พบว่าที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส

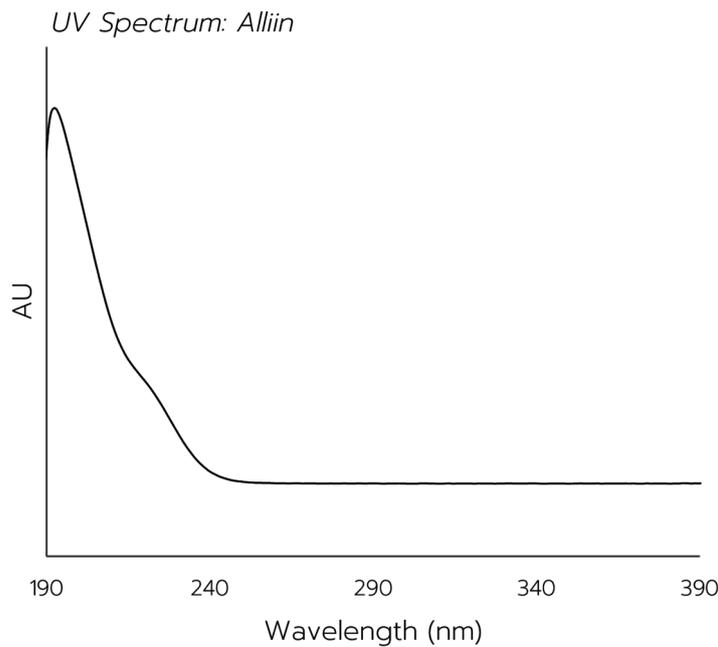
ให้ค่า retention time และ tailing เหมาะสมที่สุด ดังแสดงในภาพที่ 4



ภาพที่ 4 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างอุณหภูมิคอลัมน์ backpressure ของระบบ retention time และ tailing ของ alliin

จากผลการศึกษา UV spectrum ของ alliin ในช่วงความยาวคลื่น 190–390 นาโนเมตร พบว่าที่ความยาวคลื่น 220 นาโนเมตร มีความเหมาะสมเพียงพอสำหรับการวิเคราะห์ปริมาณ alliin

เนื่องจากให้ค่า Intensity สูง ค่า $d\lambda/dAU$ ต่ำ และไม่ถูกรบกวนสัญญาณจากค่า UV cutoff ของ acetonitrile ดังแสดงในภาพที่ 5



ภาพที่ 5 UV spectrum ของ alliin

จากการหาสภาวะที่เหมาะสมของระบบโครมาโตกราฟ โดยใช้วิธี segmented gradient

และ focused gradient ได้ระบบที่เหมาะสม ดังแสดงในตารางที่ 3

ตารางที่ 3 สภาวะของระบบโครมาโทกราฟี

Stationary phase	Acquity™ UPLC BEH® Amide, 2.1×100 mm, 1.7 μm column					
Mobile phase	A: Acetonitrile, B: Water					
	Gradient table					
	Phase	Time (min)	Flow rate (mL/min)	%A	%B	Curve
		Initial	0.55	85	15	-
	Separation	0.65	0.55	85	15	6
		1.42	0.55	75	25	6
		1.52	0.55	86	14	6
		2.30	0.55	86	14	6
		2.31	0.40	86	14	11
	Post separation	3.00	0.40	40	60	6
	wash	4.00	0.40	40	60	6
	Equilibrate	4.30	0.40	85	15	6
		4.60	0.55	85	15	6
Injection volume	1 μL					
Needle wash	Strong needle wash: 10% methanol Weak needle wash: 50% methanol					
Column temp	40°C					
Detection	220 nm					

การเตรียมตัวอย่างวิเคราะห์

ผลการเปรียบเทียบตัวอย่างที่ละลายที่ใช้ในการสกัด alliin ในกระเทียม เมื่อนำสารละลายที่สกัดด้วยน้ำและ 50% methanol มาวิเคราะห์ พบว่าสารสกัดด้วย 50% methanol ให้รูปร่างของพีคที่ดีกว่าสารสกัดด้วยน้ำ และวิธีสกัดที่เหมาะสม คือ วิธีการผสมแบบ vortex เป็นเวลา 1 นาที ซึ่งให้ผลเทียบเท่ากับวิธีการผสมแบบ vortex เป็นเวลา 1 นาที และนำไปหมุนเหวี่ยงที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที ดังแสดงในภาพที่ 6 และตารางที่ 4

ผลการเปรียบเทียบผลกระทบของชนิดตัวกรองต่อปริมาณ alliin พบว่าไม่แตกต่างกัน โดยตัวกรองชนิด

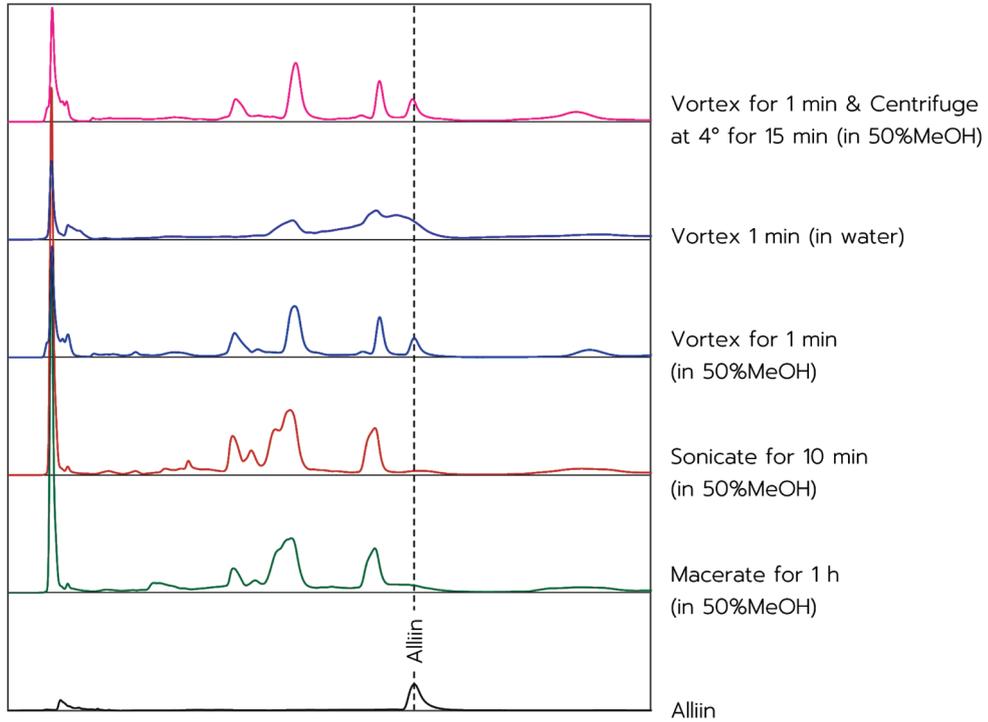
PTFE (100%) ให้ค่า response area มากกว่าตัวกรองชนิด PVDF (99.78%) และ nylon (99.78%) เล็กน้อย ดังแสดงในภาพที่ 7

การทดสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์

การทดสอบความจำเพาะเจาะจงของวิธี

จากการเปรียบเทียบ alliin ในสารละลายมาตรฐานและสารละลายตัวอย่าง พบว่า UV spectrum ไม่แตกต่างกัน และค่า spectral similarity (R^2) ในช่วงความยาวคลื่น 200–260 นาโนเมตร เท่ากับ 0.999959 ดังแสดงในภาพที่ 8–12

Sample preparation

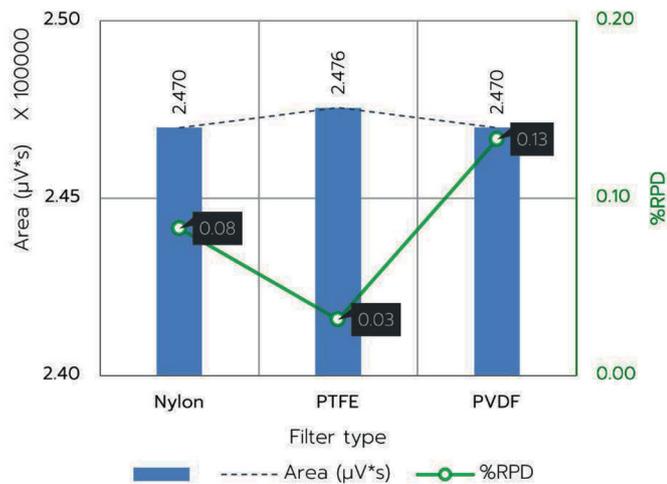


ภาพที่ 6 เปรียบเทียบโครมาโทแกรมที่ได้จากการศึกษาวิธีเตรียมตัวอย่างวิเคราะห์

ตารางที่ 4 ผลการเปรียบเทียบวิธีเตรียมตัวอย่างวิเคราะห์

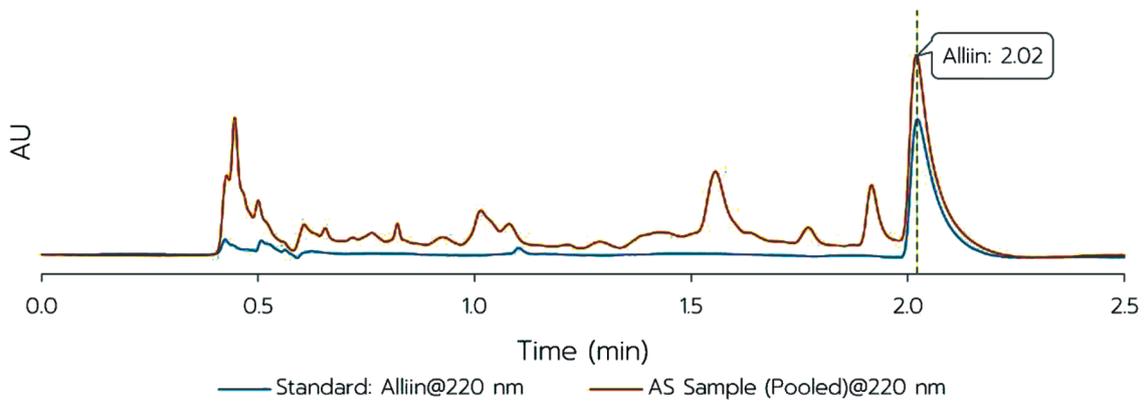
Solvent	Extraction		Centrifuge at 4°C for 15 min	Alliin (mg/g)				Average±SD
	Method	Time		#1	#2	#3	#4	
Water	Vortex mixing	1 min	No	-	-	-	-	-
50%MeOH	Vortex mixing	1 min	No	9.03	8.99	9.31	9.49	9.21±0.24
50%MeOH	Vortex mixing	1 min	Yes	9.47	9.23	9.71	8.83	9.31±0.37
50%MeOH	Maceration	60 min	No	-	-	-	-	-
50%MeOH	Sonication	10 min	No	-	-	-	-	-

Filter effect: Alliin

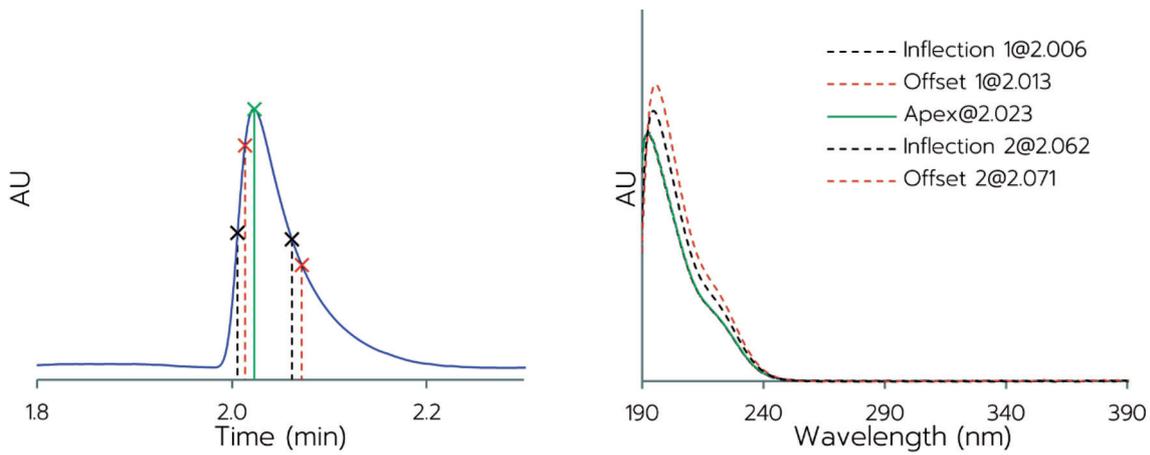


ภาพที่ 7 ผลการเปรียบเทียบผลกระทบของชนิดตัวกรองต่อปริมาณ alliin

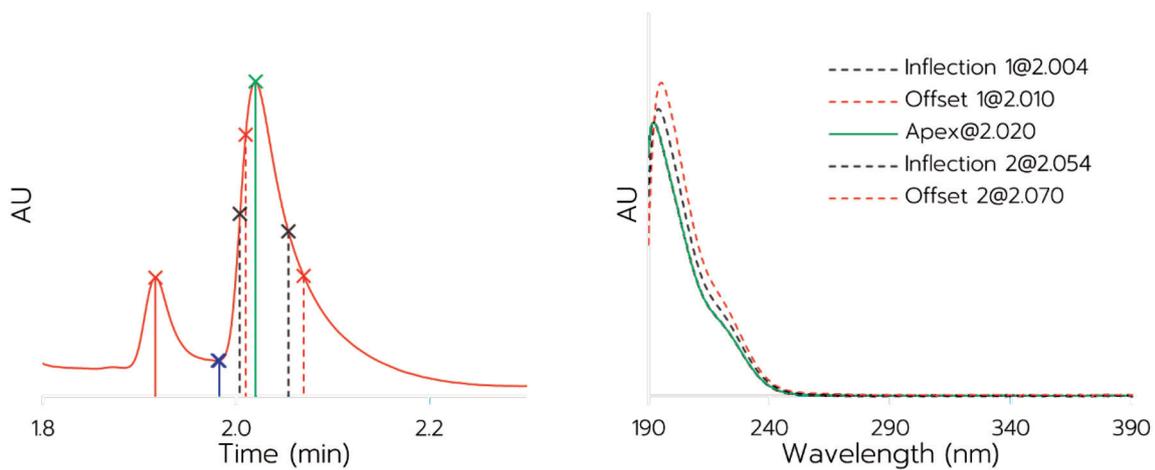
Overlaid chromatogram



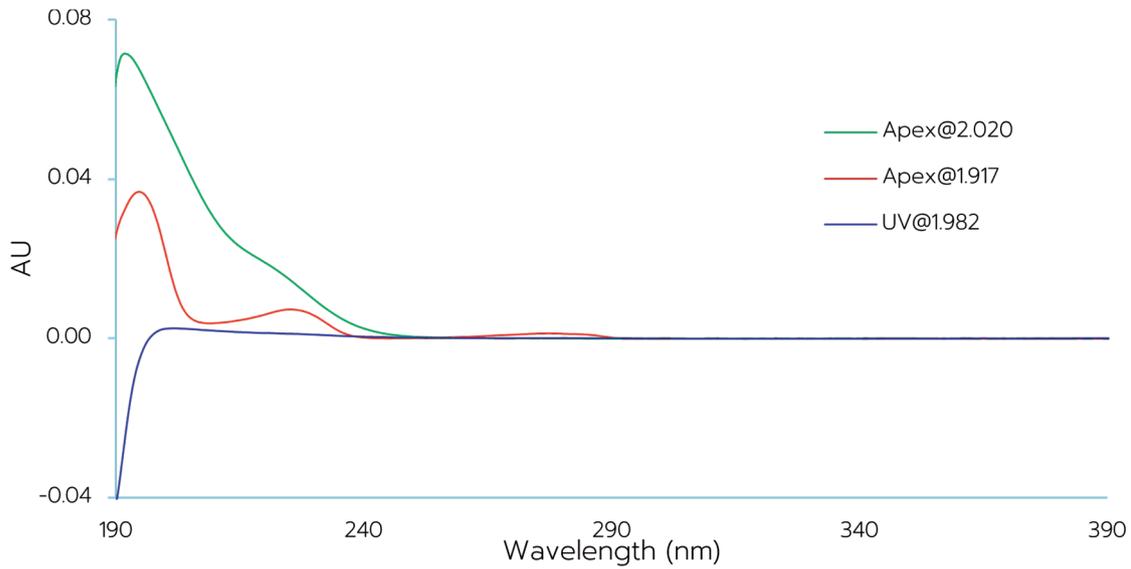
ภาพที่ 8 โครมาโทแกรมของ alliin ในสารละลายมาตรฐานและสารละลายตัวอย่าง



ภาพที่ 9 UV spectrum ของ alliin ในสารละลายมาตรฐาน

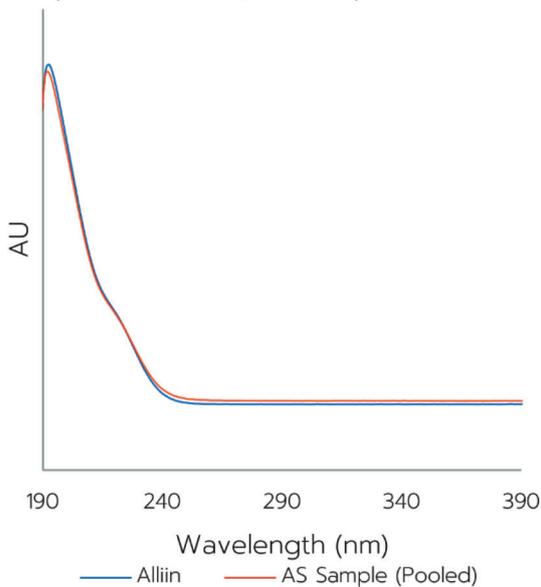


ภาพที่ 10 UV spectrum ของ alliin ในสารละลายตัวอย่าง

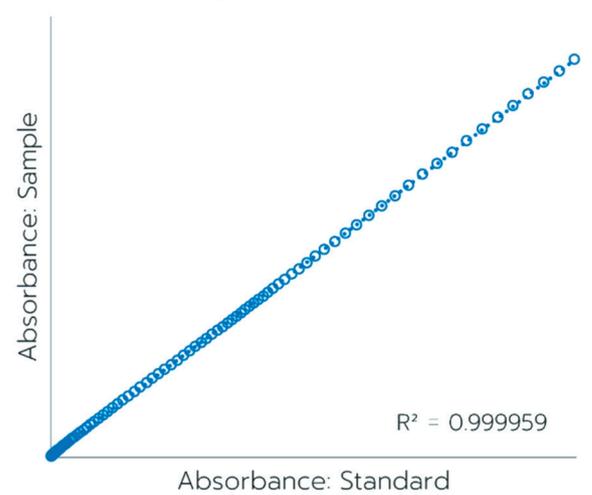


ภาพที่ 11 ผลการเปรียบเทียบ UV spectrum ระหว่างพีคข้างเคียง (1.917 นาที) baseline (1.982 นาที) และ alliin (2.020 นาที) ในสารละลายตัวอย่าง

UV Spectrum: Alliin | AS Sample



Spectral similarity: Alliin@2.02 min



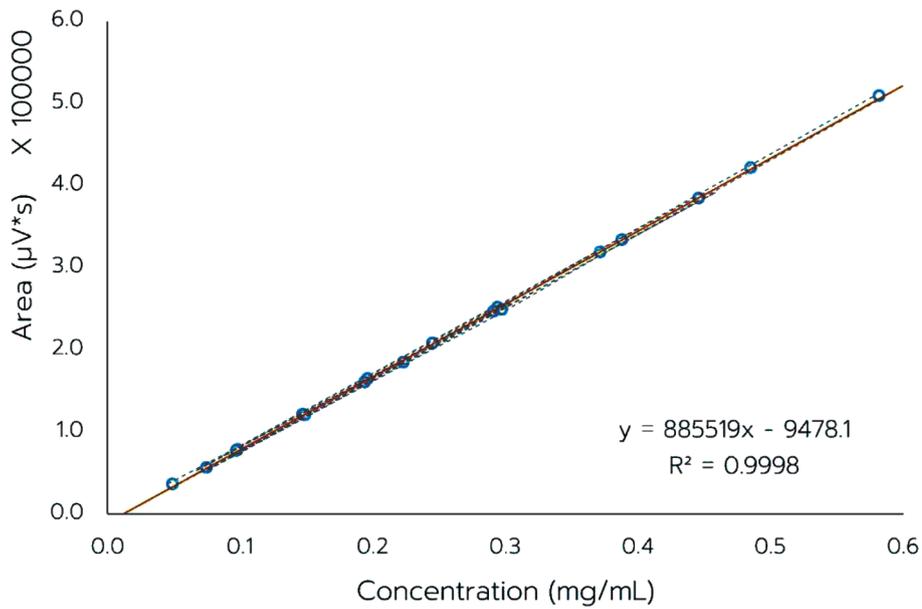
ภาพที่ 12 ค่า spectral similarity (R^2) ในช่วงความยาวคลื่น 200–260 นาโนเมตร

การทดสอบช่วงของการวัด และความเป็นเส้นตรง

ผลการวิเคราะห์สารละลายมาตรฐาน alliin ในช่วงระหว่าง 0.049 ถึง 0.582 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร พบว่ากราฟมาตรฐานที่ได้มีความเป็นเส้นตรง โดย

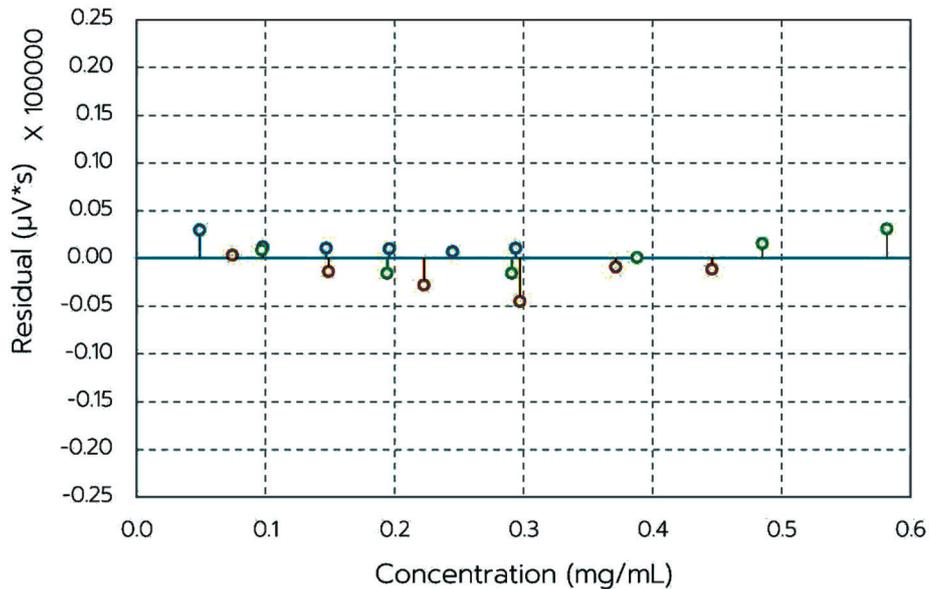
ค่าสัมประสิทธิ์การตัดสินใจ (R^2) เท่ากับ 0.999791 และค่า y-residuals ที่ได้จาก residual plots มีการกระจายครอบคลุมค่าศูนย์ โดยไม่พบค่าสุดต่าง (Outlier) ดังแสดงในภาพที่ 13 และ 14

Calibration curve: Alliin



ภาพที่ 13 กราฟมาตรฐาน alliin

Residual Plot: Alliin

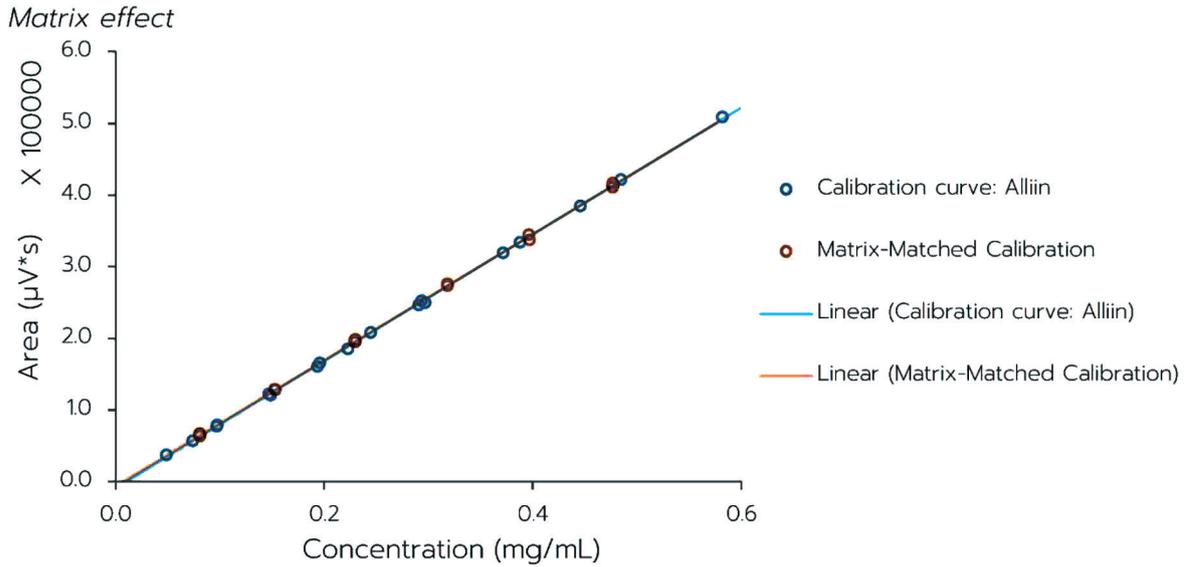


ภาพที่ 14 Residual plots ของกราฟมาตรฐาน alliin

การทดสอบผลกระทบของเมทริกซ์

พบความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณ alliin ในสารละลายมาตรฐานและปริมาณ alliin ใน spiked sample มีความเป็นเส้นตรงตลอดช่วงของการวัด ($R^2 = 0.999964$) การทดสอบด้วย paired *t*-test พบว่าค่า *t* จากการ

คำนวณ (2.479) น้อยกว่าค่าวิกฤต (2.571) แสดงว่าไม่มีผลกระทบของเมทริกซ์ และเมื่อประเมินผลพบว่าเมทริกซ์ทำให้ปริมาณ alliin ลดลง น้อยกว่า 20% (Suppressed 0.88%) ซึ่งอยู่ในเกณฑ์ยอมรับได้⁽²³⁾ ดังแสดงในภาพที่ 15



ภาพที่ 15 Matrix effect

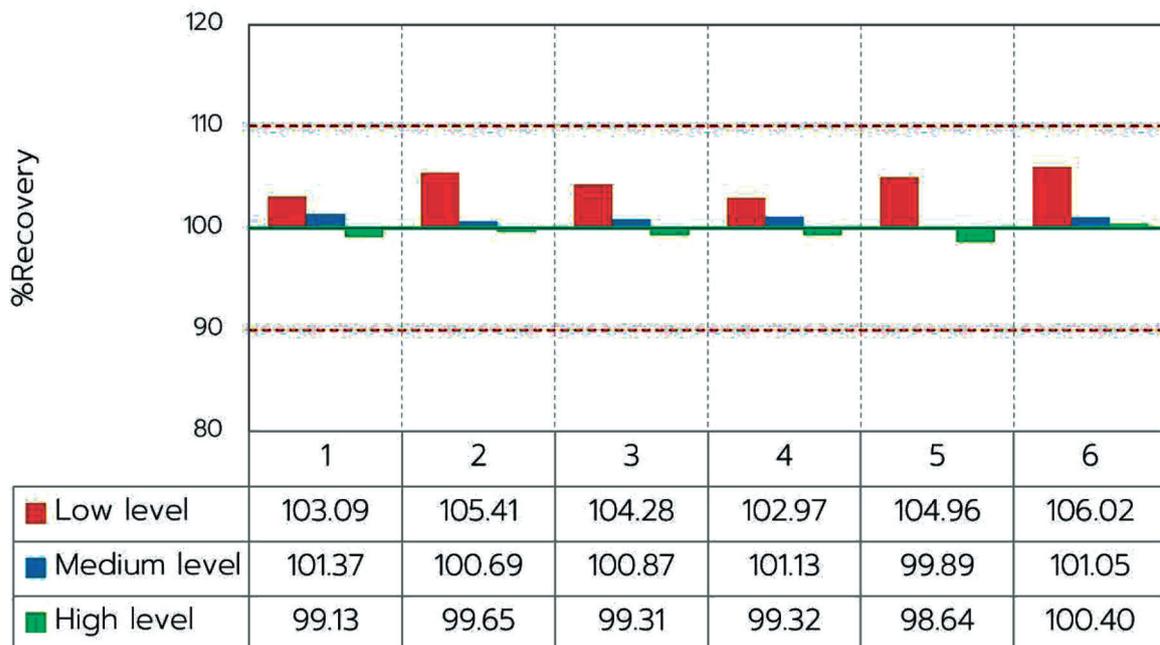
การทดสอบความแม่นยำ และความเที่ยง

ผลการวิเคราะห์ spiked sample ที่ระดับความเข้มข้น 0.08, 0.23 และ 0.48 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ระดับละ 6 ซ้ำ พบว่าค่า %Recovery เท่ากับ 102.97–106.02, 99.89–101.37 และ 98.64–100.40 ตามลำดับ

และ %RSD_r เท่ากับ 1.19, 0.51 และ 0.59 ตามลำดับ ดังแสดงในภาพที่ 16 และตารางที่ 5

ผลการทดสอบ within laboratory reproducibility พบว่า RPD เท่ากับ 2.39

Accuracy & Precision



ภาพที่ 16 %Recovery ที่ความเข้มข้น 3 ระดับ

ตารางที่ 5 ผลการทดสอบความแม่นยำและความเที่ยงของวิธีวิเคราะห์ปริมาณ alliin ในกระเทียมที่พัฒนาขึ้น

Spiked sample	%Recovery	%RSD
Low level (0.08 mg/mL)	104.46	1.19
Medium level (0.23 mg/mL)	100.83	0.51
High level (0.48 mg/mL)	99.41	0.59

การหาขีดจำกัดของการตรวจพบ (LOD) และ ขีดจำกัดของการหาปริมาณ (LOQ)

ผลจากการคำนวณ พบว่า LOD และ LOQ เท่ากับ 0.006 และ 0.033 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ

การยืนยันค่า LOQ ที่ระดับความเข้มข้น 0.029 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร จำนวน 10 ซ้ำ พบว่า %Error อยู่ในช่วง 14.5–16.3 และ %RSD เท่ากับ 4.28

การวิเคราะห์ปริมาณ alliin ในกระเทียม

เมื่อทำการวิเคราะห์ตัวอย่างกระเทียม จำนวน 8 ตัวอย่าง ด้วยวิธีที่พัฒนาขึ้น โดยวิเคราะห์ตัวอย่างละ 2 ซ้ำ ได้ค่าเฉลี่ย เท่ากับ 9.87 ± 2.75 มิลลิกรัมต่อกรัม ดังแสดงในตารางที่ 6

ตารางที่ 6 ผลการวิเคราะห์ปริมาณ alliin ในกระเทียม

Sample No.	Weight of sample (kg)		Yield (%)	Alliin (mg/g)			As is
	Raw	Dried powder		On dried basis			
				#1	#2	Average	
R024/64	2.1	0.84	40.00	4.89	4.82	4.85	1.94
R025/64	3.9	1.00	25.64	12.55	12.00	12.28	3.15
R026/64	2.1	0.70	33.33	13.58	13.57	13.57	4.52
R027/64	2.8	0.90	32.14	9.77	9.75	9.76	3.14
R028/64	2.2	0.83	37.73	9.51	9.74	9.62	3.63
R029/64	2.8	1.00	35.71	11.37	11.33	11.35	4.05
R031/64	2.3	0.83	36.09	7.34	7.51	7.42	2.68
R032/64	1.4	0.51	36.43	10.21	10.06	10.13	3.69
Average			34.63	9.90	9.85	9.87	3.35
SD			4.37	2.79	2.71	2.75	0.81

การทดสอบความคงตัวของสารละลายตัวอย่าง

ผลการทดสอบความคงตัวของสารละลายตัวอย่าง โดยการวิเคราะห์ซ้ำที่ระยะเวลา 15 นาที 30 นาที และ 24 ชั่วโมงหลังการเตรียม พบว่า %Compare เฉลี่ย เท่ากับ

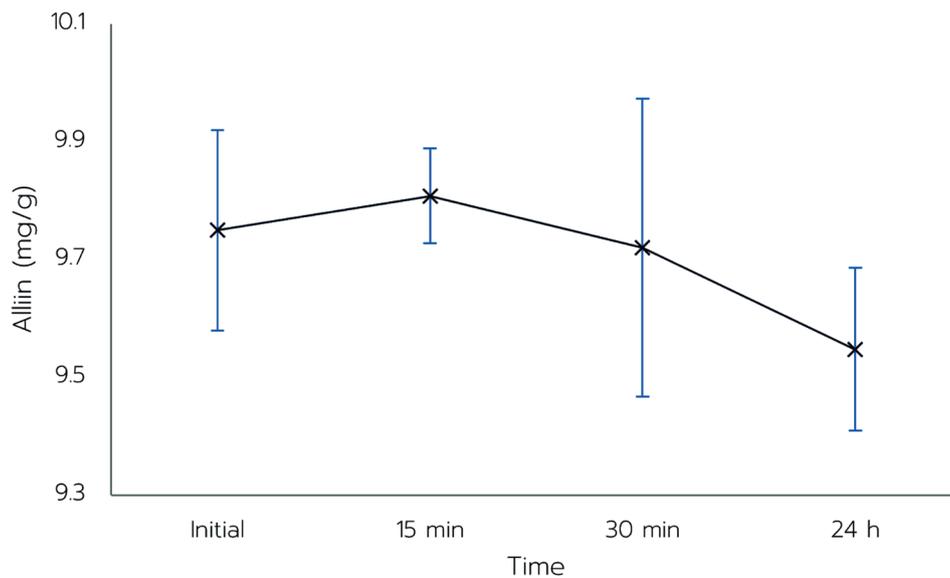
100.32, 99.98 และ 96.69 ตามลำดับ และ %RSD เท่ากับ 0.30, 0.04 และ 0.57 ตามลำดับ ดังแสดงในตารางที่ 7 และภาพที่ 17

ตารางที่ 7 ผลการทดสอบความคงตัวของสารละลายตัวอย่าง

Sample No.	Alliin (mg/g)				%Compare*			
	Initial	15 min	30 min	24 h	Initial	15 min	30 min	24 h
1	9.607	-	9.607	-	100.00	-	100.00	-
5	9.725	9.725	-	-	100.00	100.00	-	-
7	9.543	-	9.543	-	100.00	-	100.00	-
13	9.848	9.885	-	9.461	100.00	100.37	-	96.07
17	9.757	9.815	-	9.474	100.00	100.59	-	97.10
19	10.018	-	10.010	9.707	100.00	-	99.92	96.90
Average	9.750	9.808	9.720	9.548	100.00	100.32	99.97	96.69
SD	0.17	0.08	0.25	0.14	-	0.30	0.04	0.55
%RSD	1.75	0.82	2.60	1.45	-	0.30	0.04	0.57

หมายเหตุ: * เปรียบเทียบกับผลวิเคราะห์เริ่มต้น (Initial)

Stability of sample solution



ภาพที่ 17 ผลวิเคราะห์ปริมาณ alliin ของสารละลายตัวอย่าง ณ เวลาต่างๆ หลังการเตรียม

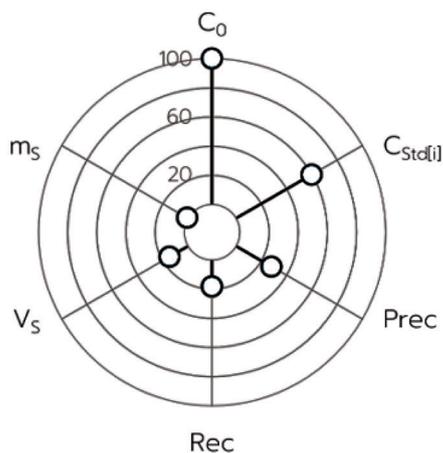
การประมาณค่าความไม่แน่นอนของการวิเคราะห์
ผลการประมาณค่าความไม่แน่นอนในตัวอย่าง

ดังแสดงในตารางที่ 8 และสัดส่วนแหล่งที่มาของ
ความไม่แน่นอน ดังแสดงในภาพที่ 18

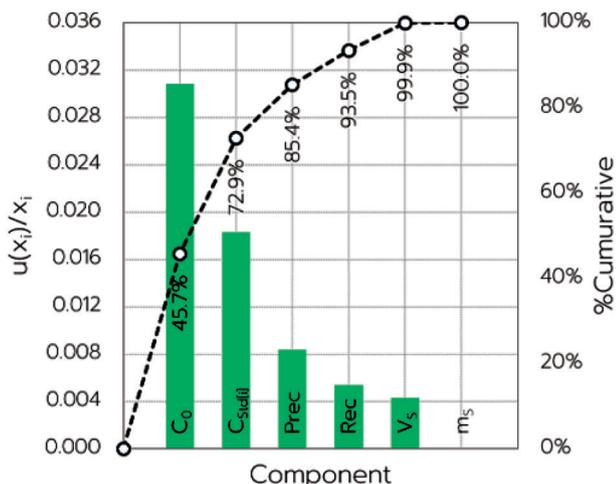
ตารางที่ 8 การประมาณค่าความไม่แน่นอนของการวิเคราะห์ปริมาณ alliin ในกระเทียม

Component	Value; x_i	Unit	$u(x_i)$	$u(x_i)/x_i$
Weight of sample; m_s	150	mg	0.00665225	0.00004435
Volume of sample; V_s	25	mL	0.10891750	0.00435670
Concentration of standard; $C_{Std[i]}$ (i = 1 to 6)				0.01833027
Purity of standard; Purity _{Std}	98	% w/w	0.57735027	0.00589133
Weight of standard; m_{Std}	37.47	mg	0.00642550	0.00017148
Volume of stock standard; V_{Std}	50	mL	0.21783499	0.00435670
Pipette for standard (level 1); $P_{Std[1]}$	1	mL	0.00631143	0.00631143
Pipette for standard (level 2); $P_{Std[2]}$	2	mL	0.01036034	0.00518017
Pipette for standard (level 3); $P_{Std[3]}$	3	mL	0.01554051	0.00518017
Pipette for standard (level 4); $P_{Std[4]}$	4	mL	0.01926171	0.00481543
Pipette for standard (level 5); $P_{Std[5]}$	5	mL	0.02318450	0.00463690
Pipette for standard (level 6); $P_{Std[6]}$	6	mL	0.02722187	0.00453698
Volume of working standard; $V_{Std[i]}$	10	mL	0.11113280	0.01111328
Concentration of sample preparation; C_0	0.0592	mg/mL	0.00182325	0.03077696
Precision; Prec	100	%	0.84119647	0.00841196
Recovery; Rec	101.57	%	0.54877567	0.00540312
Combined standard uncertainty				
Alliin content; C_s	9.873	mg/g		
Relative standard uncertainty; $u(C_s)/C_s$	0.03744540			
Standard uncertainty; $u(C_s)$	0.36971463	mg/g		
Expanded standard uncertainty				
$U(C_s)$	0.73942926	mg/g		
Reporting				
Alliin content:	9.87±0.74 mg/g (k = 2)			

%Distribution of U



Contribution of U



m_s : Weight of sample, V_s : Volume of sample, $C_{Std[i]}$: Concentration of standard; (i = 1 to 6)
 C_0 : Concentration of sample preparation, Prec: Precision, Rec: Recovery;

ภาพที่ 18 สัดส่วนแหล่งที่มาของความไม่แน่นอนของการวิเคราะห์ปริมาณ alliin ในกระเทียม

วิจารณ์

การศึกษาในครั้งนี้เมื่อพิจารณา alliin ที่มีโครงสร้างทางเคมีเป็น S-allyl-L-cysteine sulfoxide ควรเลือกใช้คอลัมน์ชนิด polar ซึ่งน่าจะให้ผลการแยกที่ดีกว่าและง่ายกว่าการใช้คอลัมน์ชนิด C₈, C₁₈ หรือ phenyl ที่เป็น end-capped ชนิด non-polar ในการพัฒนาวิธีวิเคราะห์ และพบว่าผลการทดสอบเป็นไปตามสมมติฐานที่ตั้งไว้ ทั้งนี้การใช้งานคอลัมน์ชนิด amide ซึ่งเป็น Hydrophilic Interaction Liquid Chromatography (HILIC) ต้องใช้เวลาในการ equilibrate คอลัมน์ที่นานกว่า ตัวอย่างที่เตรียมต้องมีสัดส่วนของ organic solvent สูง และการดูแลรักษาที่ยุงยากกว่าคอลัมน์ทั่วไป

จากการศึกษาผลของอุณหภูมิคอลัมน์ ในช่วงอุณหภูมิ 20–60 องศาเซลเซียส พบว่าค่า tailing factor ของ alliin ลดลงตามอุณหภูมิที่ลดลง แต่ส่งผลให้ความหนืดในระบบสูงขึ้น และค่า retention time ที่นานขึ้น ผู้วิจัยจึงเลือกที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส ซึ่งเป็นจุดสมดุลระหว่างค่า retention time และ tailing factor และจากการหาสภาวะที่เหมาะสมของระบบโครมาโทกราฟี เนื่องจากสารละลายตัวอย่างที่เตรียมได้ค่อนข้างหนืด ดังนั้นในช่วงการล้างคอลัมน์หลังการแยกของ alliin ได้ทำการปรับ gradient ของ flow rate จาก 0.55 มิลลิลิตรต่อนาที เป็น 0.40 มิลลิลิตรต่อนาที เพื่อลด backpressure ของระบบ โดยมีจุดประสงค์เพื่อยืดอายุการใช้งานของคอลัมน์และระบบภายในเครื่อง การทดสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์ปริมาณ alliin ในกระเทียมโดยวิธี UPLC หัวข้อการทดสอบช่วงของการวัดและความเป็นเส้นตรงทำการออกแบบการทดลองให้ซึ่งสารมาตรฐานของ stock ให้แตกต่างกัน 3 ช่วงน้ำหนัก โดยนักวิเคราะห์ 3 คน เพื่อลดอคติ (bias) ของการวิเคราะห์และทำให้ช่วงของการวัดครอบคลุมกว้างขึ้น ผลการทดสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์ปริมาณ alliin ในกระเทียมโดยวิธี UPLC ที่พัฒนาขึ้น พบว่ากราฟมาตรฐานของ alliin มีความเป็นเส้นตรงในช่วง 0.049–0.582 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร มีค่าสัมประสิทธิ์การตัดสินใจ (R²) เท่ากับ 0.999791 ค่าความแม่นยำในช่วงร้อยละ 98.64–106.02 ค่าความเที่ยงอยู่ในช่วงร้อยละ 0.51–1.19 ค่าขีดจำกัดของการตรวจพบและ

ขีดจำกัดของการหาปริมาณ เท่ากับ 0.006 และ 0.033 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ และผลการวิเคราะห์ปริมาณ alliin ในตัวอย่างกระเทียม จำนวน 8 ตัวอย่าง พบว่าค่าเฉลี่ย เท่ากับ 9.87±2.75 มิลลิกรัมต่อกรัม อย่างไรก็ตามวิธีวิเคราะห์ที่พัฒนาขึ้นอาจใช้ไม่ได้กับตัวอย่างที่แปรรูปด้วยวิธีการต่างกันหรือเมทริกซ์ที่ต่างกัน ซึ่งอาจส่งผลให้ fingerprint ที่ได้แตกต่างกัน และทำให้ผลการวิเคราะห์คลาดเคลื่อนได้ ดังนั้นในการจัดทำข้อกำหนดทางเคมีในการวิเคราะห์ปริมาณ alliin ในกระเทียม จึงควรระบุวิธีการแปรรูปตัวอย่างให้ชัดเจน และจากผลการทดสอบความคงตัวของสารละลายตัวอย่าง พบว่าสารละลายตัวอย่างมีความคงตัวเพียงพอสำหรับการวิเคราะห์จนจบกระบวนการ แต่ที่เวลา 24 ชั่วโมงหลังการเตรียมมีแนวโน้มลดลงเล็กน้อย (ลดลง 3.31%) ดังนั้นในการปฏิบัติงานจริงควรเตรียมสารละลายตัวอย่างและวิเคราะห์ให้แล้วเสร็จภายในวันเดียวกัน

จากการประมาณค่าความไม่แน่นอนของการวิเคราะห์ปริมาณ alliin ในกระเทียม พบว่าแหล่งที่มาของความไม่แน่นอนส่วนใหญ่ (> 99%) มาจากองค์ประกอบของความเข้มข้นสารละลายตัวอย่าง (C₀) ที่ 45.72% ความเข้มข้นสารมาตรฐาน (C_{Std(ii)}) ที่ 27.23% ความเที่ยง (Prec) ที่ 12.49% ความแม่นยำ (Rec) ที่ 8.03% และปริมาตรของสารละลายตัวอย่างที่ 6.47% โดยที่ความไม่แน่นอนที่เกิดจากน้ำหนักตัวอย่างมีค่าน้อยมาก ซึ่งผลรวมของค่าความไม่แน่นอนขยายที่คำนวณได้มีค่าไม่เกิน 10% ของปริมาณ alliin ที่วิเคราะห์ได้ (0.74/9.87 = 7.50%) และหากต้องการลดความไม่แน่นอนของการวิเคราะห์ ควรพิจารณาที่ค่า C₀ และ C_{Std(ii)} เป็นหลัก โดยการเลือกใช้สารมาตรฐานที่มีความบริสุทธิ์สูง เพิ่มจำนวนจุดบนกราฟมาตรฐานหรือเพิ่มจำนวนซ้ำของการวัด แต่ผลที่ตามมา คือ ค่าใช้จ่ายที่สูงขึ้น ดังนั้นควรคำนึงถึงความคุ้มค่าและความเหมาะสมต่อการใช้งาน

สำหรับในประเทศไทยยังไม่มีข้อกำหนดหรือเกณฑ์มาตรฐานของ alliin ในกระเทียม ดังนั้นวิธีวิเคราะห์ที่พัฒนาจากการศึกษานี้สามารถนำไปต่อยอดสำหรับการวิเคราะห์ปริมาณ alliin ในตัวอย่างกระเทียม โดยหากนำไปใช้กำหนดเป็นเกณฑ์มาตรฐานของปริมาณ

สารสำคัญในกระเทียม ควรเพิ่มจำนวนตัวอย่างอย่างน้อย 12 ตัวอย่าง

สรุป

การศึกษานี้ได้พัฒนาวิธีวิเคราะห์ alliin ในกระเทียมโดยวิธี UPLC และทำการทดสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์ พบว่าวิธีที่พัฒนาขึ้นนี้มีความจำเพาะเจาะจง ถูกต้อง และแม่นยำ สามารถนำไปใช้ในการวิเคราะห์ปริมาณ alliin ในกระเทียมเพื่อใช้ในการควบคุมคุณภาพ รวมถึงใช้ในการคัดเลือกกระเทียมที่มีคุณภาพเพื่อเข้าสู่กระบวนการผลิตยาหรือผลิตภัณฑ์สุขภาพต่อไป

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณ เจ้าหน้าที่ศูนย์ตรวจสอบและรับรองคุณภาพสมุนไพรทุกท่าน ที่ช่วยให้สามารถดำเนินการจนประสบความสำเร็จลุล่วงด้วยดี

เอกสารอ้างอิง

- Department of Medical Sciences, Ministry of Public Health. Krathiam (*Allium sativum* L.). In: Thai herbal pharmacopoeia 2021, Vol I. Bangkok: Bureau of Drug and Narcotic; 2021. p. 350–356.
- คณะกรรมการจัดทำตำราอ้างอิงยาสมุนไพรไทย. รายงานลักษณะทางเภสัชพฤกษศาสตร์และฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาของกระเทียม (*Allium sativum* L.). ว การแพทย์แผนไทยและการแพทย์ทางเลือก 2563; 18(1): 203–8.
- Ahmed S, Fahim J, Abdelmohsen U. Chemical and biological studies on *Allium sativum* L. (1952–2020): a comprehensive review. J Adv Biomed Pharm Sci 2022; 5(1): 1–22.
- Zhang Y, Liu X, Ruan J, Zhuang X, Zhang X, Li Z. Phytochemicals of garlic: promising candidates for cancer therapy. Biomed Pharmacother. [serial online]. 2020; [cited 2025 Oct 17]; 123: 109730. Available from: URL: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0753332219353521>.
- Mandal SK, Das A, Dey S, Sahoo U, Bose S, Bose A, et al. Bioactivities of allicin and related organosulfur compounds from garlic: overview of the literature since 2010. Egyptian J Chem 2019; 62(Spec Part 1): 1–11.
- Shang A, Cao SY, Xu XY, Gan RY, Tang GY, Corke H, et al. Bioactive compounds and biological functions of garlic (*Allium sativum* L.). Foods 2019; 8(7): 246. (31 pages).
- Singh P, Sachan M. A review on chemical constituents and biological activities of garlic (*Allium sativum*). J Emerg Technol Innov Res 2025; 12(1): b415–20.
- Moses RJ, Edo GI, Jikah AN, Agbo JJ. Bioactive compounds and biological activities of garlic. Curr Food Sci Technol Rep 2024; 2: 111–20.
- Janská P, Knejzlík Z, Perumal AS, Jurok R, Tokárová V, Nicolau DV, et al. Effect of physicochemical parameters on the stability and activity of garlic alliinase and its use for in-situ allicin synthesis. PLoS ONE 2021; 16(3): e0248878. (20 pages).
- Fujisawa H, Suma K, Origuchi K, Seki T, Ariga T. Thermostability of allicin determined by chemical and biological assays. Biosci Biotechnol Biochem 2008; 72(11): 2877–83.
- Zhou S, Yan X, Qiao X, Qiu Z, Zhu W, Lu X, et al. Evaluate the stability of synthesized allicin and its reactivity with endogenous compounds in garlic. NPJ Sci Food 2025; 9: 18. (9 pages).
- Zhang M, Zou X, Du Y, Pan Z, He F, Sun Y, et al. Integrated transcriptomics and metabolomics reveal the mechanism of alliin in improving hyperlipidemia. Foods 2023; 12(18): 3407–7.
- Kanaki NS, Rajani M. Development and validation of a thin-layer chromatography-densitometric method for the quantitation of alliin from garlic (*Allium sativum*) and its formulations. J AOAC Int 2005; 88(5): 1568–70.
- Siddiqui NA, Mothana RA, Alam P. Quantitative determination of alliin in dried garlic cloves

- and products by high-performance thin-layer chromatography. *Trop J Pharm Res* 2016; 15(8): 1759-65.
15. อาทิมนต์ แพทยานนท์. การวิเคราะห์หาปริมาณอัลลิอินในหัวกระเทียมและผลิตภัณฑ์กระเทียมโดยเทคนิคที่แอลซี-เดนิซิโตเมตรี. [วิทยานิพนธ์เภสัชศาสตรมหาบัณฑิต]. กรุงเทพฯ: จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย. [ออนไลน์]. 2538; [สืบค้น 17 ต.ค. 2568]; เข้าถึงได้จาก: URL: <https://digital.car.chula.ac.th/chulaetd/30373>.
 16. Hayashi T, Sano K, Ohsumi C. Gas chromatographic analysis of alliin in the callus tissues of *Allium sativum*. *Biosci Biotechnol Biochem* 1993; 57(1): 162-3.
 17. Apawu AK. Reversed-phase HPLC determination of alliin in diverse varieties of fresh garlic and commercial garlic products [dissertation]. Johnson City, TN: East Tennessee State University. [online]. 2009; [cited 2025 Aug 6]. Available from: URL: <https://dc.etsu.edu/etd/1803>.
 18. Miron T, Shin I, Feigenblat G, Weiner L, Mirelman D, Wilchek M, et al. A spectrophotometric assay for allicin, alliin, and alliinase (alliin lyase) with a chromogenic thiol: reaction of 4-mercaptopyridine with thio-sulfinates. *Anal Biochem* 2002; 307(1): 76-83.
 19. Charoenchai L, Luprasong C, Kraisintu K. Comparison of bioactive sulfur containing compounds in fresh garlic and garlic products. In: Rangsit University International Research Conference 2018. [online]. 2018; [cited 2025 Oct 17]. [9 screens]. Available from: URL: <https://rsucon.rsu.ac.th/files/proceedings/inter2018/G1-IN18-020.pdf>.
 20. Budavari S, editor. Alliin. In: *The Merck index: an encyclopedia of chemicals, drugs, and biologicals*. 11th ed. Rahway, NJ: Merck & Co., Inc.; 1989. p. 257.
 21. Lawson LD. Bioactive organosulfur compounds of garlic and garlic products: role in reducing blood lipids. In: *Nutraceuticals: designer foods III garlic, soy and licorice*. ACS symposium series 546. Washington, DC: American Chemical Society; 1993. p. 306-330.
 22. Fernández A, Sinanoglu O. Denaturation of proteins in methanol/water mixtures. *Biophys Chem* 1985; 21(3-4): 163-6.
 23. McCall E. Understanding sample complexity: determining matrix effects in complex food samples. Milford, MA: Waters Corporation. [online]. 2020; [cited 2025 Aug 6]; [5 screens]. Available from: URL: <https://legacy-stage.waters.com/blog/understanding-sample-complexity-determining-matri>.

Method Development of Determination of Alliin in Garlic Using Ultra Performance Liquid Chromatographic Technique

Nichapat Pattapong, Apirak Sakpetch, Vilailuk Chuennangchee,
Sirikarn Thana-ariyaroj, and Nuchjaree Seesanam

Medicinal Plant Research Institute, Department of Medical Sciences, Nonthaburi 11000, Thailand

ABSTRACT Alliin is a major bioactive compound found in garlic (*Allium sativum* L.). It exhibits pharmacological activities including antibacterial, anti-inflammatory, and antihypertensive effects. Therefore, the quantitative determination of alliin in garlic can be used to evaluate its quality. The objective of this study was to develop an analytical method for the quantitation of alliin in garlic using Ultra Performance Liquid Chromatography (UPLC). A 150 mg sample of garlic was extracted with 25 mL of 50% methanol by vortex mixing for 1 minute. The supernatant was filtered through a PTFE syringe filter, and a 1 μ L aliquot of the filtrate was injected into the chromatographic system. The separation was performed on an Acquity™ BEH® Amide column (2.1 \times 100 mm, 1.7 μ m). The mobile phase consisted of acetonitrile and water, beginning at a ratio of 85:15 for 0.65 minutes, then adjusted to 75:25 at 1.42 minutes, and subsequently to 86:14 at 1.52 minutes, and maintained at 86:14 until 2.30 minutes. The flow rate was 0.55 mL/min, the column temperature was maintained at 40°C and detection was carried out with a Photodiode Array (PDA) detector at 220 nm. It was found that the retention time of alliin was 2.02 minutes. As a result, the method validation demonstrated that the calibration curve for alliin was linear over the concentration range of 0.049–0.582 mg/mL with a coefficient of determination (R^2) of 0.999791. Accuracy ranged from 98.64% to 106.02%, while precision (RSD) was between 0.51% and 1.19%. The limit of detection (LOD) and limit of quantitation (LOQ) were 0.006 mg/mL and 0.033 mg/mL, respectively. Analysis of eight garlic samples revealed an average alliin content of 9.87 \pm 2.75 mg/g. This study demonstrates that the developed UPLC method is suitable for the quantification of alliin in garlic and can be applied for quality control as well as for the selection of high-quality garlic for pharmaceutical or health product manufacturing.

Keywords: Garlic, *Allium sativum*, Alliin, UPLC