

การวิเคราะห์ปริมาณเคอร์คูมินอยด์ในวัตถุดิบและผลิตภัณฑ์เครื่องสำอาง

จากพืชสกุลเคอร์คูมา

Analysis of Curcuminoids in Raw Materials and Cosmetic Products from *Curcuma* spp.

วิชญ์ ธงไชย^{1*} เฉลิมพล วงศ์ขัตถนันท¹ เฉลิมพร ทองพูน¹ อนงค์ ศรีโสภา¹

Wisanu Thongchai^{1*} Chalermphon Wongkadhon¹ Chalernporn Thongpoon¹ Anong Srisopa¹

บทคัดย่อ

ได้พัฒนาวิธีวิเคราะห์ปริมาณเคอร์คูมินอยด์ด้วยเทคนิคโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูงแบบวัฏภาคย้อนกลับโดยใช้คอลัมน์ชนิด RP-C₁₈ ใช้วัฏภาคเคลื่อนที่ประกอบด้วยอะซิโตนไทรล์และ 2% กรดอะซิติก ด้วยระบบ gradient elution และอัตราการไหล 1 มิลลิลิตรต่อนาที ตรวจวัดที่ความยาวคลื่น 425 นาโนเมตร พบว่าวิธีนี้มีความไว ความเฉพาะเจาะจง ความแม่นยำสูงและให้ค่าการตอบสนองของสัญญาณได้เป็นเส้นตรง สำหรับค่าขีดจำกัดต่ำสุดในการตรวจวัดของเคอร์คูมิน ดีเมทอกซีเคอร์คูมิน และบีสดีเมทอกซีเคอร์คูมิน เท่ากับ 0.09, 0.14 และ 0.15 มิลลิกรัมต่อลิตรตามลำดับ ขีดจำกัดต่ำสุดในการวิเคราะห์เชิงปริมาณสำหรับเคอร์คูมิน ดีเมทอกซีเคอร์คูมิน และบีสดีเมทอกซีเคอร์คูมิน เท่ากับ 0.32, 0.49 และ 0.50 มิลลิกรัมต่อลิตรตามลำดับ ช่วงของความเป็นเส้นตรงมีค่าตั้งแต่ความเข้มข้น 5-200 มิลลิกรัมต่อลิตร มีค่าเฉลี่ยร้อยละของการกลับคืนของเคอร์คูมิน ดีเมทอกซีเคอร์คูมิน และบีสดีเมทอกซีเคอร์คูมิน ของตัวอย่าง A1 เท่ากับ 98.48, 102.19 และ 96.57, ตัวอย่าง A2 เท่ากับ 101.45, 97.11 และ 97.19, ตัวอย่าง A3 เท่ากับ 97.75, 95.06 และ 97.71, ตัวอย่าง A4 เท่ากับ 98.87, 95.80 และ 95.68, ตัวอย่าง A5 เท่ากับ 97.22, 96.84 และ 96.83, ตัวอย่าง C1 เท่ากับ 97.04, 96.33 และ 95.95, ตัวอย่าง C2 เท่ากับ 96.01, 97.66 และ 99.73 ตามลำดับ วิธีที่นำเสนอนี้เป็นวิธีหนึ่งที่สามารถนำมาใช้วิเคราะห์ปริมาณเคอร์คูมินอยด์จากเหง้าขมิ้นและเครื่องสำอางที่มีส่วนผสมของขมิ้นได้

¹ สาขาวิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏพิบูลสงคราม อำเภอเมือง จังหวัดพิษณุโลก

* Corresponding author, e-mail : wisanuthongchai@hotmail.com

คำสำคัญ: โครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูงแบบวัฏภาคย้อนกลับ, เคอร์คูมิน, ดีเมทอกซีเคอร์คูมิน, บัสดีเมทอกซีเคอร์คูมิน

Abstract

Reversed phase high performance liquid chromatographic method using RP-C₁₈ column was developed for simultaneous determination of the curcuminoids. Mobile phase consisted of acetonitrile : 2% acetic acid with gradient elution system and flow rate at 1 mL/min were employed. The elution was measured at a wavelength of 425 nm. Method validation in terms of accuracy, precision, and reproducibility were investigated with linear response of detector. The limits of detection were found to be 0.097, 0.14 and 0.15 mg/L for curcumin, demethoxycurcumin and bis-demethoxycurcumin, respectively. Limits of quantitation for curcumin, demethoxycurcumin and bis-demethoxycurcumin were found to be 0.32, 0.49 and 0.50 mg/L, respectively. Linear range was found to be in the range of 5-200 mg/L. The average percentage recoveries of curcumin, demethoxycurcumin and bis-demethoxycurcumin were 98.48, 102.19 and 96.57 for A1, 101.45, 97.11 and 97.19 for A2, 97.75, 95.06 and 97.71 for A3, 98.87, 95.80 and 95.68 for A4, 97.22, 96.84 and 96.83 for A5, 97.04, 96.33 and 95.95 for C1, 96.01, 97.66 and 99.73 for C2, respectively. This method was successfully used for determination of curcuminoids from turmeric rhizome and pharmaceutical cosmetics.

Keyword: Reversed phase high performance liquid chromatography, curcumin demethoxycurcumin, bis-demethoxycurcumin

บทนำ

ในปัจจุบันนี้ประชาชนส่วนใหญ่ได้มีความสนใจในการเลือกใช้ยา เครื่องสำอาง และผลิตภัณฑ์เสริมอาหารที่มีส่วนประกอบของสมุนไพรมากขึ้น ในประเทศไทยมีสมุนไพรที่มีสรรพคุณทางยาหรือ

เครื่องสำอางอยู่หลายชนิดที่น่าจะมีการพัฒนาให้มีประสิทธิภาพในการใช้ เพื่อลดการนำเข้ายา หรือ เครื่องสำอางที่มีราคาแพง การใช้วัตถุดิบจากธรรมชาติที่มีอยู่ในประเทศ เพื่อนำมาทำเป็นผลิตภัณฑ์ต่างๆ จึงเป็นการส่งเสริมและสนับสนุนให้มีการปลูกสมุนไพรมากขึ้น และสามารถนำไปเพิ่มคุณค่า เมื่อนำเข้าสู่ กระบวนการแปรรูปเป็นผลิตภัณฑ์ การศึกษาวิจัยนี้เป็นการพัฒนาและปรับปรุงวิธีในการหาปริมาณเคอคูมินอยด์ (curcuminoids) จากเหง้าขมิ้น และสามารถเป็นแนวทางในการพัฒนาสมุนไพรไทยให้อยู่ในรูปแบบที่เหมาะสม สามารถนำไปพัฒนาต่อในเชิงพาณิชย์ต่อไปได้

พืชสมุนไพรที่อยู่ในวงศ์ Zingiberaceae มีอยู่หลายชนิด เช่น ขมิ้นชัน (*Curcuma longa* Linn.) ขมิ้นอ้อย (*Curcuma zedoaria* Roscoe.) ขมิ้นดำหรือว่านมหาเมฆ (*Curcuma aeruginosa* Roxb.) เป็นพืชสมุนไพรพื้นบ้านที่หาได้ง่าย ปลูกง่าย ราคาไม่แพงมีความปลอดภัยสูง และมีสรรพคุณหลากหลาย บางชนิดมีสรรพคุณทางเครื่องสำอาง โดยจะใช้ส่วนเหง้าทำเป็นยาพอก เพื่อรักษาผื่น สามารถช่วยในการรักษาสิว และทำให้ผิวขาวขึ้นอีกด้วย และบางชนิดมีสรรพคุณทางยา เช่น แก้อาการพุงอืด แก่ผดผื่นคัน แก้ท้องอืดเพื่อ รักษากระเพาะอาหาร ทำให้มดลูกเข้าอู่เร็วขึ้น ทำให้ประจำเดือนมาตามปกติ ปัจจุบันได้มีการนำสมุนไพรเหล่านี้มาใช้ในตำรับสมุนไพรบ้าง ในรูปของผงสมุนไพรและสารสกัด อย่างไรก็ตามการนำสมุนไพรมาเพิ่มคุณค่าให้เป็นผลิตภัณฑ์ยาเสริมอาหาร หรือเครื่องสำอาง จำเป็นต้องมีการควบคุมคุณภาพของสมุนไพร ตั้งแต่การนำชนิดที่ถูกต้องมาใช้ และการควบคุมให้มีปริมาณสารสำคัญที่คงที่ เพื่อทำการพัฒนาให้มีความเหมาะสมสำหรับการนำไปใช้ต่อไป

การตรวจเอกลักษณ์ของพืช โดยอาศัยลักษณะภายนอกของพืช เป็นวิธีที่ง่ายที่สุด ที่สามารถบอกได้ว่าเป็นพืชชนิดใด โดยการสังเกตลักษณะของ ขนาด รูปร่าง สีและร่องรอยบนพืช กลิ่น และรส อย่างไรก็ตาม การดูลักษณะภายนอกเพียงอย่างเดียว อาจไม่สามารถบ่งชี้ชนิดของพืชได้อย่างถูกต้อง ทำให้มีการใช้วิธีการทางโครมาโทกราฟีที่ได้รับการยอมรับกันอย่างกว้างขวางที่สำคัญ เพื่อช่วยในการจำแนกชนิดของพืช เทคนิคทางโครมาโทกราฟี ที่นิยมใช้เพื่อตรวจเอกลักษณ์ของพืช มีหลายวิธี เช่น Thin Layer Chromatography , High Performance Liquid Chromatography ซึ่งแต่ละเทคนิคจะมีข้อดีแตกต่างกันไป จากการศึกษาได้มีการรายงานในต่างประเทศในการจำแนกพืชบางชนิดในตระกูลนี้ ออกจากกันโดยอาศัยองค์ประกอบหลักที่สำคัญ Zhang et. Al.(2008)ได้แยกองค์ประกอบหลักของพืชทั้ง 2 ชนิดที่ผสมกันอยู่ด้วยเทคนิค HPTLC และ Gas Chromatographyพบว่า สามารถแยกสารองค์ประกอบของ *Curcuma*

aromatica Salisb. ออกจาก *Curcuma longa* Linn. ได้และพร้อมยืนยันผลของการวิเคราะห์ด้วยเทคนิค แก๊สโครมาโทกราฟี(Gas Chromatography,GC) Jadhav et al(2007) ได้ศึกษาสารองค์ประกอบหลักจาก เหง้าของ *Curcuma longa* Linn. ด้วยเทคนิค HPLC พบว่าสารองค์ประกอบหลักคือ curcumin, demethoxycurcumin และ bisdemethoxycurcumin ได้มีการรายงานในประเทศไทยจากการศึกษาของ Rui L. et. al.,(2011) โดยใช้เทคนิค HPLC มาวิเคราะห์องค์ประกอบของสารสำคัญของ *Curcuma longa* Linn. สามารถวิเคราะห์แยกสารองค์ประกอบหลักที่ทราบชนิดทั้งหมดจำนวน 5 องค์ประกอบ โดยเทคนิค GC ที่ได้ปรับปรุงขึ้นในการวิเคราะห์นี้สามารถใช้เป็นวิธีเพื่อทำ fingerprint ของ *Curcuma longa* Linn. ได้ ทั้งนี้ยังได้มีการศึกษาเพื่อหาวิธีวิเคราะห์สารสกัดของพืชในสกุล *Curcuma longa* Linn. นอกจากนี้ Mara E.M.B. และคณะ ได้ศึกษาวิธีการสกัดสารด้วยเทคนิคต่างๆ เพื่อเปรียบเทียบปริมาณสารสำคัญของ *Curcuma longa* Linn. พบว่า วิธีการสกัดที่ให้ปริมาณสารสำคัญมากที่สุด คือ Soxhlet extraction (Mare et. al., 2006)

จากการค้นคว้าพบว่ายังไม่มีการรายงานการเปรียบเทียบองค์ประกอบสารสำคัญจากพืชทั้งหมดที่มีการใช้มากในตระกูลนี้ เช่น ขมิ้นชัน ขมิ้นอ้อย ขมิ้นดำ ที่ปลูกในประเทศไทย ส่วนใหญ่จะเป็นการเปรียบเทียบองค์ประกอบจากพืชเพียงหนึ่งชนิดจากหลากหลายแหล่งหรือเปรียบเทียบองค์ประกอบพืชสองชนิด และเป็นที่ทราบกันดีว่าคุณภาพของสมุนไพรขึ้นอยู่กับปัจจัยหลายๆ ปัจจัย เช่น สภาพภูมิประเทศและภูมิอากาศในการเพาะปลูก การเก็บเกี่ยว การทำให้แห้ง และการเก็บรักษา ซึ่งจะส่งผลต่อการจำแนกพืชทางพฤกษศาสตร์ และองค์ประกอบในพืชสมุนไพร เพื่อให้ได้ข้อมูลที่จะนำไปใช้ประโยชน์ได้อย่างถูกต้อง และในประเทศไทยได้มีการนำพืชทั้ง 3 ชนิด มาใช้ในการรักษาโรคเบื้องต้นในแบบแผนโบราณของภูมิปัญญาชาวบ้าน จึงเห็นว่าการศึกษาวิจัยโดยใช้วิธีทางโครมาโทกราฟี มาช่วยในการจำแนกชนิดของพืชจะมีประโยชน์ต่อการศึกษาวิจัยในอนาคต

วิธีการศึกษาวิจัย

สารเคมี

1. Curcuminoids (Mixed standard) Sigma, U.S.A
2. Methanol (HPLC grade) Merck, Germany

3. Acetonitrile (HPLC grade) Lab-Scan, Ireland
4. Acetic acid (AR grade) Merck, Germany
5. Ethanol (AR grade) Merck, Germany
6. Hexane (AR grade) Ulsan, Korea

เครื่องมือ

1. เครื่องชั่งวิเคราะห์ (Analytical balance, AG 204 Mettler Toledo)
2. เครื่อง High performance liquid chromatography (SDP-M10A VP, Shimadzu)
3. เครื่องปั่นละเอียด (National, Japan)
4. เครื่อง UV-Visible spectrophotometer
5. เครื่อง Soxhlet extraction
6. ตู้อบ (Binder, บริษัท ไฮแอนติฟินโปรโมชั่น จำกัด)
7. ชุดกรองสูญญากาศ (Power consumption, Taiwan)

ตัวอย่างและการเตรียมตัวอย่าง

สุ่มเก็บตัวอย่างเครื่องสำอางจำนวน 3 ตัวอย่างและตัวอย่างขมิ้นชนิดต่างๆ จำนวน 5 ตัวอย่าง ในเขตจังหวัดพิษณุโลก *เตรียมผงแห้งของพืชตัวอย่าง* : คัดเลือกเหง้าขมิ้นตัวอย่างที่มีลักษณะสมบูรณ์ นำเหง้าที่ผ่านการทำความสะอาด ผึ่งให้แห้งมาหั่นเป็นแผ่นบางๆ อบที่อุณหภูมิ 60 °C เป็นเวลา 48 ชั่วโมง บดให้เป็นผงละเอียดด้วยเครื่องปั่นละเอียดแล้วเก็บใส่ภาชนะที่ปิดสนิท

การสกัดสารสำคัญจากเหง้าขมิ้นด้วยวิธี Soxhlet extraction: ชั่งผงแห้งหนัก 2 กรัม สกัดด้วยเฮกเซน (hexane) ปริมาตร 200 มิลลิลิตร เป็นเวลา 2 ชั่วโมง และสกัดซ้ำโดยใช้ methanol เป็นเวลา 2 ชั่วโมง แล้วนำไประเหยตัวทำละลายออกด้วยเครื่อง rotator evaporator จากนั้นเก็บแยกสารสกัดเข้มข้นที่ได้ใส่ลงในขวดที่มีฝาปิดสนิท นำสารสกัดที่ได้นำมาคำนวณหาค่า % yield

การเตรียมสารละลายมาตรฐาน

ชั่งสารมาตรฐานเคอร์คูมินอยด์ให้น้ำหนักที่แน่นอน 10 mg ละลายด้วยเอทานอล 10 mL จะได้สารละลายมาตรฐานเคอร์คูมินอยด์ที่มีความเข้มข้น 1000 mg/L และเตรียมสารละลายมาตรฐานเคอร์คูมิน

นอยด์ ที่มีความเข้มข้นต่างๆ แล้วปรับปริมาตรด้วยเอทานอล แล้วกรองสารละลายมาตรฐานแต่ละความเข้มข้นด้วยกระดาษกรองไนลอน ขนาด 0.45 μm

ศึกษาสภาวะที่เหมาะสมของระบบ HPLC

การหาความยาวคลื่นของการดูดกลืนแสงสูงสุด : เตรียมสารละลายมาตรฐานเคอร์คูมินอยด์ที่มีความเข้มข้น 1000 mg/L โดยการชั่งสารมาตรฐานเคอร์คูมินอยด์จำนวน 50 mg ใส่ในขวดวัดปริมาตรขนาด 50 mL ปรับปริมาตรด้วยเอทานอล จำนวน 50 mL แล้วทำการเจือจางให้สารมาตรฐานมีความเข้มข้นเป็น 20 mg/L แล้วนำไปตรวจวัดหาความยาวคลื่นของการดูดกลืนแสงสูงสุดตั้งแต่ความยาวคลื่นในช่วง 200-700 nm ด้วยเครื่อง UV-Visible spectrophotometer

ศึกษาองค์ประกอบของวัฏภาคเคลื่อนที่ : โดยพิจารณาจากความแรงของสภาพความมีขั้วของตัวทำละลายให้เหมาะสมกับสารสำคัญและวัฏภาคคงที่ โดยปรับอัตราส่วนระหว่างตัวทำละลายอินทรีย์กับน้ำในวัฏภาคเคลื่อนที่ และอัตราการไหลของวัฏภาคเคลื่อนที่ที่เหมาะสม ทั้งนี้ได้พิจารณาในเรื่องความดันของระบบและเวลาที่ใช้ในการวิเคราะห์

ศึกษาชนิดของคอลัมน์ : โดยเตรียมสารละลายมาตรฐานเคอร์คูมินอยด์ที่มีความเข้มข้น 20 mg/L ฉีดเข้าสู่ระบบ HPLC ที่มีวัฏภาคเคลื่อนที่ที่เหมาะสมในการแยกและตรวจวัดที่ความยาวคลื่น 425 nm แล้วศึกษาโครมาโทแกรมของสารมาตรฐานผสมเคอร์คูมินอยด์ที่คอลัมน์ที่ให้ประสิทธิภาพการแยกที่ดีที่สุด

ศึกษาอัตราการไหล : ศึกษาอัตราการไหล (flow rate) ตั้งแต่ 0.5-1.5 mL/min

การตรวจสอบความถูกต้องของเทคนิค HPLC ที่พัฒนาขึ้น

ขีดจำกัดของการตรวจวัดและขีดจำกัดของการวิเคราะห์ปริมาณ (*LOQ and LOQ*): คำนวณหาได้จากกราฟมาตรฐานเคอร์คูมินอยด์ โดยใช้สมการในการคำนวณ $\text{LOD} = 3(\text{S.D./s})$ และ $\text{LOQ} = 10 (\text{S.D./s})$ โดยที่ S.D คือส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานของสัญญาณและ s คือความชันของเส้นตรง

ความเป็นเส้นตรงและช่วงของความเป็นเส้นตรง (*linearity and range*): เตรียมสารละลายมาตรฐานเคอร์คูมินอยด์ ที่มีความเข้มข้นต่างๆ ดังนี้ 5, 25, 50, 75, 100, 125, 150, 175, 200, 225, 250, 275, 300, 325, 350, 375, 400, 425, 450, 475 และ 500 mg/L ตามลำดับ แล้วนำไปฉีดเข้าสู่ระบบ HPLC ที่ปริมาตร 10 μL ทำการทดลองซ้ำ 5 ซ้ำ

ความเที่ยง (precision) : เตรียมสารละลายมาตรฐานคอร์คูมินอยด์ที่มีความเข้มข้นต่างๆ ดังนี้ 5, 10, 15 และ 20 mg/L ตามลำดับแล้วนำไปฉีดเข้าระบบ HPLC ที่ปริมาตร 10 μ L ทำการทดลองซ้ำในวันเดียว 7 ซ้ำ (intra-day) และทำการทดลองซ้ำระหว่างวัน 7 ซ้ำ (inter-day) นำผลที่ได้ไปคำนวณหาค่า S.D หรือ R.S.D

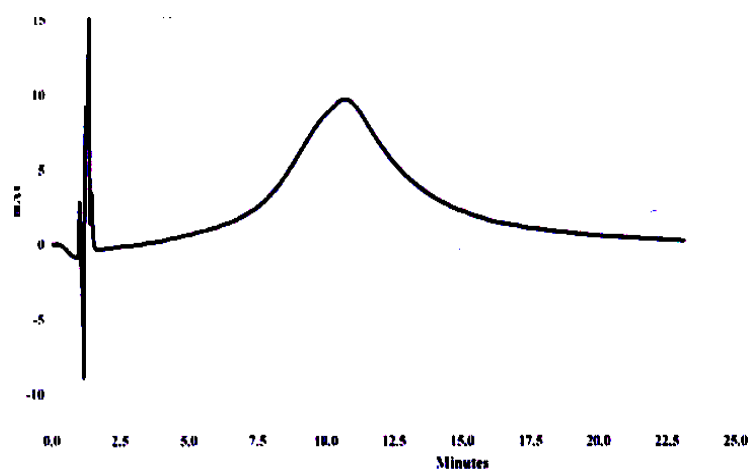
ความแม่นยำ (accuracy) : เตรียมโดยขังสารสกัด (crude extract) น้ำหนัก 10 mg ปรับปริมาตร 10 mL ด้วยเอทานอล แล้วปิเปตสารละลายตัวอย่างปริมาตร 500 μ L ใส่ลงในขวดวัดปริมาตรขนาด 5 mL จำนวน 4 ขวด ขวดที่ 1 ปรับปริมาตรด้วยเอทานอล ส่วนขวดที่ 2, 3 และ 4 เติมสารละลายมาตรฐานคอร์คูมินอยด์ปริมาตรจำนวน 5, 10 และ 15 μ L ตามลำดับ แล้วปรับปริมาตรด้วยเอทานอลจนมีปริมาตรครบ 1 mL แล้วนำไปฉีด เข้าระบบ HPLC ที่ปริมาตร 10 μ L ทำการทดลองซ้ำ 3 ซ้ำ แล้วนำผลที่ได้ไปคำนวณหาค่าร้อยละของการกลับคืน (% recovery)

ผลและอภิปราย

ผลการศึกษาค่าการดูดกลืนแสงสูงสุดของสารละลายมาตรฐานคอร์คูมินอยด์ : ค่าการดูดกลืนแสงสูงสุดของสารละลายมาตรฐานคอร์คูมินอยด์ เท่ากับ 425 nm จึงเลือกใช้ความยาวคลื่นนี้ในการตรวจวัดตลอดการวิเคราะห์

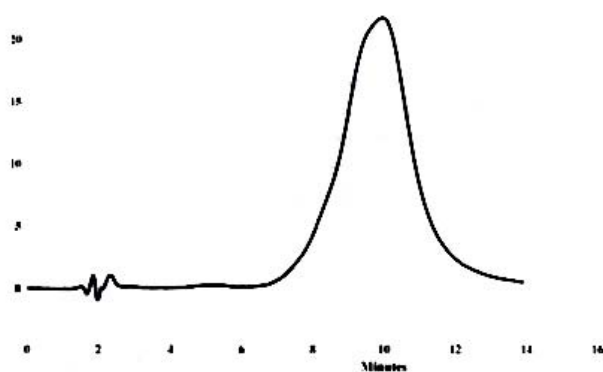
ผลการศึกษาชนิดของวัฏภาคเคลื่อนที่และสัดส่วนที่เหมาะสม : ระบบวัฏภาคเคลื่อนที่ที่นำมาศึกษามี 4 ระบบคือ ระบบที่ (1) propanol กับ sodium dodecyl sulfate (SDS) pH 7, ระบบที่ (2) water กับ 70% methanol, ระบบที่ (3) water กับ acetonitrile และระบบที่ (4) 2% acetic acid กับ acetonitrile

ระบบที่ 1 เมื่อนำ propanol กับ sodium dodecyl sulfate (SDS) pH 7 มาใช้เป็นวัฏภาคเคลื่อนที่ในเทคนิค HPLC ด้วยระบบ isocratic elution อัตราการไหลเท่ากับ 1 mL/min ใช้คอลัมน์ Inertsil ODS-3 ขนาด 4.60 $\times$ 150 mm ตรวจวัดที่ความยาวคลื่น 425 nm ปริมาตรสารละลายที่ฉีดเท่ากับ 10 μ L โดยฉีดสารละลายมาตรฐานผสมคอร์คูมินอยด์ที่มีความเข้มข้นของสารละลายผสมเท่ากับ 20 mg/L ได้โครมาโทแกรมดังแสดงในรูปที่ 1 พบว่าสารละลายมาตรฐานคอร์คูมินอยด์ทั้งสามชนิดไม่สามารถทำให้แยกออกจากกันได้และนอกจากนี้ยังมีปัญหาเรื่องฟองอากาศ



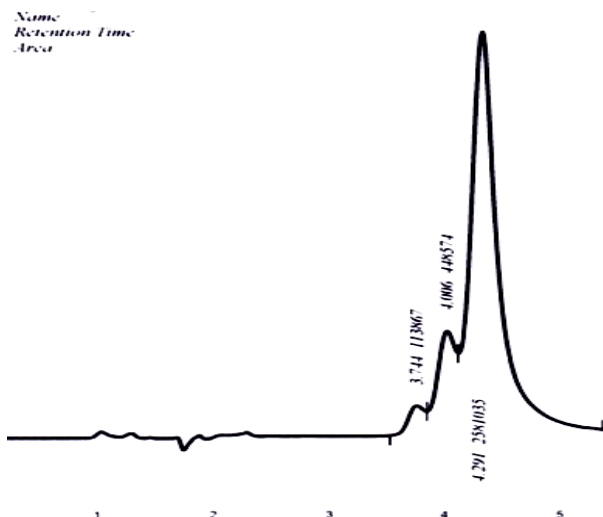
รูปที่ 1 แสดงลักษณะโครมาโทแกรมของระบบ isocratic elution ของวัฏภาคเคลื่อนที่ผสมระหว่าง propanol กับ sodium dodecyl sulfate (SDS) pH 7 ที่อัตราส่วน 5:95 (v/v)

ระบบที่ 2 เมื่อนำ water กับ 70% methanol มาใช้เป็นวัฏภาคเคลื่อนที่ในเทคนิค HPLC ได้โครมาโทแกรมดังแสดงในรูปที่ 2 พบว่าสารละลายมาตรฐานเคอร์คูมินอยด์ทั้งสามชนิดไม่สามารถทำให้แยกออกจากกันได้



รูปที่ 2 แสดงลักษณะโครมาโทแกรมของระบบ isocratic elution ของวัฏภาคเคลื่อนที่ผสมระหว่าง water กับ 70% methanol ที่อัตราส่วน 5:95 (v/v)

ระบบที่ 3 เมื่อนำ water กับ acetonitrile มาใช้เป็นวัฏภาคเคลื่อนที่ในเทคนิค HPLC ได้โครมาโทแกรมดังแสดงในรูปที่ 3 พบว่าสารละลายมาตรฐานคอร์คูมินอยด์ทั้งสามชนิดไม่สามารถแยกออกจากกันได้ดี และมีค่า resolution ต่ำ

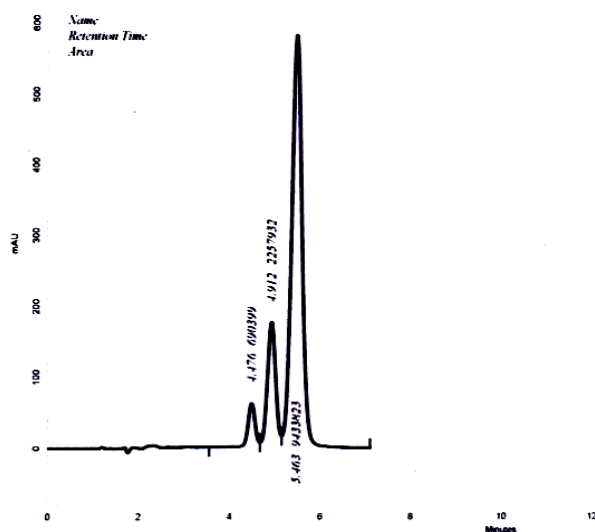


รูปที่ 3 แสดงลักษณะโครมาโทแกรมของระบบ isocratic elution ของวัฏภาคเคลื่อนที่ผสมระหว่าง water กับ acetonitrile ที่อัตราส่วน 5:95 (v/v)

ระบบที่ 4 เมื่อนำ 2% acetic acid กับ acetonitrile มาใช้เป็นวัฏภาคเคลื่อนที่ในเทคนิค HPLC ได้โครมาโทแกรมดังแสดงในรูปที่ 4 พบว่าสารละลายมาตรฐานคอร์คูมินอยด์ทั้งสามชนิดแยกออกจากกันได้ดีและมีค่า resolution ที่ดีพอสำหรับการวิเคราะห์ ทำให้สามารถเลือกระบบนี้มาใช้เป็นวัฏภาคเคลื่อนที่ และใช้เวลาในการวิเคราะห์ 6 นาที

ตารางที่ 4 แสดงสัดส่วนวัฏภาคเคลื่อนที่

เวลา (นาที)	acetonitrile (%A)	2% acetic acid (%B)
0.01	40	60
10.00	20	80
12.00	40	60



รูปที่ 4 แสดงลักษณะโครมาโทแกรมของระบบ gradient elution ของวัฏภาคเคลื่อนที่ผสมระหว่าง 2% acetic acid กับ acetonitrile ด้วยคอลัมน์: HPLC Packed Column Inertsil ODS-3 ขนาด 4.60×150 mm

ผลการศึกษาชนิดของคอลัมน์ : ได้ระบบของวัฏภาคเคลื่อนที่ที่เหมาะสมจากการทดลองระบบที่ 4 จากนั้นทำการศึกษาชนิดของคอลัมน์ที่เหมาะสมสำหรับแยกสารสำคัญทั้งสามชนิดจากขมิ้น คอลัมน์ที่นำมาศึกษาทั้งหมดสามชนิดคอลัมน์ ได้แก่ คอลัมน์ที่ 1 : Chromolith RP-18 ขนาด 4.60×25 mm (Merck, Germany), คอลัมน์ที่ 2 : Hypersil ODS-3 ขนาด 4.60× 150 mm. (GL Sciences Inc. Japan) และ คอลัมน์ที่ 3 : Inertsil ODS-3 ขนาด 4.60×150 mm (GL Sciences Inc. Japan)เมื่อนำ 2% acetic acid กับ acetonitrile มาใช้เป็นวัฏภาคเคลื่อนที่ในเทคนิค HPLC ด้วยระบบ gradient elution สัดส่วนวัฏภาคเคลื่อนที่แสดงดังตารางที่ 4 อัตราการไหลเท่ากับ 1 mL/min เมื่อใช้คอลัมน์ชนิดที่ 1 : Chromolith RP-18 ขนาด 4.60×25 mm ตรวจวัดที่ความยาวคลื่น 425 nm ปริมาตรสารละลายที่ฉีดเท่ากับ 10 µL ฉีดสารละลายมาตรฐานเคอร์คูมินอยด์ที่มีความเข้มข้นของสารละลาย 20 mg/L ได้โครมาโทแกรมดังแสดงในรูปที่ 8 (ก) พบว่าสารละลายมาตรฐานเคอร์คูมินอยด์ทั้งสามชนิด ไม่สามารถทำให้แยกออกจากกันได้ด้วยคอลัมน์ชนิดนี้

เมื่อใช้คอลัมน์ชนิดที่ 2 : Hypersil ODS-3 ขนาด 4.60×150 mm มาใช้แยกสารละลายมาตรฐาน เคอร์คูมินอยด์ ได้โครมาโทแกรมดังแสดงในรูปที่ 8 (ข) พบว่าสารละลายมาตรฐานเคอร์คูมินอยด์ทั้งสามชนิด แยกออกจากกันไม่ได้ มีค่า resolution ต่ำ จึงไม่สามารถใช้คอลัมน์ชนิดนี้มาทำการแยกสารได้

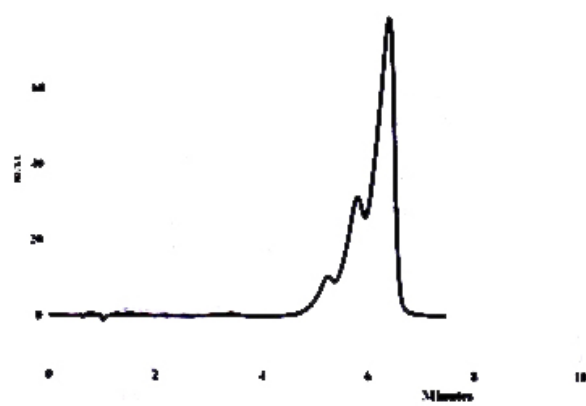
เมื่อใช้คอลัมน์ชนิดที่ 3 : Inertsil ODS-3 ขนาด 4.60×150 mm มาใช้แยกสารละลายมาตรฐาน ผสมเคอร์คูมินอยด์ ได้โครมาโทแกรมดังแสดงในรูปที่ 5 (ค) พบว่าสารละลายมาตรฐานเคอร์คูมินอยด์ทั้งสามชนิด แยกออกจากกันได้ดี มีค่า resolution เป็นที่ยอมรับได้ และใช้เวลาในการวิเคราะห์ 6 นาที จึงเลือกใช้คอลัมน์ชนิดนี้มาใช้ในการแยกสารเคอร์คูมินอยด์จากขมิ้นได้

การศึกษาอัตราการไหล (flow rate) ที่เหมาะสม : จากการศึกษาอัตราการไหลของระบบที่อัตราการไหล 0.5, 1.0 และ 1.5 mL/min ตามลำดับ จากการทดลองพบว่า เมื่อลดอัตราการไหลของวัฏภาคเคลื่อนที่เป็น 0.5 mL/min ปรากฏว่าสารเคอร์คูมินอยด์ของทั้งสามชนิดไม่สามารถแยกออกจากกันได้ และเมื่อเพิ่มอัตราการไหลของวัฏภาคเคลื่อนที่เป็น 1.0 mL/min ได้พีคของสารเคอร์คูมินอยด์ของทั้งสามชนิด แยกออกจากกันได้ดี แต่เมื่อเพิ่มอัตราการไหลของวัฏภาคเคลื่อนที่เป็น 1.5 mL/min นั้นทำให้สารที่ต้องการแยกออกเร็วขึ้นและไม่สามารถแยกพีคของสารเคอร์คูมินอยด์ของทั้งสามชนิดได้ จึงเลือกอัตราการไหลของวัฏภาคเคลื่อนที่เท่ากับ 1.0 mL/min ให้ผลการทดลองที่เหมาะสมที่สุด และจากโครมาโทแกรมรูปที่ 4 bisdemethoxycurcumin (BDMC) มี retention time เท่ากับ 4.47 นาที, demethoxycurcumin (DMC) มี retention time เท่ากับ 4.91 นาที และ curcumin (C) มี retention time เท่ากับ 5.46 นาที ตามลำดับ

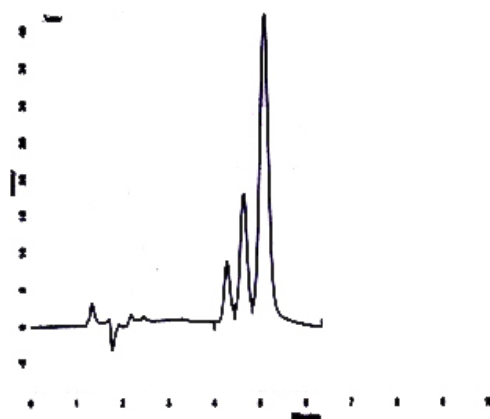
(n)



(o)



(p)



รูปที่ 5 แสดงลักษณะโครมาโตแกรมของสารมาตรฐานเคอร์คูมินอยด์ด้วยคอลัมน์

(ก) Chromolith RP-18 ขนาด 4.60×25 mm

(ข) Hypersil ODS-3 ขนาด 4.60×150 mm

(ค) Inertsil ODS-3 ขนาด 4.60×150 mm

ผลการศึกษาความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์

ผลการศึกษาขีดจำกัดต่ำสุดของการตรวจวัด (limit of detection) : จากการศึกษาขีดจำกัดต่ำสุดของการตรวจวัด (Limit of detection) เพื่อดู sensitivity ของวิธีวิเคราะห์ปริมาณ BDMC, DMC และ C พบว่ามีค่าขีดจำกัดต่ำสุดที่สามารถตรวจวัดได้ที่ความเข้มข้นเท่ากับ 0.10 mg/L ของ BDMC, 0.14 mg/L ของ DMC และ 0.15 mg/L ของ C ตามลำดับ

ผลการศึกษาขีดจำกัดของการวิเคราะห์ปริมาณ (limit of quantitation) : พบว่ามีค่าขีดต่ำสุดที่สามารถวิเคราะห์ได้ที่ความเข้มข้นเท่ากับ 0.32 mg/L ของ BDMC, 0.49 mg/L ของ DMC และ 0.51 mg/L ของ C ตามลำดับ

ผลการศึกษาความเป็นเส้นตรง (linearity) : เมื่อตรวจวัดปริมาณสารละลายมาตรฐานเคอร์คูมินอยด์ในช่วงความเข้มข้น 5-20 mg/L ที่ได้จากการทดลองทั้ง 2 วันพบว่าค่า R^2 ของทั้ง 2 วันมีค่ามากกว่า 0.99 และมีความคงตัวของเส้นกราฟทั้ง 2 วันสูงโดยดูจากค่า slope และค่า R^2

ผลการศึกษาช่วงความเป็นเส้นตรง (linear range) : โดยการเพิ่มความเข้มข้นตั้งแต่ 5 mg/L ถึง 500 mg/L แล้วดูความเป็นเส้นตรงของกราฟได้กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างพื้นที่ใต้พีคกับความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐานเคอร์คูมินอยด์ จะได้กราฟที่ให้ค่าความเป็นเส้นตรงของ BDMC, DMC และ C ในช่วงความเข้มข้น 5-200 mg/L

ผลการศึกษาความแม่นยำ (precision) : โดยศึกษาค่า repeatability และ reproductability คำนวณหาค่า % RSD ของผลการทดลอง ได้ค่า % RSD ไม่เกิน $\pm 5\%$ จะอยู่ในช่วงที่ยอมรับได้ ดังรายละเอียดผลการทดลองในตารางที่ 10

ตารางที่ 10 แสดงค่าความแม่นยำของวิธีวิเคราะห์

ความเข้มข้น (mg/L)	Repeatability			Reproductability		
	(% R.S.D)			(% R.S.D)		
	BDMC	DMC	C	BDMC	DMC	C
5	0.57	0.75	0.30	0.89	1.99	1.22
10	0.89	1.85	2.82	0.78	2.92	2.82
15	0.82	1.96	1.93	0.63	1.94	1.80
20	1.71	1.10	4.24	0.86	3.87	3.84

ผลการศึกษาความถูกต้อง (accuracy) : การศึกษาความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์โดยการคำนวณหาค่า % recovery ดังรายละเอียดผลการทดลองในตารางที่ 11

ตารางที่ 11 ตารางแสดงค่า % recovery ของตัวอย่างไขมัน

ตัวอย่าง	สารสำคัญ	% recovery
A1	BDMC	98.49
	DMC	102.19
	C	96.57
A2	BDMC	101.46
	DMC	97.11
	C	97.19
A3	BDMC	97.75
	DMC	95.06
	C	97.71
A4	BDMC	98.88
	DMC	95.80
	C	95.68
A5	BDMC	97.22
	DMC	96.84

	C	96.83
	BDMC	97.04
C1	DMC	96.73
	C	95.95
	BDMC	96.01
C2	DMC	97.66
	C	99.73

สรุปผลการศึกษา

การวิเคราะห์ปริมาณเคอร์คูมินอยด์โดยเทคนิค HPLC พบว่าให้ค่า LOD และ LOQ ที่ความเข้มข้น 0.10 mg/L ของ BMDC, 0.14 mg/L ของ DMC และ 0.15 mg/L ของ C ตามลำดับ และขีดต่ำสุดที่สามารถวิเคราะห์ปริมาณได้ที่มีความเข้มข้น 0.32 mg/L ของ BMDC, 0.49 mg/L ของ DMC และ 0.50 mg/L ของ C ตามลำดับ ดังนั้นเทคนิคทางโครมาโตกราฟีที่ได้พัฒนาขึ้นสำหรับวิเคราะห์หาปริมาณเคอร์คูมินอยด์สามารถวิเคราะห์หาปริมาณสารสำคัญได้อย่างถูกต้อง แม่นยำ และรวดเร็ว ซึ่งวิธีการนี้สามารถนำไปประยุกต์ใช้ตรวจสอบและวิเคราะห์หาปริมาณเคอร์คูมินอยด์ในผลิตภัณฑ์เครื่องสำอางและพืชสมุนไพรได้

เอกสารอ้างอิง

- กรมการแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข. 2542. การตรวจเอกลักษณ์พืชสมุนไพร ภาคพิเศษคณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่. โรงพิมพ์องค์การสงเคราะห์ทหารผ่านศึก, กรุงเทพฯ.
- กฤษณา ภูตะคาม และ วิริยา คณารักษ์. 2546. น้ำมันหอมระเหย.คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่. 25-26.
- กิตติพันธ์ ตันตระกูลโรจน์ และคณะ. 2529. เภสัชกรรมเทคโนโลยีและโครมาโตกราฟี. คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่. 301-326.
- นันทวัน บุญยะประภัสร และ อรุณ โชคชัยเจริญพร. 2539. สมุนไพร..ไม้พื้นบ้าน เล่ม 1: 366-399.
- นันทวัน บุญยะประภัสร และ อรุณ โชคชัยเจริญพร. 2544. สมุนไพร..ไม้พื้นบ้าน เล่ม 4: 315-349.

- มาตรฐานสมุนไพรไทย *ขั้นต้น*. 2544. สถาบันวิจัยสมุนไพร กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข. โรงพิมพ์ ร.ส.พ., กรุงเทพฯ. 28
- วิทย์ เทียงบุรณธรรม. 2531. *พจนานุกรม สมุนไพรไทย*. โอ.เอส.พรีนติ้ง เฮ้าส์., กรุงเทพฯ. 9091.
- Assu, R.B. and Mercadante A.Z. 2003. Carotenoids and ascorbic acid composition from commercial products of cashew apple (*Anacardium occidentale* L.). Journal of Food Composition and Analysis 16, 647–657.
- Bhavani Sankar T.N. and Murthy S., 1979. Effect of turmeric (*Curcuma longa*) fractions on the growth of some intestinal and pathogenic bacteria in vitro. Indian Journal of Experimental Biology. 17, 1363–1366.
- Chosdu R., Erizal I.T. and Hilmy N. 1995. The effect of gamma irradiation on curcumin component of *Curcuma domestica*. Radiation. Physics and Chemistry. 46, 663–667.
- Eigner, D. and Scholz, D. 1999. *Ferula asa-foetida* and *Curcuma longa*, in traditional medical treatment and diet in Nepal. Journal of Ethnopharmacology 67, 1–6.
- Portes, E., Gardrat, C., and Castellan, A., 2007. A comparative study on the antioxidant properties of tetrahydrocurcuminoids and curcuminoids. Tetrahedron 63 (37), 9092-9099.
- Govindarajan, V. S. 1980. Turmeric-chemistry, technology, and quality. Critical Reviews in Food Science and Nutrition 12, 199–301.
- Jae Kyung Kim, Cheorun Jo, Han Joon Hwang, Hyun Jin Park, Young Ji Kim and Myung Woo Byun, 2011. Color improvement by irradiation of *Curcuma* aromatic extract for industrial application. Radiation Physics and Chemistry 80 (4), 604-607.
- Jadhav, B.K., Mahadik, K.R., and Paradkar, A.R., 2007. Development and validation of improved reversed phase-HPLC method for simultaneous determination of curcumin, demethoxycurcumin, and bisdemethoxycurcumin, Chromatographia 65, 483–488.

- Jayaprakasha, G. K., Rao, L. J. M. and Sakariah, K. K. 2005. Chemical and biological activities of *C. longa*. Trends in Food Science and Technology 16, 533–548.
- Jin Hwan Lee and Myoung-Gun Choung. 2011. Determination of curcuminoids colouring principles in commercial foods by HPLC. Food Chemistry 124 (3), 1217-1222.
- Mara, E.M.B., Silvania, R.M.M. and Angela, A.M. 2006. Effects of supercritical fluid extraction on *Curcuma longa* L. and *Zingiber officinale* R. starches, Carbohydrate Polymers 63, 340–346.
- McGuffin, M., Hobbs C. and Upton, R. 1997. American Herbal Products Association's Botanical Safety Handbook. CRC Press. Boca Raton. 177-179
- Mei-Liang Chin-Chen, Samuel Carda-Broch, Devasish Bose and Josep Esteve-Romero, 2010. Direct injection and determination of the active principles of spices using micellar liquid chromatography. Food Chemistry 120(3), 915-920.
- Naczki M. and Shahidi F. 2004. Extraction and analysis of phenolic in food. Journal of Chromatography A 1054, 95–111.
- Navas Diaz A. and Ramos Peinado M. C. (1992). Fluorimetric determination of curcumin in yogurt and mustard. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 40, 56–59.
- Osawa T., Sugiyama Y., Inayoshi M. and Kawakishi S. 1995. Antioxidative activity of tetrahydro - curcuminoids. Bioscience Biotechnology and Biochemistry 59, 1609–1612.
- Paramasivam M., Poi R., Banerjee H. and Bandyopadhyay A. 2009. High-performance thin layer chromatographic method for quantitative determination of curcuminoids in *Curcuma longa* germplasm. Food Chemistry 113, 640–644.
- Pret-Almeida L., Cherubino A. P. F., Alves R. J., Dufoss L. and Glaria M. B. A. 2005. Separation and determination of the physico-chemical characteristics of curcumin,

- demethoxycurcumin and bisdemethoxycurcumin. *Food Research International* 38, 039–1044.
- Qin, N.Y., Yang, F.Q., Wang, Y.T., and Li, S.P. 2007. Quantitative determination of eight components in rhizome (*Jianghuang*) and tuberous root (*Yujin*) of *Curcuma longa* using pressurized liquid extraction and gas chromatography–mass spectrometry, *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 43, 486–492.
- Rui Li, Cheng Xiang, Min Ye, Hui-Fang Li, Xing Zhang and De-An Guo 2011. Qualitative and quantitative analysis of curcuminoids in herbal medicines derived from *Curcuma* species. *Food Chemistry* 126(4), 1890-1895.
- Schieffer G. W. 2002. Pressurized liquid extraction of curcuminoids and curcuminoid degradation products from turmeric (*C. Longa*) with subsequent HPLC assays. *Journal of Liquid chromatography and Related Technologies*, 25, 3033–3044.
- Veayudhan, K. C. Muralidharan, V. K. and Amalaraj, V. A. 1990. *Journal of economic and taxonomic botany*, 14: 579-582
- Xin Zhoua, Zhangwan Li, Guangyi Liang, Jin Zhuh, Daopin Wang and Zongwei Cai 2006. Analysis of volatile components of *Curcuma sichuanensis* X. X. Chen by gas chromatography–mass spectrometry. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 43(2), 440-444.
- Xiuhua Sun, Xiurong Yang and Erkang Wang, 2005. Chromatographic and electrophoretic procedures for analyzing plant pigments of pharmacologically interests. *Analytica ChimicaActa* 547(2), 153-157.
- Zhang, J.S., Guan, J., Yang, F.Q., Liu, H.G., Cheng, X.J. and Li, S.P. 2008 Qualitative and quantitative analysis of four species of *Curcuma* rhizomes using twice development thin layer chromatography, *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 48, 1024–1028.