



รายงานวิจัย

เทคนิคทางโครมาโทกราฟีในการควบคุมคุณภาพและการวิเคราะห์
สารเคอร์คูมินอยด์ในวัตถุดิบและผลิตภัณฑ์เครื่องสำอาง
จากพืชในสกุลเคอร์คูมา

วิษณุ ธงไชย

งานวิจัยนี้ได้รับทุนสนับสนุนจากมหาวิทยาลัยราชภัฏพิบูลสงคราม

พ.ศ. 2554

คำนำ

ในปัจจุบันนี้ ผู้บริโภคได้มีความสนใจในการเลือกใช้ ยา เครื่องสำอาง และผลิตภัณฑ์เสริมอาหารที่มีส่วนผสมสมุนไพรมากขึ้น ประเทศไทยมีสมุนไพรที่มีสรรพคุณทางยาหรือเครื่องสำอางอยู่หลายชนิดที่น่าจะมีการพัฒนาให้มีศักยภาพในการใช้ เพื่อลดการนำเข้ายา หรือเครื่องสำอางที่มีราคาแพง จึงควรหันมาใช้วัตถุดิบในประเทศให้มากขึ้น ทั้งนี้ยังเป็นการส่งเสริมและสนับสนุนให้เกษตรกรปลูกพืชสมุนไพรเพิ่มมากขึ้น และสามารถนำมาเพิ่มคุณค่า เมื่อนำเข้าสู่กระบวนการแปรรูปเป็นผลิตภัณฑ์การนำสมุนไพรไปใช้ประโยชน์ในปัจจุบัน เช่น พืชตระกูลขมิ้น ซึ่งได้มีการนำพืชตระกูลขมิ้นไปใช้ในการรักษาโรค แปรรูปเป็นผลิตภัณฑ์เครื่องสำอาง และมีนักวิจัยหลายท่านได้ทำการศึกษาพืชตระกูลขมิ้นกันอย่างแพร่หลายแต่ทำการศึกษาเพียงหนึ่งหรือสองชนิด

ดังนั้นผู้วิจัยจึงเล็งเห็นถึงความสำคัญในการหาวิธีทางวิทยาศาสตร์ที่เหมาะสมในการวิเคราะห์หาปริมาณสารและควบคุมคุณภาพในพืชพืชตระกูลขมิ้น เพื่อเป็นใช้เป็นแนวทางในการพัฒนาสมุนไพรไทยให้อยู่ในรูปแบบที่เหมาะสม สามารถนำไปพัฒนาต่อในเชิงพาณิชย์ต่อไปได้

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยฉบับนี้ สำเร็จลุล่วงได้ด้วยดีตามที่คาดหวังไว้ เนื่องจากได้รับความอนุเคราะห์จากบุคคลหลายฝ่าย ขอขอบคุณอาจารย์สาขาวิชาเคมีทุกท่านที่กรุณาให้คำปรึกษาและคำแนะนำต่าง ๆ จนโครงการวิจัยครั้งนี้เสร็จสมบูรณ์ ขอขอบคุณเจ้าหน้าที่ห้องปฏิบัติการและเจ้าหน้าที่เทคนิค ที่ให้ความอนุเคราะห์ด้านเครื่องมือ อุปกรณ์และสารเคมี สำหรับใช้ในการงานวิจัยและให้คำปรึกษาและขอบคุณเพื่อนๆที่ได้ให้ความช่วยเหลือและเป็นกำลังใจตลอดการทำวิจัย ผู้เขียนขอขอบพระคุณเป็นอย่างสูงไว้ ณ โอกาสนี้

วิษณุ ธงไชย

กุมภาพันธ์ 2554

ชื่อเรื่องงานวิจัย เทคนิคทางโครมาโทกราฟีในการควบคุมคุณภาพและการวิเคราะห์สารเคอร์คูมินอยด์ในวัตถุดิบและผลิตภัณฑ์เครื่องสำอางจากพืชในสกุลเคอร์คูมา

ผู้วิจัย ดร.วิษณุ ธงไชย

บทคัดย่อ

การพัฒนาวิธีวิเคราะห์ปริมาณเคอร์คูมินอยด์ด้วยเทคนิค RP-HPLC โดยใช้คอลัมน์ชนิด RP-C₁₈ เฟสเคลื่อนที่ประกอบด้วย acetonitrile กับ 2% acetic acid แบบระบบ gradient elution และอัตราการไหล 1 mL/min ตรวจวัดที่ความยาวคลื่น 425 นาโนเมตร พบว่าวิธีนี้มีความไว ความเฉพาะเจาะจง ความแม่นยำสูงและให้ค่าการตอบสนองของสัญญาณได้เป็นเส้นตรง สำหรับค่าขีดจำกัดต่ำสุดในการตรวจวัดเท่ากับ 0.09, 0.14 และ 0.15 mg/L ของ curcumin, demethoxycurcumin และ bis-demethoxycurcumin ตามลำดับ ขีดจำกัดต่ำสุดในการวิเคราะห์ปริมาณสำหรับ curcumin, demethoxycurcumin และ bis-demethoxycurcumin เท่ากับ 0.32, 0.49 และ 0.50 mg/L ตามลำดับ ช่วงของความเข้มข้นเป็นเส้นตรงมีค่าตั้งแต่ความเข้มข้น 5–200 mg/L มีค่าเฉลี่ยร้อยละของการกลับคืนของ curcumin, demethoxycurcumin และ bis-demethoxycurcumin 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

Title Chromatographic Techniques for Quality Control and Analysis of Curcuminoids in Raw Materials and Cosmetic Products from *Curcuma* spp.

Author Dr. Wisanu Thongchai

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 (60:40) and flow rate at 1 mL/min were investigated. The elution was measured at a wavelength of 425 nm. Validation method is sensitive, simultaneous determination selective, precise and reproducible 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 over the range of 5–200 mg/L. The mean 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 successful used for quantitation of curcuminoids from turmeric rhizome and pharmaceutical cosmetics.

สารบัญ

	หน้า
คำนำ	
กิตติกรรมประกาศ	ค
บทคัดย่อภาษาไทย	ง
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	จ
สารบัญ	ฉ
สารบัญตาราง	ช
สารบัญรูป	ฅ
สารบัญสัญลักษณ์	ญ
บทที่ 1 บทนำ	1
ที่มาและความสำคัญ	1
วัตถุประสงค์	2
ประโยชน์ที่จะได้รับในการศึกษา เชนทฤษฎีและ/หรือเชิงปฏิบัติ	2
ขอบเขตของการศึกษาวิจัย	2
บทที่ 2 ทฤษฎี เครื่องมือ และ งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	3
การสำรวจข้อมูลทางพฤกษศาสตร์	3
โครงสร้างของสารสำคัญ curcuminoids	5
สรรพคุณและฤทธิ์ทางเภสัชวิทยา	5
การแยกสารสำคัญจากพืช	7
การแยกและการตรวจสอบโดยวิธีทางโครมาโตกราฟี	9
การตรวจเอกลักษณ์ของพืช	15
บทที่ 3 วิธีการทดลอง	17
การเตรียมพืชตัวอย่าง	18
การหาความยาวคลื่นของการดูดกลืนแสงสูงสุดด้วยเทคนิคทาง	19
ยูวี-วิสิเบิลสเปกโทรโฟโตเมตรี สำหรับวิเคราะห์หาปริมาณเคอร์คูมินอยด์	
วิเคราะห์หาองค์ประกอบที่สำคัญจากสารสกัดจากขมิ้น โดยเทคนิค HPLC	19
การวิเคราะห์หาองค์ประกอบที่สำคัญจากสารสกัดจากขมิ้น โดยเทคนิค TLC	20

สารบัญ (ต่อ)

	หน้า
บทที่ 4 ผลการวิจัย	21
การศึกษาการเตรียมพืชตัวอย่าง	21
การสกัดสารสำคัญจากพืชตัวอย่างด้วยทำละลายที่เหมาะสมโดยวิธี soxhlet extraction	23
การวิเคราะห์ความยาวคลื่นของการดูดกลืนแสงสูงสุดด้วยเทคนิค ยูวี-วิสิเบิลสเปกโทรโฟโตเมตรี	24
การวิเคราะห์โดยวิธีโครมาโตกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง (HPLC)	25
- ผลการศึกษาองค์ประกอบของเฟสเคลื่อนที่ที่เหมาะสม	25
- ผลการศึกษาชนิดของคอลัมน์ (column)	28
- ผลการศึกษาอัตราการไหล (flow rate) ที่เหมาะสม	30
- ผลการวิเคราะห์โดยวิธีโครมาโตกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง	32
- ผลการศึกษาความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์	33
- ผลการศึกษาขีดจำกัดต่ำสุดของการตรวจวัด (limit of detection)	33
- ผลการศึกษาขีดจำกัดของการวิเคราะห์ปริมาณ (limit of quantitation)	34
- ผลการศึกษาช่วงความเป็นเส้นตรง (linearity)	34
- ผลการศึกษาช่วงความเป็นเส้นตรง (range)	36
- ผลการศึกษาความแม่นยำ (precision)	38
- ผลการศึกษาความถูกต้อง (accuracy)	39
การวิเคราะห์องค์ประกอบที่สำคัญของสารสกัดจากขมิ้น โดยเทคนิค TLC	42
บทที่ 5 สรุปผลการทดลอง วิจารณ์ และข้อเสนอแนะ	44

สารบัญตาราง

	หน้า
ตารางที่ 1 แสดงตัวอย่างพืชขมิ้นจากแหล่งต่างๆ และรหัสที่ตั้งขึ้น	21
ตารางที่ 2 แสดงขั้นตอนของการสกัดโดยวิธี Soxhlet extraction	23
ตารางที่ 3 การหาค่า % yield	23
ตารางที่ 4 แสดงสัดส่วนวัฏภาคเคลื่อนที่	27
ตารางที่ 5 แสดงชนิดของสารมาตรฐานเคอคูมินอยด์ ค่า area และ retention time	33
ตารางที่ 6 แสดงความสัมพันธ์ระหว่างพื้นที่ใต้พีคกับความเข้มข้นของ bisdemethoxycurcumin, demethoxycurcumin, curcumin วันที่ 1	34
ตารางที่ 7 แสดงความสัมพันธ์ระหว่างพื้นที่ใต้พีคกับความเข้มข้นของ bisdemethoxycurcumin, demethoxycurcumin, curcumin วันที่ 2	35
ตารางที่ 8 ผลการศึกษา ของ standard curve ที่ได้จากการทดลองทั้ง 2 วัน	36
ตารางที่ 9 ความสัมพันธ์ระหว่างพื้นที่ใต้พีคกับความเข้มข้นของ bisdemethoxycurcumin, demethoxycurcumin และ curcumin	36
ตารางที่ 10 การศึกษาความแม่นยำของวิธีวิเคราะห์โดยศึกษา repeatability คำนวณหาค่า %RSD	38
ตารางที่ 11 แสดงค่า % recovery ของการศึกษา accuracy ของตัวอย่างพืช	39
ตารางที่ 12 แสดงค่า % recovery ของการศึกษา accuracy ของตัวอย่างครีมบำรุงผิว	40
ตารางที่ 13 แสดงค่าการวิเคราะห์หาปริมาณเคอคูมินอยด์ของสารสกัดจากขมิ้นชนิดต่างๆ และเครื่องสำอางที่มีส่วนผสมของขมิ้นด้วยเทคนิค HPLC ที่พัฒนาขึ้น	41
ตารางที่ 14 แสดงค่า R_f ของสารละลายมาตรฐานเคอคูมินอยด์ที่ความเข้มข้น 20 mg/L บนแผ่น TLC	43
ตารางที่ 15 แสดงค่า R_f ขององค์ประกอบของสารสกัดพืชในตระกูลขมิ้นและครีมบนแผ่น TLC	43

สารบัญรูป

	หน้า
รูปที่ 1 แสดงลักษณะและชนิดของพืชทั้ง 5 ตัวอย่าง	22
รูปที่ 2 แสดงลักษณะสารสกัดของพืชทั้ง 5 ตัวอย่างที่บรรจุในขวดเก็บสาร	24
รูปที่ 3 แสดงลักษณะพืชและสัญญาณของสารละลายมาตรฐานเคอคูมินอยด์ที่ความเข้มข้น 20 mg/L	24
รูปที่ 4 แสดงลักษณะโครมาโตแกรมของระบบ isocratic elution ของวัฏภาคเคลื่อนที่ผสมระหว่าง propanol กับ sodium dodecyl sulfate (SDS) pH 7 ที่อัตราส่วน 5:95 v/v	25
รูปที่ 5 แสดงลักษณะโครมาโตแกรมของระบบ isocratic elution ของวัฏภาคเคลื่อนที่ผสมระหว่าง water กับ 70% methanol ที่อัตราส่วน 5:95 v/v	26
รูปที่ 6 แสดงลักษณะโครมาโตแกรมของระบบ isocratic elution ของวัฏภาคเคลื่อนที่ผสมระหว่าง water กับ acetonitrile ที่อัตราส่วน 5:95 v/v	27
รูปที่ 7 แสดงลักษณะโครมาโตแกรมของระบบ gradient elution ของวัฏภาคเคลื่อนที่ผสมระหว่าง 2% acetic acid กับ acetonitrile	28
รูปที่ 8 แสดงลักษณะโครมาโตแกรมแสดงลักษณะโครมาโตแกรมที่แยกสารมาตรฐานเคอคูมินอยด์ด้วยคอลัมน์ชนิดต่างๆ	30
รูปที่ 9 ลักษณะโครมาโตแกรมที่แยกสารมาตรฐานเคอคูมินอยด์ด้วยอัตราการไหล (ก) 0.5 mL/min, (ข) 1.0 mL/min และ (ค) 1.5 mL/min	31
รูปที่ 10 แสดงลักษณะโครมาโตแกรมกราฟมาตรฐานเคอคูมินอยด์ ที่ความเข้มข้น 20 mg/L	32
รูปที่ 11 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างพื้นที่ใต้พีคกับความเข้มข้นของ bisdemethoxycurcumin, demethoxycurcumin, curcumin วันที่ 1	35
รูปที่ 12 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างพื้นที่ใต้พีคกับความเข้มข้นของ bisdemethoxycurcumin, demethoxycurcumin, curcumin วันที่ 2	36
รูปที่ 13 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างพื้นที่ใต้พีคกับความเข้มข้นของ bisdemethoxycurcumin, demethoxycurcumin และ curcumin	38
รูปที่ 14 แสดง TLC chromatogram โดยใช้ระบบตัวทำละลายเป็น benzene: chloroform: ethanol (49:49:2) ตรวจสอบที่ความยาวคลื่น 365 nm	42

อักษรย่อและสัญลักษณ์

สัญลักษณ์	ความหมาย
BDMC	Bisdemethoxycurcumin
DMC	Demethoxycurcumin
C	Curcumin
°C	องศาเซลเซียส
%	เปอร์เซ็นต์
mg/L	ไมโครกรัมต่อลิตร
nm	นาโนเมตร
mm	มิลลิเมตร
µg/mL	ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร
SD	ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน
s	ค่าความชัน
Conc.	ความเข้มข้น

บทที่ 1

บทนำ

1.1 ที่มาและความสำคัญ

ในปัจจุบันนี้ประชาชนส่วนใหญ่ได้มีความสนใจในการเลือกใช้อาหาร เครื่องสำอาง และผลิตภัณฑ์เสริมอาหารที่มีส่วนประกอบของสมุนไพรมากขึ้น ในประเทศไทยมีสมุนไพรที่มีสรรพคุณทางยาหรือเครื่องสำอางอยู่หลายชนิดที่น่าจะมีการพัฒนาให้มีประสิทธิภาพในการใช้ เพื่อลดการนำเข้ายา หรือเครื่องสำอางที่มีราคาแพง การหันมาใช้วัตถุดิบ เพื่อนำมาทำเป็นผลิตภัณฑ์ที่มีอยู่ในประเทศให้มากขึ้น จึงเป็นการส่งเสริมและสนับสนุนให้มีการปลูกสมุนไพรมากขึ้น และสามารถนำไปเพิ่มคุณค่า เมื่อนำเข้าสู่กระบวนการแปรรูปเป็นผลิตภัณฑ์ การศึกษาวิจัยนี้เป็นการพัฒนาและปรับปรุงวิธีในการหาปริมาณเคอร์คูมินอยด์ (curcuminoids) จากเหง้าขมิ้น และสามารถเป็นแนวทางในการพัฒนาสมุนไพรไทยให้อยู่ในรูปแบบที่เหมาะสม สามารถนำไปพัฒนาต่อในเชิงพาณิชย์ต่อไปได้⁽¹⁾

พืชสมุนไพรที่อยู่ในวงศ์ Zingiberaceae มีอยู่หลายชนิด เช่น ขมิ้นชัน (*Curcuma longa* Linn.) ขมิ้นอ้อย (*Curcuma zedoaria* Roscoe.) ขมิ้นดำหรือขมิ้นมหาเมฆ (*Curcuma aeruginosa* Roxb.) เป็นพืชสมุนไพรพื้นบ้านที่หาได้ง่าย ปลูกง่าย ราคาไม่แพงและมีความปลอดภัยสูง และสรรพคุณหลากหลาย⁽²⁾ บางชนิดมีสรรพคุณทางเครื่องสำอาง โดยจะใช้ส่วนเหง้าทำเป็นยาพอก เพื่อรักษาผื่น สามารถช่วยในการรักษาสิว และทำให้ผิวขาวขึ้นอีกด้วย⁽³⁾ และบางชนิดมีสรรพคุณทางยา เช่น แก้อาการฟกช้ำ แก้ผดผื่นคัน แก้ท้องอืดเพื่อ รักษากระเพาะ⁽⁴⁾ ทำให้เม็ดลูกเข้าอยู่เร็วขึ้น ทำให้ประจำเดือนมาตามปกติ ปัจจุบันได้มีการนำสมุนไพรเหล่านี้มาใช้ในตำรับสมุนไพรบ้าง ในรูปของผงสมุนไพรและสารสกัด อย่างไรก็ตามการนำสมุนไพรมาเพิ่มคุณค่าให้เป็นผลิตภัณฑ์ยาเสริมอาหาร หรือเครื่องสำอาง จำเป็นต้องมีการควบคุมคุณภาพของสมุนไพร ตั้งแต่การนำชนิดที่ถูกต้องมาใช้ และการควบคุมให้มีปริมาณสารสำคัญที่คงที่ เพื่อทำการพัฒนาให้มีความเหมาะสมสำหรับการนำไปใช้ต่อไป⁽⁵⁾

1.2 วัตถุประสงค์

1.2.1 เพื่อแยกสารสำคัญจากเคอร์คูมินอยด์ในพืชสมุนไพรที่อยู่ในวงศ์ Zingiberaceae

1.2.2 เพื่อวิเคราะห์ปริมาณเคอร์คูมินอยด์ในพืชสมุนไพรที่อยู่ในวงศ์ Zingiberaceae

1.3 ประโยชน์ที่จะได้รับในการศึกษา เชิงทฤษฎีและ/หรือเชิงปฏิบัติ

- 1.3.1 เพื่อพัฒนาวิธีวิเคราะห์หาปริมาณเคอร์คูมินอยด์ในพืชสมุนไพรที่อยู่ในวงศ์ Zingiberaceae ได้
- 1.3.2 เพื่อวิเคราะห์หาปริมาณเคอร์คูมินอยด์จากตัวอย่างเครื่องสำอางที่มีส่วนผสมของเคอร์คูมินอยด์ได้
- 1.3.3 เป็นข้อมูลแก่ประชาชน และภาคธุรกิจที่ต้องการนำวิธีการวิเคราะห์หาปริมาณเคอร์คูมินอยด์ไปใช้ในการควบคุมคุณภาพผลิตภัณฑ์ได้

1.4 ขอบเขตของการศึกษาวิจัย

- 1.4.1 ค้นคว้าและศึกษาเอกสารที่เกี่ยวข้อง ในการเตรียมตัวอย่างและการวิเคราะห์ด้วยเทคนิค HPLC ที่พัฒนาขึ้น
- 1.4.2 ทำการศึกษาทดลองหาสภาวะที่เหมาะสมในการวิเคราะห์ด้วยเทคนิค HPLC ที่พัฒนาขึ้น
- 1.4.3 ทำการวิเคราะห์หาปริมาณเคอร์คูมินอยด์ในตัวอย่างพืชสมุนไพรและเครื่องสำอางที่มีส่วนผสมของเคอร์คูมินอยด์ ด้วยเทคนิค HPLC ที่พัฒนาขึ้น

บทที่ 2

ทฤษฎี เครื่องมือ และ งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.1 การสำรวจข้อมูลทางพฤกษศาสตร์

พืชตระกูลขมิ้นมีการนำไปใช้ประโยชน์และปลูกมากในเขตภาคเหนือของประเทศไทยมีอยู่หลายชนิด เช่น ขมิ้นชัน ขมิ้นอ้อย ขมิ้นดำหรือว่านมหาเมฆ เป็นต้น โดยจะกล่าวถึงข้อมูลสรรพคุณและสารสำคัญของพืช 3 ชนิด โดยสรุป ดังนี้

ขมิ้นชัน นอกจากจะเรียกสั้น ๆ ว่าขมิ้นแล้ว ยังมีชื่อท้องถิ่นอื่น ๆ เช่น ขมิ้นแกง ขมิ้นหยวก ขี้มิ้น ตายอและสะยอ มีชื่อภาษาอังกฤษคือ Turmeric มีชื่อวิทยาศาสตร์ว่า *Curcuma longa* Linn. เป็นพืชตระกูล Zingiberaceae ซึ่งเป็นตระกูลเดียวกับขิง ลักษณะของขมิ้นชันเป็นพืชล้มลุก มีเหง้าอยู่ใต้ดิน เนื้อในของเหง้ามีสีเหลืองเข้ม จนถึงสีแสดเข้ม มีกลิ่นหอมเฉพาะ ใบเป็นใบเดี่ยว ก้านยาว ใบเหนียว เรียวและปลายแหลมดอกเป็นช่อมีก้านช่อแทงจากเหง้าโดยตรง ดอกย่อยสีเหลืองอ่อน มีกลีบประดับสีเขียวอมชมพู ผลรูปกลมมี 3 พู สรรพคุณในยาไทย ส่วนที่ใช้เป็นยาคือเหง้า มีรสฝาด กลิ่นหอม ใช้แก้โรคผิวหนัง ผื่นคัน ขับลม แก้ท้องร่วง เหง้าขมิ้นชันใช้รักษาฝี แผลพุพอง โดยนำเอาเหง้าขมิ้นชันฝนกับน้ำสุกทาบริเวณที่เป็น หรือใช้ผงขมิ้นชันโรยทาบริเวณที่มีอาการผื่นคันจากแมลง กัดต่อย ส่วนการรักษาอาการท้องอืด ท้องเฟ้อและแน่นจุกเสียดนั้นให้นำเอาขมิ้นชันสดล้างให้สะอาด หั่นเป็นชิ้นบาง ๆ ตากแดดจัด สัก 1-2 วัน บดละเอียดผสมกับน้ำผึ้งปั้นเป็นยาเม็ดลูกกลอนขนาดเท่าปลายนิ้วก้อย ฝึงลมให้แห้งและเก็บในขวดสะอาดปิดฝาปิดสนิท รับประทานครั้งละ 2-3 เม็ด วันละ 4 ครั้ง หลังอาหารและก่อนนอน เหง้าขมิ้นชันมีสารประกอบสำคัญ เป็นน้ำมันหอมระเหย มีสารหลายชนิด คือ tumerone, zingiberene, borneol เป็นต้น⁽¹⁾ และในเหง้ายังมีสารสีเหลืองส้มที่ทำให้ขมิ้นมีสีที่เรียกว่าสารกลุ่ม curcuminoids ซึ่งมีโครงสร้างเป็น diferuloylmethane และประกอบด้วยสารหลัก 3 ตัวคือ curcumin, demethoxycurcumin และ bisdemethoxycurcumin⁽⁵⁾

ขมิ้นอ้อย มีชื่อวิทยาศาสตร์คือ *Curcuma zedoaria* Roscoe. ขมิ้นอ้อยมีลักษณะโดยทั่วไปคล้ายขมิ้นชันมาก แต่ต้นสูงกว่า ขนาดเหง้าและใบใหญ่กว่าเหง้ามักโผล่ขึ้นมาเหนือดินเล็กน้อยและมีเนื้อในสีเหลือง กลีบดอกสีนวล ใบประดับที่อยู่ส่วนล่างของ ช่อมีสีเขียวปลายแฉกชมพู ที่อยู่ส่วนบนรูปใบหอก สีแดงเข้ม สรรพคุณ ของขมิ้นอ้อยหรือว่านเหลือง (คนจีนทบู้จะเรียกว่าว่านเหลือง) ส่วนหน่อ

อ่อนๆ ที่เพิ่งแตกหน่อออกมานั้น นำมาทำความสะอาดแล้วนำมาต้มจมน้ำพริก จะช่วยลดอาการท้องร่วงได้เช่นกัน^(5,7 8)

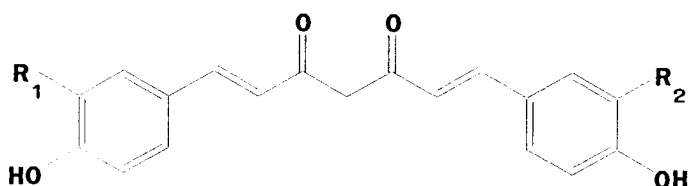
ขมิ้นดำหรือว่านมหาเมฆ มีชื่อวิทยาศาสตร์คือ *Curcuma aeruginosa* Roxb. ลักษณะโดยทั่วไป ลำต้นเป็นพืชตระกูลเดียวกับขิง-ข่า มีหัวหรือเหง้าอยู่ใต้ดิน หัวมีกลิ่นคล้ายขิง-ข่า ใบรูปหอก ใบจะโผล่ขึ้นมาในช่วงฤดูฝนหลังจากที่ดอกเริ่มเหี่ยวเฉา และใบจะเริ่มเหี่ยวเฉาช่วงต้นฤดูหนาว จะออกดอกระหว่างเดือนเมษายน-พฤษภาคม ออกเป็นช่อจากใจกลางต้น ช่อดอกสูง 12-18 เซนติเมตร ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับอายุของต้น ถ้าอายุมากเหง้าจะมีขนาดใหญ่ช่อดอกก็จะใหญ่ตามไปด้วย ดอกมีใบประดับรูปกรวยเรียงซ้อนกัน ปลายช่อดอกมีสีชมพูถึงแดงเข้ม โคนช่อดอกมีสีเขียวอ่อนถึงเขียว อีกทั้งยังมีดอกเป็นหลอดรูปกรวยขนาดเล็กสีเหลืองบริเวณใบประดับโคนช่อดอก โดยส่วนใหญ่สามารถพบตามป่าเบญจพรรณ ทุ่งหญ้า ชอบดินร่วนปนทราย พบทั่วทุกภาค แต่หาได้ง่ายและสวยงามมาก คือ อุทยานแห่งชาติภูกระดึง ส่วนที่นำมาใช้เป็นยาใช้เหง้า เป็นยาขับมดลูก ทำให้มดลูกเข้าสู่เร็วขึ้น มดลูกคลายความอึดเสป เป็นยาถ่าย⁽⁶⁾

2.2 ความแตกต่างที่สำคัญทางพฤกษศาสตร์ของพืชสกุล *Curcuma*

ชื่อ	ลักษณะทางพฤกษศาสตร์
ขมิ้นชัน (<i>Curcuma longa</i> Linn.)	ดอก: ดอกช่อแทงออกจากเหง้า แทรกขึ้นมาระหว่างก้านใบ รูปทรงกระบอก กลีบดอก สีเหลืองอ่อน ใบประดับสีเขียวอ่อน หรือสีนวล บานครั้งละ 3-4 ดอก ผล รูปกลมมี 3 พู ใบ: ใบเดี่ยว แทงออกมาเหง้าเรียงเป็นวงซ้อนทับกันรูปใบหอก กว้าง 12-15 ซม. ยาว 30-40 ซม. เหง้า: เหง้าใต้ดินรูปไข่มีแขนงรูปทรงกระบอกแตกออกด้านข้าง 2 ด้านตรงกันข้ามเนื้อในเหง้าสีเหลืองส้ม มีกลิ่นเฉพาะ
ขมิ้นน้อย (<i>Curcumazedoaria</i> Roscoe.)	ดอก: ดอกออกเป็นช่อ ก้านช่อดอกยาว 5-8 ซม. ใบประดับสีเขียวอ่อนๆ หรือสีขาว รูปหอกเรียงซ้อนกัน ใบประดับ 1 ใบมี 2 ดอก ใบ: ใบประดับย่อยรูปขอบขนานยาว 3-3.5 ซม. ด้านนอกมีขน เหง้า: เหง้าใต้ดิน เนื้อในสีเหลืองอมส้ม มีกลิ่นหอม ใบออกเป็นรัศมี ติดผิวดิน รูปหอกแกมขอบขนาน กว้าง 8-10 ซม. ยาว 30-40 ซม. ก้านใบยาว 8-15 ซม.

ขมิ้นดำ (<i>Curcuma aeruginosa</i> Roxb.)	ดอก: จะออกดอกระหว่างเดือนเมษายน – พฤษภาคม ออกเป็นช่อ จากใจกลางต้น ช่อดอกสูง 12–18 ซม. ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับอายุของ ต้น ใบ: ใบรูปหอก ใบจะโผล่ขึ้นมาในช่วงฤดูฝนหลังจากที่ดอกเริ่ม เหี่ยวเฉา และใบจะเริ่มเหี่ยวเฉาช่วงต้นฤดูหนาว เหง้า: มีหัวหรือเหง้าอยู่ใต้ดิน หัวมีกลิ่นคล้ายขิง-ข่า
---	--

2.3 โครงสร้างของสาระสำคัญของเคอร์คูมินอยด์



สารสำคัญ	R ₁	R ₂	mol%
Bisdimethoxycurcumin (BDMC)	H	H	10.5
Demethoxycurcumin (DMC)	H	OCH ₃	16.1
Curcumin (C)	OCH ₃	OCH ₃	73.4

สรรพคุณ

เหง้าของขมิ้นมีรสฝาด กลิ่นหอม สามารถเก็บมาใช้เมื่อมีช่วงอายุ 9–10 เดือน มีฤทธิ์ในการฆ่าเชื้อ แบคทีเรีย เชื้อรา ลดการอักเสบ และมีฤทธิ์ในการขับน้ำดี น้ำมันหอมระเหย ในขมิ้นชันมีสรรพคุณบรรเทา อาการปวดท้อง ท้องอืด แน่นจุดเสียด แก้โรคผิวหนัง ขับลม แก้ผื่นคัน แก้ท้องร่วง ใช้ขัดผิวพอกหน้าอีกด้วย โดยมีประวัติสรรพคุณทางยายาวนานกว่า 5,000 ปี เริ่มต้นที่สรรพคุณในการรักษาแผล แก้พิษในเลือดและโรคกระเพาะ ในตำรายาอายุรเวชของอินเดีย (India's Ayurvedic system of medicine) ชาวอินเดียใช้รักษาอาการ เคล็ด ขัด ยอก และบวม ชาวจีนนำขมิ้นมารักษาอาการปวดท้อง ขมิ้น และสารประกอบ curcumin ในขมิ้นรวมๆ แล้ว เรียกว่า เคอร์คูมินอยด์ มีคุณสมบัติเป็นสารแอนติออกซิแดนท์ (antioxidant) สารต่อต้านการอักเสบ ต่อต้านไวรัสและแบคทีเรีย ซึ่งสามารถทำงานต่อต้านโรคมะเร็ง โรคเบาหวาน โรคข้ออักเสบ โรคเรื้อรังต่างๆ และที่สำคัญโรคอัลไซเมอร์ จึงทำให้ขมิ้นโดดเด่นในวิจัย

ผลการศึกษาฤทธิ์ทางเภสัชวิทยา

การศึกษาในสัตว์ทดลองหรือในหลอดทดลองพบว่าสารสกัดหรือสารสำคัญของขมิ้นชันมีฤทธิ์ทางยาที่สำคัญพอสรุปได้ดังนี้

1. ฤทธิ์ขับน้ำดี กระตุ้นการขับน้ำดีทำให้การย่อยอาหารดีขึ้นช่วยบรรเทาอาการจุกเสียด
2. ฤทธิ์ลดการบีบตัวของลำไส้
3. ฤทธิ์ต้านการเกิดแผลในกระเพาะอาหาร
4. ฤทธิ์ลดการอักเสบ
5. ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารกลุ่มเคอร์คูมินอยด์
6. ฤทธิ์ต้านการก่อกลายพันธุ์และต้านการเกิดมะเร็งจากการได้รับสารก่อมะเร็งที่กระตุ้นให้เกิดมะเร็งในอวัยวะต่าง ๆ
7. ฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรีย
8. ฤทธิ์ต้านเชื้อราที่เป็นสาเหตุของโรคกลาก

ประสิทธิผลในการรักษาโรคจากรายงานวิจัยทางคลินิก

1. บรรเทาอาการแน่นจุกเสียดและโรคแผลในกระเพาะอาหาร
 - เมื่อผู้ป่วยที่มีอาการท้องอืด ท้องเฟ้อ รับประทานขมิ้นผงปริมาณ 500 มิลลิกรัม วันละ 4 ครั้ง เป็นเวลา 7 วัน พบว่าจำนวนผู้ป่วยมีอาการดีขึ้นหรือหายเท่ากับ 87 % ในกลุ่มขมิ้นชัน และ 83 % ในกลุ่มที่ได้รับยาขับลม
 - จากการทดลองให้ขมิ้นชัน 600 มิลลิกรัม วันละ 5 ครั้งในผู้ป่วย 25 รายที่มีแผลในทางเดินอาหารพบว่า 12 ราย (48%) แผลหายใน 4 สัปดาห์ และ 18 ราย (76%) แผลหายใน 12 สัปดาห์
2. ใช้รักษาแผล จากการทดลองใช้ขมิ้นชันลดการอักเสบของแผลภายหลังผ่าตัดพบว่าได้ผลใกล้เคียงกับยาเฟนนิลปิวดาโซน
3. ลดอาการอักเสบ ทดลองให้ผู้ป่วยที่เป็นโรคข้ออักเสบรูมาตอยด์รับประทานเคอร์คูมิน 1,200 มิลลิกรัม/วัน เป็นเวลา 5-6 สัปดาห์ พบว่า อาการขัดตึงตามข้อตอนเช้าลดลง เดินได้นานขึ้น และการบวมตามข้อลดลง
4. ฤทธิ์ oxidative stress ในผู้ป่วยธาลัสซีเมีย เมื่อให้เคอร์คูมิน 500 มิลลิกรัม/วัน ติดต่อกัน 3 เดือน
5. ฤทธิ์ป้องกันยุง โลชั่นผสมน้ำขมิ้นชัน 2.5 % ป้องกันการกัดของยุงลายบ้านได้นาน 7 ชั่วโมง และป้องกันการกัดของยุงลายสวน ยุงก้นปล่อง และยุงรำคาญ ได้นาน 8 ชั่วโมง
6. ฤทธิ์รักษาสิว ผงขมิ้นชันทาหัวสิว ทำให้สิวยุบและหายเร็ว

ข้อห้ามใช้

ห้ามใช้ในผู้ป่วยเป็นนิวในถุงน้ำดีมีการอุดตันของท่อน้ำดีหรือผู้ที่แพ้มันชัน (hypersensitivity)

ข้อควรระวัง

ผู้ป่วยที่เป็นนิวในถุงน้ำดี สตรีมีครรภ์ หรือสตรีที่ให้นมบุตรหากจะใช้มันชันต้องอยู่ในความดูแลของแพทย์นอกจากนี้ต้องระวังการใช้ในเด็กเนื่องจากยังไม่มีข้อมูลด้านประสิทธิผลและความปลอดภัย

อาการข้างเคียง

มีรายงานว่ามันชันอาจทำให้เกิดการแพ้ของผิวหนังได้ (allergic dermatitis)

2.4 การแยกสารสำคัญออกจากพืช⁽⁹⁻¹⁵⁾

2.4.1 การสกัด (extraction) ด้วยตัวทำละลาย

เป็นวิธีการแยกสารโดยอาศัยสมบัติการละลายของสารในตัวทำละลาย โดยการใช้ตัวทำละลายที่เหมาะสมในการสกัดสารที่ต้องการออกจากของผสม หลักการเลือกตัวทำละลายให้เหมาะสมกับสารที่ต้องการแยก

1. ตัวทำละลายสามารถละลายสารที่ต้องการสกัดได้
2. ตัวทำละลายจะต้องไม่ละลายสารอื่นๆที่เราไม่ต้องการสกัด
3. ตัวทำละลายจะต้องไม่ทำปฏิกิริยากับสารที่เราต้องการสกัด
4. ตัวทำละลายสามารถแยกออกจากสารที่เราต้องการสกัดได้ง่าย
5. ตัวทำละลายไม่เป็นพิษ และมีราคาถูก

2.4.2 วิธีการสกัดและแยกน้ำมันหอมระเหย

การสกัดหรือแยกน้ำมันหอมระเหยออกจากพืชนั้น ได้เริ่มทำกันมานานตั้งแต่สมัยโบราณ เริ่มจากมนุษย์นำพรรณไม้หอมและดอกไม้ที่มีกลิ่นหอม ไปแช่น้ำแล้วนำไปต้ม นำไปอาบ ต่อมาได้มีการพัฒนา โดยการนำไปต้ม กลั่นด้วยไอน้ำ การใช้ไขมันดูดซับ การสกัดด้วยตัวทำละลายอินทรีย์ ซึ่งแต่ละวิธีมีจุดประสงค์ก็เพื่อที่จะสกัดเอาน้ำมันหอมระเหยและกลิ่นหอมออกมาให้มากที่สุด และมีคุณภาพดีที่สุด การที่จะสกัดน้ำมันหอมให้ได้ประสิทธิภาพสูงสุดนั้นจำเป็นต้องศึกษาธรรมชาติและสรีระของพรรณไม้ชนิดนั้นๆ ต้นไม้บางชนิดมีสรีระไม่เหมือนกัน บางชนิดเมื่อเด็ดดอกออกจากต้นแล้วกลิ่นจะลดลง เช่น กุหลาบ ฯลฯ การที่จะใช้วิธีการสกัดและแยกน้ำมันหอมระเหย จึงต้องพิจารณาให้รอบคอบ เนื่องจากน้ำมันหอมระเหยประกอบด้วยสารประกอบหลายตัวทั้งที่เป็นของแข็งและของเหลว การแยกน้ำมันหอมระเหยออกมาจากพืชที่นิยมได้แก่

1. การกลั่น (distillation)
2. การสกัดด้วยไขมันเย็น (enfleurage)
3. การสกัดด้วยไขมันร้อน (maceration)
4. การสกัดด้วยตัวทำละลายง่าย (solvent extraction)
5. การบีบอัด (cold press method)
6. การสกัดด้วยคาร์บอนไดออกไซด์ที่สภาวะเหนือจุดวิกฤติ (supercritical carbon dioxide extraction)

การกลั่น (distillation) หลักการของการกลั่น คือ น้ำร้อนหรือไอน้ำเข้าไปแยกน้ำมันหอมระเหยออกมาจากพืช โดยการแทรกซึมเข้าไปในเนื้อเยื่อพืช ความร้อนจะทำให้สารละลายออกมากลายเป็นไอปนมากับน้ำร้อนหรือไอน้ำนั้น อย่างไรก็ตาม การกลั่นเพื่อให้ได้น้ำมันหอมระเหยที่มีคุณภาพดีนั้น ต้องอาศัยเทคนิคขบวนการทางเคมีและกายภาพหลายอย่างประกอบกัน โดยทั่วไป เทคนิคการกลั่นน้ำมันหอมระเหยที่ใช้กันมีอยู่ 3 วิธีได้แก่

ก. การกลั่นด้วยน้ำร้อน (water distillation & hydro-distillation) เป็นวิธีการที่ง่ายที่สุดของการกลั่นน้ำมันหอมระเหย การกลั่นโดยวิธีนี้พืชที่กลั่นต้องแช่อยู่ในน้ำเดือดทั้งหมด พืชบางชนิดเบาอาจจะลอยก็ได้ แล้วแต่ความถ่วงจำเพาะของพืชนั้น การให้ความร้อนกับน้ำอาจให้ไปโดยรอบ หรือให้ท่อไอน้ำผ่าน การกลั่นน้ำมันหอมระเหยนี้ ใช้กับของที่ติดกันง่าย ๆ เช่น ใบไม้บาง ๆ กลีบดอกไม้อ่อน ๆ ข้อควรระวังในการกลั่นโดยวิธีนี้คือ พืชจะได้รับความร้อนไม่สม่ำเสมอ ตรงกลางมักจะได้รับความร้อนมากกว่าด้านข้าง ซึ่งจะมีปัญหาในการไหม้ของตัวอย่าง กลิ่นไหม้จะปนมากับน้ำมันหอมระเหย และมีสารไม่พึงประสงค์ติดมาในน้ำมันหอมระเหยได้ วิธีแก้ไขคือ ใช้ไอน้ำร้อนหรือcoilจุ่มในหม้อต้ม แต่การใช้coil นี้ ไม่เหมาะสมกับดอกไม้บางชนิด เช่น กุหลาบ จะกลั่นโดยใช้ steam coil ไม่ได้ เพราะเมื่อกลิบกุหลาบถูก steam coil จะหดตัว กลายเป็น glutinous mass จึงต้องใช้วิธีใส่ลงไปใต้น้ำ กลีบกุหลาบจะสามารถหมุนเวียนไปอย่างอิสระ ในการกลั่นเปลือกไม้ ก็เช่นกัน ควรใช้วิธีกลั่นด้วยน้ำ น้ำจะซึมเข้าไปและนำกลิ่นออกมา หรือกลิ่นจะแพร่กระจายออกจากเปลือกไม้ได้ง่ายขึ้น ดังนั้น การเลือกใช้วิธีการกลั่นจึงขึ้นกับชนิดของพืชที่นำมากลั่นด้วย

ข. การกลั่นด้วยน้ำ และไอน้ำ (water and steam distillation) การกลั่นโดยวิธีนี้ใช้ตะแกรงรองพืชที่จะกลั่น ให้อยู่เหนือระดับน้ำในหม้อกลั่น ต้มให้เดือด ไอน้ำจะลอยตัวขึ้นไปผ่านพืชหรือตัวอย่างที่จะกลั่น ส่วนน้ำจะไม่ถูกกับตัวอย่างเลย ไอน้ำจากน้ำเดือดเป็นไอน้ำที่อิ่มตัว หรือที่เรียกว่า ไอเปียก ไม่ร้อนจัด เป็นการกลั่นที่สะดวกที่สุด คุณภาพของน้ำมันออกมาดีกว่าวิธีแรก การกลั่นแบบนี้ใช้กันอย่างกว้างขวางในการผลิตน้ำมันหอมระเหยทางการค้า

ค. การกลั่นด้วยไอน้ำ (direct steam distillation) วิธีนี้ วางพืชอยู่บนตะแกรงในหม้อกลั่น ซึ่งไม่มีน้ำอยู่เลย ไอน้ำภายนอกที่อาจจะเป็นไอน้ำเปือกหรือไอร้อนจัด ใช้ความดันสูงกว่าบรรยากาศ ส่งไปตามท่อใต้ตะแกรง ให้ไอน้ำผ่านขึ้นไปถูกกับพืชบนตะแกรง ไอน้ำต้องมีปริมาณเพียงพอที่จะช่วยให้ น้ำมันระเหยออกมาจากพืช พืชบางชนิดอาจใช้ไอร้อนได้ แต่บางชนิดต้องใช้ไอน้ำเปือก น้ำมันจึงจะถูกปล่อยออกมา ข้อดีของการกลั่นด้วยวิธีนี้คือ สามารถกลั่นได้อย่างรวดเร็ว เมื่อเอาพืชใส่หม้อกลั่น ไม่ต้องเสียเวลารอให้ร้อน ปล่อยไอร้อนเข้าไปได้เลย ปริมาณของสารที่นำเข้ากลั่นบรรจุในหม้อกลั่นได้มาก ทำให้ได้น้ำมันหอมระเหยมาก

2.5 การแยกและการตรวจสอบโดยวิธีทางโครมาโตกราฟีและวิธีทางสเปกโทรสโกปี

2.5.1 โครมาโตกราฟีผิวบาง (TLC)

คำว่า chromatography มาจากภาษากรีก chromatós แปลว่า สี ความหมายเดิมของ chromatography หมายถึงการแยกของผสมที่มีสี ในปัจจุบันหมายถึงเทคนิคที่ใช้แยกสารผสมออกจากกัน โดยอาศัยความสัมพันธ์ระหว่างสารกับเฟสคงที่ (stationary phase) และเฟสเคลื่อนที่ (mobile phase) เฟสคงที่อาจเป็นของแข็งหรือของเหลว ถ้าเป็นของแข็งการแยกจะเป็นแบบดูดซับ (adsorption) ถ้าเป็นของเหลวการแยกสารจะเป็นแบบแบ่งละลาย (partition) เฟสเคลื่อนที่อาจจะเป็นของเหลวหรือแก๊สทำหน้าที่พาสารแต่ละชนิดในสารผสมให้เคลื่อนที่ด้วยอัตราเร็วแตกต่างกัน จึงทำให้สารแยกออกจากกันได้

กระบวนการโครมาโตกราฟีเกิดขึ้น เนื่องจากสารที่ต้องการแยกมีการเคลื่อนที่ในอัตราที่แตกต่างกัน ซึ่งเนื่องมาจากแรง 2 แรง คือ

1. แรงผลักดัน (propelling forces) เกิดเนื่องจากการไหลของตัวเฟสเคลื่อนที่หรือความสามารถในการละลายของสารในตัวเฟสเคลื่อนที่
2. แรงดึง (retarding forces) หมายถึงแรงที่เฟสคงที่ดึงดูดสารไว้ เช่น แรงวานเดอวาลส์ แรงพันธะไฮโดรเจน เป็นต้น

Thin Layer Chromatography (TLC) เป็นโครมาโตกราฟีแบบดูดซับ (solid-liquid chromatography) ของผสมที่ถูกแยกจะถูกดูดซับโดยเฟสคงที่ที่เป็นของแข็ง เฟสคงที่ที่นิยมใช้คือ silica gel ($\text{SiO}_2 \cdot \text{XH}_2\text{O}$) และ alumina (Al_2O_3) ในขณะเดียวกันเฟสเคลื่อนที่ซึ่งเป็นของเหลวก็จะพาสารให้เคลื่อนที่ไป เนื่องจากสารที่มีโครงสร้างต่างกันจะได้รับแรงดึงและแรงผลักดันต่างกันด้วย ดังนั้นสารแต่ละชนิดจึงเคลื่อนที่ในอัตราที่แตกต่างกัน สารที่ถูกดูดซับได้ดีกว่าจะเคลื่อนที่ได้ช้ากว่าสารที่ถูกดูดซับน้อย จึงทำให้เกิดการแยกของสารขึ้นเป็นแถบๆ เรียกว่า chromatogram เฟสคงที่จะทำหน้าที่ 2

ลักษณะ คือ รับโมเลกุลของสารเข้ามาสัมผัสกับตัวมัน เรียกว่าเกิด adsorption และปล่อยให้โมเลกุลของสารเคลื่อนที่ต่อไป เรียกว่าเกิด desorption

เฟสคงที่มีหลายชนิด ในการเลือกใช้จึงต้องเลือกให้เหมาะสมกับสารที่ต้องการแยกตัว อยู่กับที่ที่ดีจะต้องไม่ละลายในเฟสเคลื่อนที่ที่ใช้ ไม่ทำปฏิกิริยากับสารที่ต้องการแยกและต้องไม่เป็น ตัวเร่งของปฏิกิริยา

เฟสเคลื่อนที่ที่ใช้ในขบวนการโครมาโตกราฟีมีหลายชนิด ซึ่งเรียงลำดับความเป็นขั้ว จากต่ำไปหาสูง ดังนี้

เฮกเซน < คาร์บอนเตตราคลอไรด์ < เบนซีน < อีเทอร์ < คลอโรฟอร์ม < เอทิลอะซิเตต < อะซิโตน < เอทานอล < น้ำ

ในบางกรณีเฟสเคลื่อนที่ที่ใช้มีความเป็นขั้วไม่พอ และเฟสคงที่มีความเป็นขั้วสูงกว่า ไม่ก็มีความเป็นขั้วมากเกินไป จึงไม่สามารถจะใช้ตัวเคลื่อนที่ชนิดเดียวได้ จำเป็นต้องใช้ตัวทำละลายผสม เพื่อที่จะได้ตัวทำละลายที่เหมาะสม

การหาค่าความสัมพันธ์ของการเคลื่อนที่ (R_f value)

$$R_f = \frac{\text{ระยะทางจากจุดเริ่มต้นที่สารประกอบเคลื่อนที่}}{\text{ระยะทางจากจุดเริ่มต้นที่ตัวทำละลายเคลื่อนที่}}$$

เมื่อจุดเริ่มต้น คือ จุดศูนย์กลางของสารตัวอย่างที่หยดบนแผ่น TLC

2.6 เครื่องยูวี-วิสิเบิลสเปกโทรโฟโตมิเตอร์ (UV-Visible spectrophotometer)

เครื่อง UV-Vis spectrophotometer เป็นเครื่องมือที่นำเทคนิค UV-Vis spectroscopy ไปใช้งาน เครื่องมือตัวนี้ทำหน้าที่ในการตรวจวัด ความเข้ม แสงที่ผ่านหรือสะท้อนจากตัวอย่างเปรียบเทียบกับ ความเข้มแสงจาก แหล่งกำเนิด เครื่อง UV-Vis spectrophotometer โดยทั่วไปแล้วจะ มีส่วน ประกอบ หลักๆ ที่เหมือนกัน ได้แก่ แหล่งกำเนิดแสง เกรตติงหรือ โมโนโครเมเตอร์ เซลล์ที่บรรจุ สารตัวอย่าง และเครื่องตรวจ วัดแหล่งกำเนิดแสง จะต้องให้แสงที่คงที่อย่างต่อเนื่อง ตัวที่นิยมใช้ คือ หลอดทังสเตน ฮาไลเจน ซึ่งให้แสงที่มีความยาวคลื่นในช่วง 320-2,500 นาโนเมตร สำหรับ แหล่งกำเนิดแสงในช่วง รังสียูวีนั้นจะใช้หลอดไฮโดรเจนหรือหลอด ดิวทีเรียม ซึ่งให้แสงในช่วงความยาวคลื่น 160-375 นาโน เมตร แต่แสงที่ ได้จาก แหล่งกำเนิดนั้นจะมีความยาวคลื่นต่างๆ ดังนั้นจึงต้องใช้ โมโนโครเมเตอร์ เป็น

ตัวกระจายแสงออกเพื่อให้แสงที่จะผ่านไปยังตัวอย่างมีความยาวคลื่นค่าเดียวตาม ที่ต้องการหลังจากนั้นแสงความยาวคลื่นค่าเดียวจะผ่านไปยังเซลล์ที่ บรรจุสารตัวอย่าง (cuvettes) และ สารเปรียบเทียบ ซึ่งมีรูปร่างต่างๆ กัน ออกไป แต่โดยส่วนใหญ่จะมีลักษณะเป็นกล่องทรงสี่เหลี่ยมผืนผ้าที่มีความกว้าง ภายใน 1 เซนติเมตร (ซึ่งค่านี้จะเป็นค่าระยะทางเดินของแสงที่ผ่านเข้าไปใน ตัวอย่างตาม กฎของ Beer-Lambert) เครื่อง UV-Vis spectrophotometer บางรุ่น สามารถใช้ หลอดทดลองเป็น cuvettes ได้ แต่ cuvettes ที่ดีที่สุดนั้น ทำมาจากควอร์ตที่มีคุณภาพสูง สำหรับ cuvettes ที่ทำจากแก้ว หรือพลาสติกนั้น ก็เป็นที่นิยมใช้กันทั่วไป แต่สามารถใช้ได้เฉพาะในช่วงแสงขาวเท่านั้น เพราะ แก้ว และ พลาสติกดูดกลืนแสงในช่วงรังสียูวีแสงในส่วนที่ไม่ถูกดูดกลืน จะเดิน ทางผ่านตัวอย่างมาถึง เครื่องตรวจวัด สำหรับเครื่อง ตรวจวัดที่นิยมใช้ ได้แก่ PMT (photomultiplier tube), diode arrays และ CCDs (charge coupled devices) เครื่องจะทำการบันทึกค่าความยาวคลื่น ร่วมกับค่ามุมของ แต่ละ ความยาวคลื่น ที่เกิดการดูดกลืน ผลของสเปกตรัมที่ได้ จะแสดงในรูป ของกราฟระหว่างค่า absorbance และค่าความยาวคลื่น เครื่อง UV-Vis spectrophotometer สามารถแบ่งได้เป็น 2 ระบบ คือ แบบลำแสงเดี่ยว และแบบลำแสงคู่ สำหรับเครื่องแบบ ลำแสงเดี่ยว เป็นเครื่องที่ใช้ ลำแสงเดี่ยว จาก แหล่งกำเนิด ผ่านไปยังตัวอย่าง เครื่องมือนี้ได้รับ การออกแบบ ให้สามารถ ใช้งานได้ง่ายสะดวก และมี ราคาไม่แพงมากนัก องค์ประกอบของเครื่อง UV-Visible Spectrophotometer ประกอบด้วย องค์ประกอบหลักดังนี้คือ

1. แหล่งกำเนิดแสง ให้แสงช่วงความยาวคลื่นในย่าน UV และ Visible
2. Monochromator ทำหน้าที่แยกแสงออกเป็นแต่ละความยาวคลื่นและแยกส่วนความยาวคลื่น ที่ต้องการใช้
3. Sample holder/Sample cell ช่องใส่ตัวอย่าง และ cell ใส่ตัวอย่างใช้ใส่ตัวอย่างที่ต้องการ วัด
4. Detector ใช้วัดแสงส่วนที่เหลือจากการดูดกลืนของสารตัวอย่าง

2.7 โครมาโตกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง (High Performance liquid Chromatography)

ระบบของการแยกในเทคนิค HPLC มี 2 ชนิด ตามลักษณะการใช้เฟสเคลื่อนที่ คือ

1. Isocratic – การแยกโดยใช้องค์ประกอบของเฟสคงที่แบบเดียวตลอดการแยก
2. Gradient elution – การแยกโดยมีการเปลี่ยนองค์ประกอบของเฟสคงที่ในระหว่างการแยกแบบต่อเนื่องหรือแบบทีละขั้น (stepwise)

เครื่อง HPLC (High Performance Liquid Chromatography) เป็นเครื่องมือใช้สำหรับแยกสารประกอบที่สนใจที่ผสมอยู่ในตัวอย่าง โดยกระบวนการแยกสารประกอบที่สนใจจะเกิดขึ้นระหว่างเฟส 2 เฟส คือ เฟสคงที่ (column) กับ เฟสเคลื่อนที่ (mobile phase) ซึ่งสารจะถูกแยกออกมาในเวลาที่แตกต่างกัน โดยสารผสมที่อยู่ในตัวอย่างสามารถถูกแยกออกจากกันได้นั้น ขึ้นอยู่กับความสามารถในการเข้ากันได้ดีของสารนั้นกับ mobile phase หรือ stationary phase สารประกอบตัวไหนที่สามารถเข้ากันได้ดีกับ mobile phase จะเคลื่อนที่ผ่าน column ได้เร็วกว่าสารนั้นก็就会被แยกออกมาก่อน ส่วนสารที่เข้ากันได้ไม่ดีกับ mobile phase หรือเข้ากันได้ดีกับ stationary phase จะเคลื่อนที่ผ่าน column ได้ช้า ก็จะถูกแยกออกมาทีหลัง โดยสารที่ถูกแยกออกมาได้นี้จะถูกตรวจวัดสัญญาณด้วยตัวตรวจวัดสัญญาณที่บันทึกได้จากตัวตรวจวัดจะมีลักษณะเป็นพีค ซึ่งจะเรียกว่า โครมาโตแกรมโดย HPLC สามารถทดสอบได้ทั้งเชิงคุณภาพ และทดสอบเชิงปริมาณ โดยการเปรียบเทียบกับสารมาตรฐาน

ส่วนประกอบหลักของเครื่อง HPLC

1. Mobile phase/Solvent: หรือตัวทำละลายที่ใช้ในการชะหรือแยกตัวอย่าง เป็นเฟสเคลื่อนที่ มีลักษณะเป็นของเหลวทำหน้าที่ในการนำสารตัวอย่างและตัวทำละลายเข้าสู่ stationary phase (ในที่นี้คือคอลัมน์) เพื่อให้เกิดกระบวนการแยกภายในคอลัมน์
2. Degasser: ทำหน้าที่กำจัดฟองอากาศ อากาศที่มีอยู่ใน mobile phase เพื่อไม่ให้ฟองอากาศเข้าสู่ column และ detector
3. Pump: ทำหน้าที่ดึงตัวทำละลาย (mobile phase) เข้าสู่ระบบ HPLC
4. Injector/Autosampler: ทำหน้าที่ในการฉีดสารตัวอย่างเข้าระบบ HPLC
5. Column: หรือจะเรียกว่า stationary phase มีลักษณะเป็นของแข็งหรือเจล เป็นเฟสอยู่กับที่ ทำหน้าที่ให้เกิดกระบวนการแยกของสารที่สนใจ โดยการบวนการแยกเกิดขึ้นระหว่าง mobile phase กับ stationary phase
6. Detector: คือ ตัวตรวจวัดสัญญาณ ทำหน้าที่ในการตรวจวัดสัญญาณของสารที่สนใจที่ได้จากกระบวนการแยกมีหลายชนิดด้วยกันการเลือกใช้ขึ้นกับตัวอย่างที่สนใจว่าสามารถตอบสนองกับ detector ชนิดไหนได้ดี

การตรวจสอบความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์ (method validation)

การวิเคราะห์เป็นขบวนการที่มีความสำคัญ และจะต้องมีมาตรการตรวจสอบประเมินว่าเป็นวิธีที่ถูกต้อง แม่นยำ อยู่ในเกณฑ์ที่กำหนด ทั้งนี้เพราะผลจากการวิเคราะห์จะบ่งชี้ถึงคุณภาพของ

สารสำคัญทั้งในด้านประสิทธิภาพและความปลอดภัย นอกจากนี้วิธีวิเคราะห์ยังใช้ในการติดตามควบคุมคุณภาพสารสำคัญให้มีมาตรฐานคงที่อยู่เสมอ หากวิธีวิเคราะห์เป็นวิธีที่ให้ผลไม่ถูกต้องแล้วผลที่ได้จากการวิเคราะห์ก็ไม่สามารถบ่งชี้ถึงคุณภาพและความปลอดภัยของสารสำคัญได้ ดังนั้นในการวิเคราะห์ด้วยวิธี HPLC จะต้องศึกษาสภาวะการทดลองและทดสอบในเรื่องความคงตัวของสารละลายต่าง ๆ ในระบบโครมาโตกราฟี ตลอดจนวิธีทดสอบความเหมาะสมของระบบโครมาโตกราฟี (system suitability) และวิธีการหาค่าพารามิเตอร์ต่าง ๆ มีดังนี้

ความถูกต้อง (accuracy) แสดงถึงผลของการวิเคราะห์ว่าใกล้เคียงค่าจริงเพียงใด ซึ่งพิจารณาจากค่า % recovery (%R) โดยการวิเคราะห์ตัวอย่างที่ทราบปริมาณ เป็นการวัดความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์ หรือหาความผิดพลาดของวิธีการ (systemic error หรือ bias) ในการทดลองจะต้องหาค่า %R ของสารละลายมาตรฐานที่มีความเข้มข้นหลายระดับ วิธีที่นำมาใช้คือ วิธี standard addition ทำโดยเติมตัวอย่างที่ทราบปริมาณแน่นอนลงไปในการผลิตภัณฑ์ที่ต้องการวิเคราะห์ หรือตัวอย่างที่ผลิตตามกระบวนการผลิตจริง มีตัวอย่างที่วิเคราะห์อยู่ในตัวอย่างอยู่แล้วก่อนจะเติมตัวอย่างที่ทราบปริมาณแน่นอนเข้าไปเพิ่มอีก

ความแม่นยำ (precision) แสดงถึงความแปรปรวนของผลการวิเคราะห์เมื่อทำการทดลองซ้ำ หรือการกระจายตัวของผลการวิเคราะห์จากค่าเฉลี่ยของการวิเคราะห์เมื่อทำซ้ำ ความแปรปรวน หรือการกระจายของผลการวิเคราะห์จากค่าเฉลี่ย เป็น random error อันเนื่องมาจาก ผู้วิเคราะห์ เครื่องมือ สารเคมีและสิ่งแวดล้อมต่าง ๆ ในการวิเคราะห์ ซึ่งยากที่จะควบคุมให้เหมือนเดิมทุกประการ ค่าที่ใช้แสดงถึงความแม่นยำ คือ relative standard deviation (RSD) หรือ coefficient of variation (CV) ซึ่งคำนวณเป็นค่าร้อยละ

$$\%R.S.D(CV) = (S.D / \bar{X}) \times 100$$

\bar{X} คือ ค่าเฉลี่ยของผลการวิเคราะห์ และ $S.D$ คือ ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน ในการหาความแม่นยำ

แยกได้เป็นความแม่นยำในการทำซ้ำ (repeatability) และการทำใหม่ (reproducibility) ขึ้นกับวิธีการทดลองหรือห้องปฏิบัติการ คือ repeatability หมายถึงการหา % RSD ในการวิเคราะห์ซ้ำในวันเดียวกัน ส่วน reproducibility คือการทำซ้ำต่างวันกัน ซึ่งจะเตรียมน้ำยาต่าง ๆ ใหม่ในการทำซ้ำ การกำหนดค่า % RSD จะขึ้นกับระดับสารที่จะวิเคราะห์หาปริมาณ % RSD จะเพิ่มขึ้นเมื่อปริมาณของสารที่ต้องการวิเคราะห์ต่ำลง

ปริมาณต่ำสุดที่ตรวจพบได้ (limit of detection, LOD) และปริมาณต่ำสุดที่หาปริมาณได้ (limit of quantitative, LOQ) LOD จะต้องใช้ในการทำ limit test ส่วน LOQ ใช้ในการวิเคราะห์หาปริมาณที่วัดได้ต่ำสุดของสิ่งที่ต้องการหาในตัวอย่าง ที่สามารถตรวจพบได้ด้วยความถูกต้อง และความแม่นยำที่

ยอมรับได้ การกำหนดค่า LOD และ LOQ ในวิธีที่ใช้เครื่องมือในการวิเคราะห์ ทำโดยหาค่า background และ SD โดยใช้ blank การวิเคราะห์หา ค่า LOD จะเท่ากับหรือมากกว่า 3 S.D และค่า LOQ จะเท่ากับหรือมากกว่า 10 S.D ค่า LOD อาจหาได้จากค่า S/N (signal to noise ratio) โดยเปรียบเทียบระหว่างตัวอย่างที่รู้ปริมาณและ blank ค่าที่ยอมรับคือ 2:1 หรือ 3:1

ความเฉพาะเจาะจง (selectivity หรือ specificity) เป็นความสามารถของวิธีวิเคราะห์ ที่ตรวจพบอย่างถูกต้อง เจาะจงเฉพาะสารที่ต้องการวิเคราะห์เท่านั้น การวิเคราะห์ไม่ถูกรบกวนจากส่วนผสมของยา ตัวยาร่วม สิ่งที่ได้จากการสลายตัวของยา สารปนเปื้อน และสารตั้งต้นจากการผลิตตัวยาสำคัญ

ความเป็นเส้นตรง (linearity) และช่วงการวิเคราะห์ (range) คือ การหาค่าช่วงของความเข้มข้นที่ให้ผลการวิเคราะห์ถูกต้องเป็นสัดส่วนโดยตรงกับปริมาณตัวยามีอยู่จริง

สำหรับ HPLC จะต้องทำ system suitability ร่วมในการทำ validation ด้วย เพื่อตรวจสอบระบบการทำงานทางอิเล็กทรอนิกส์และคอลัมน์ ว่าอยู่ในสภาพที่เหมาะสมสำหรับใช้งานหรือไม่ การทดสอบมี 2 ส่วน ส่วนแรก คือ หา precision โดยดูผลเมื่อฉีดซ้ำ (replicate) โดยนำความสูง พื้นที่ หรือ respond ratio มาคำนวณ % RSD ดูเกณฑ์ที่ยอมรับ USP26 กำหนดให้ % RSD น้อยกว่า 2 เมื่อฉีดซ้ำ 5 ครั้ง และ % RSD มากกว่า 2 ได้ เมื่อฉีดซ้ำกัน 6 ครั้งขึ้นไป ส่วนที่สอง คือ resolution เป็นความสามารถในการแยกพีค โดยการหาค่า resolution (R) และ tailing factor (T) USP กำหนดค่า R ไม่น้อยกว่า 2-3

2.8 การตรวจเอกลักษณ์ของพืช

การตรวจเอกลักษณ์ของพืช โดยอาศัยลักษณะภายนอกของพืช เป็นวิธีที่ง่ายที่สุด ที่สามารถบอกได้ว่าเป็นพืชชนิดใด โดยการใช้สัมผัสทั้งห้า สังเกตลักษณะของ ขนาด รูปร่าง สีและร่องรอยบนพืช รอยหัก และสีภายใน กลิ่น และรส อย่างไรก็ตาม การดูลักษณะภายนอกเพียงอย่างเดียว อาจไม่สามารถบ่งชี้ชนิดของพืชได้อย่างถูกต้อง ทำให้มีการใช้วิธีการทางโครมาโตกราฟีที่ได้รับการยอมรับกันอย่างกว้างขวางที่สำคัญ เพื่อช่วยในการจำแนกชนิดของพืช เทคนิคทางโครมาโตกราฟีที่นิยมใช้เพื่อตรวจเอกลักษณ์ของพืช มีหลายวิธี⁽¹⁶⁻³³⁾ เช่น Thin Layer Chromatography, High Performance liquid Chromatography ซึ่งแต่ละเทคนิคจะมีข้อดีแตกต่างกันไป จากการศึกษาได้มีการรายงานในต่างประเทศ ในการจำแนกพืชบางชนิดในตระกูลนี้ ออกจากกันโดยอาศัยองค์ประกอบหลักที่สำคัญ J.S. Zhang และคณะ⁽¹⁶⁾ ได้แยกองค์ประกอบหลักของพืชทั้ง 2 ชนิดที่ผสมกันอยู่ด้วยเทคนิค HPTLC และ Gas Chromatography พบว่า สามารถแยก spot ของ *Curcuma aromatica* Salisb. ออกจาก *Curcuma longa* Linn. ได้และพร้อมยืนยันด้วยผลของ Gas Chromatography. Jadhav B.K. และคณะ⁽¹⁷⁾ ได้ศึกษา

องค์ประกอบหลักจากเหง้าของ *Curcuma longa* Linn. ด้วยเทคนิค HPLC พบว่าองค์ประกอบหลักที่ได้จากเหง้าของ *Curcuma longa* Linn. คือ curcumin, demethoxycurcuminand, bisdemethoxycurcumin ได้มีการรายงานในประเทศไทยจากการศึกษาของ Rui L. และคณะ⁽¹⁸⁾ โดยใช้เทคนิค HPLC มาวิเคราะห์องค์ประกอบของสารสำคัญของ *Curcuma longa* Linn. สามารถวิเคราะห์แยกสารหลักที่ทราบชนิดทั้งหมดจำนวน 5 องค์ประกอบ โดยวิธี GC ที่ได้ปรับปรุงขึ้นในการวิเคราะห์นี้สามารถใช้เป็นวิธีเพื่อทำ fingerprint ของ *Curcuma longa* Linn. ได้⁽¹⁹⁾ ทั้งนี้ยังได้มีการศึกษาเพื่อหาวิธีวิเคราะห์สารสกัดของพืชในสกุล *Curcuma longa* Linn. Mara E.M.B. และคณะ ได้ศึกษาวิธีการสกัดสารด้วยเทคนิคต่างๆ เพื่อเปรียบเทียบปริมาณสารสำคัญของ *Curcuma longa* Linn. พบว่า วิธีการสกัดที่ให้ปริมาณสารสำคัญมากที่สุด คือ soxhlet extraction⁽²⁰⁾ จากการค้นคว้าพบว่า ยังไม่มีการรายงานการเปรียบเทียบองค์ประกอบสารสำคัญจากพืชทั้งหมดที่มีการใช้มากในตระกูลนี้ เช่น ขมิ้นชัน ขมิ้นอ้อย ขมิ้นดำ ที่ปลูกในประเทศไทย ส่วนใหญ่จะเป็นการเปรียบเทียบองค์ประกอบจากพืชเพียงหนึ่งชนิดจากหลากหลายแหล่งหรือเปรียบเทียบองค์ประกอบพืชสองชนิด และเป็นที่ทราบกันดีว่าคุณภาพของสมุนไพรขึ้นอยู่กับปัจจัยหลายๆ ปัจจัย เช่น สภาพภูมิประเทศและภูมิอากาศในการเพาะปลูก การเก็บเกี่ยว การทำให้แห้ง และการเก็บรักษา ซึ่งจะส่งผลต่อการจำแนกพืชทางพฤกษศาสตร์ และองค์ประกอบในพืชสมุนไพร เพื่อให้ได้ข้อมูลที่จะนำไปใช้ประโยชน์ได้อย่างถูกต้อง และในประเทศเรา ได้มีการนำพืชทั้ง 3 ชนิด มาใช้ในการรักษาโรคเบื้องต้นในแบบแผนโบราณของภูมิปัญญาชาวบ้าน จึงเห็นว่าการศึกษาวิจัยโดยการใช้วิธีทางโครมาโตกราฟีที่ทำได้ง่าย เช่น TLC, HPLC⁽²¹⁻³³⁾ มาช่วยในการจำแนกชนิดของพืช อาจจะมีประโยชน์ต่อการศึกษาวิจัยในอนาคต

บทที่ 3

วิธีการทดลอง

3.1 สารเคมีและตัวอย่าง

ชื่อสารเคมี	ประเภท	บริษัทผู้ผลิต
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	HPLC grade	Ulsan, Korea
7. Curcuma cream	Cosmetic	ท.จ.ก. ยูเอส คอส เมติกส์
8. Bio kurmin cream	Cosmetic	ไอโอบอสติกจำกัด
9. น้ำมันชั้น A1	ตัวอย่างพืช	ต.ชัยนาม อ.วังทอง จ.พิษณุโลก
10. น้ำมันชั้น A2	ตัวอย่างพืช	ร้านค้าที่วัดพระศรีรัตน- มหาธาตุวรมหาวิหาร อ.เมือง จ.พิษณุโลก
11. น้ำมันชั้น A3	ตัวอย่างพืช	ต.ท่างาม อ.วัดโบสถ์ จ.พิษณุโลก
12. น้ำมันอ้อย A4	ตัวอย่างพืช	ต.ท่างาม อ.วัดโบสถ์ จ.พิษณุโลก
13. น้ำมันดำ A5	ตัวอย่างพืช	ต.ท่างาม อ.วัดโบสถ์ จ.พิษณุโลก

3.2 อุปกรณ์และเครื่องมือ

1. เครื่องชั่งวิเคราะห์ (Analytical Balance, AG 204 Metter 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 ไฮแอนติฟินโปรโมชัน จำกัด)
7. ชุดกรองสูญญากาศ (Power consumption, Taiwan)

3.3 วิธีการทดลอง

3.3.1 การเตรียมพืชตัวอย่าง

3.3.1.1 ได้เลือกซื้อขมิ้นและเก็บตัวอย่างจากแหล่งที่มาต่างๆ กัน ในเขตจังหวัดพิษณุโลก

3.3.1.2 เตรียมผงแห้งของพืชตัวอย่าง

เลือกเหง้าของขมิ้นตัวอย่างที่มีลักษณะสมบูรณ์ นำเหง้าที่ผ่านการทำความสะอาดผึ่งให้แห้งมาหั่นเป็นแผ่นบาง ๆ อบที่อุณหภูมิ 60 °C เป็นเวลา 48 ชั่วโมง ให้แห้ง บดให้เป็นผงละเอียดด้วยเครื่องปั่นละเอียด แล้วเก็บใส่ภาชนะ

3.3.1.3 การสกัดสารสำคัญจากเหง้าขมิ้นด้วยทำละลายที่เหมาะสมโดยวิธี soxhlet extraction

นำผงแห้งมาหนัก 2 กรัม สกัดด้วยเฮกเซน (hexane) ปริมาตร 200 มิลลิลิตร เป็นเวลา 2 ชั่วโมง สกัดซ้ำ โดยใช้ methanol เป็นเวลา 2 ชั่วโมง จากนั้นเก็บแยกสารสกัดเข้มข้นที่ได้ใส่ลงในขวดที่มีฝาปิดสนิท ซึ่งจะเรียกส่วนนี้ว่าเป็น สารสกัด นำสารสกัดที่ได้นำมาคำนวณหาค่า % yield หาได้ดังนี้

$$\% \text{ yield} = \frac{\text{น้ำหนักของสารสกัดที่ได้}}{\text{น้ำหนักของสมุนไพรที่ใช้สกัด}} \times 100$$

3.3.2 การหาความยาวคลื่นของการดูดกลืนแสงสูงสุดด้วยเทคนิคยูวี-วิสิเบิลสเปกโทรโฟโตเมตรี (UV-Visible Spectrophotometry)

เตรียมสารละลายมาตรฐานเคอร์คูมินอยด์ที่มีความเข้มข้น 1000 mg/L โดยการชั่ง สารมาตรฐานเคอร์คูมินอยด์จำนวน 50 มิลลิกรัม ใส่ในขวดวัดปริมาตรขนาด 50 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรด้วย

เอทานอล จำนวน 50 มิลลิลิตร แล้วทำการเจือจาง (dilute) ให้สารมาตรฐานมีความเข้มข้นเป็น 20 mg/L แล้วนำไปตรวจวัดหาความยาวคลื่นของการดูดกลืนแสงสูงสุดตั้งแต่ความยาวคลื่น 200–700 nm ด้วยเครื่อง UV-Visible spectrophotometer

3.3.3 วิเคราะห์หาองค์ประกอบที่สำคัญของสารสกัดจากขมิ้น โดยเทคนิค HPLC

3.3.3.1 ศึกษาสภาวะที่เหมาะสมของระบบโครมาโตกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง

3.3.3.2 ศึกษาองค์ประกอบของเฟสเคลื่อนที่ (mobile phase) ที่เหมาะสม

โดยพิจารณาจากความแรงของควมมีขั้วของตัวทำละลายให้เหมาะสมกับสารสำคัญและเฟสคงที่ โดยปรับอัตราส่วนระหว่างตัวทำละลายอินทรีย์กับน้ำในเฟสเคลื่อนที่ และอัตราการไหลของเฟสเคลื่อนที่ที่เหมาะสมทั้งนี้ได้พิจารณาในเรื่องความดันของระบบและเวลาที่ใช้ในการวิเคราะห์ด้วย

3.3.3.3 ศึกษาชนิดของคอลัมน์ (Column type)

โดยเตรียมสารละลายมาตรฐานเคอร์คูมินอยด์ที่มีความเข้มข้น 20 mg/L แล้วใช้ mobile phase ที่เหมาะสมในการแยก ตรวจวัดที่ความยาวคลื่น 425 นาโนเมตร แล้วศึกษาโครมาโทแกรมของสารมาตรฐานผสมเคอร์คูมินอยด์เพื่อศึกษาชนิดของ column ที่ให้ผลการแยกที่ดีที่สุด

3.3.3.4 ศึกษาอัตราการไหล (Flow rate) ที่เหมาะสม

โดยเตรียมสารละลายมาตรฐานเคอร์คูมินอยด์ ความเข้มข้น 20 mg/L แล้วใช้ mobile phase ที่เหมาะสม ตรวจวัดที่ความยาวคลื่น 425 นาโนเมตร แล้วใช้ column ที่เหมาะสม ศึกษาอัตราการไหล (flow rate) ตั้งแต่ 0.5–1.5 mL/min

3.3.3.5 สร้างกราฟมาตรฐานเคอร์คูมินอยด์ (Curcuminoids)

เตรียมสารละลายมาตรฐานเคอร์คูมินอยด์ให้มีความเข้มข้นต่างๆ ดังนี้ 5, 10, 15 และ 20 mg/L ตามลำดับ สารละลายมาตรฐานปรับปริมาตรด้วยเอทานอล แล้วนำสารละลายมาตรฐานไปฉีด (inject) เข้าระบบ HPLC ที่ปริมาตร 10 μ L และทำการทดลองซ้ำ 3 ครั้ง

3.4 การตรวจสอบความถูกต้องของเทคนิควิเคราะห์ที่พัฒนาขึ้น

3.4.1 Limit of detection และ Limit of quantitative

หาได้จากกราฟมาตรฐานเคอร์คูมินอยด์ โดยใช้สมการในการคำนวณ $LOD = 3(S.D/s)$ และ $LOQ = 10 (S.D/s)$ โดยที่ S.D คือส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานของสัญญาณและ s คือความชันของเส้นตรง

3.4.2 Linearity และ 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 แล้วปรับปริมาตรด้วย ethanol แล้วนำไป inject เข้าสู่ระบบ HPLC ที่ปริมาตร 10 μ L ทำการทดลองซ้ำ 5 ครั้ง

3.4.3 Precision

เตรียมสารละลายมาตรฐานเคอร์คูมินอยด์ที่มีความเข้มข้นต่างๆ ดังนี้ 5, 10, 15 และ 20 mg/L ตามลำดับ ปรับปริมาตรด้วยเอทานอล แล้วนำไปฉีด (inject) เข้าสู่ระบบ HPLC ที่ปริมาตร 10 μ L ทำการทดลองซ้ำ 7 ครั้ง (intra-day) และทำการทดลองซ้ำระหว่างวัน (inter-day) ของระบบ แล้วนำผลที่ได้ไปคำนวณหาค่า S.D หรือ R.S.D

3.4.4 Accuracy

เตรียมโดยขังสารสกัด (crude extract) ให้มีน้ำหนัก 10 มิลลิกรัม ปรับปริมาตร 10 มิลลิลิตร ด้วยเอทานอล แล้วบีบเปิดสารละลายตัวอย่างปริมาตร 500 ไมโครลิตร ใส่ลงในขวดปรับปริมาตรขนาด 5 มิลลิลิตร จำนวน 4 ขวด ขวดที่ 1 ปรับปริมาตรด้วย ethanol ส่วนขวดที่ 2, 3 และ 4 เติมสารละลายมาตรฐานเคอร์คูมินอยด์ปริมาตรจำนวน 5, 10 และ 15 ไมโครลิตร ตามลำดับ แล้วปรับปริมาตรด้วย ethanol จนปริมาตรครบ 1 มิลลิลิตร แล้วนำไปฉีด (inject) เข้าสู่ระบบ HPLC ที่ปริมาตร 10 μ L ทำการทดลองซ้ำ 3 ครั้ง แล้วนำผลที่ได้ไปคำนวณหาค่า % recovery

3.5 การวิเคราะห์หาองค์ประกอบที่สำคัญของสารสกัดจากขมิ้น โดยเทคนิค TLC

เตรียมสารละลายมาตรฐาน: โดยขังสารมาตรฐานเคอร์คูมินอยด์ประมาณ 10 มิลลิกรัม ละลายด้วยเอทานอล 1 มิลลิลิตร จะได้สารละลายมาตรฐานเคอร์คูมินอยด์ที่มีความเข้มข้น 0.1 %

เตรียมสารสกัดตัวอย่าง: โดยขังสารสกัดตัวอย่างประมาณ 0.05 กรัม ละลายด้วยเอทานอล 5 มิลลิลิตร จะได้สารตัวอย่างที่มีความเข้มข้นประมาณ 1%

นำแผ่น TLC ออบไล่ความชื้นที่อุณหภูมิ 110 °C เป็นเวลา 1 ชั่วโมง แล้วเก็บไว้ในโถดูดความชื้น นำแผ่น TLC มาทำเครื่องหมายเริ่มต้นการ run ตัวอย่าง ห่างจากขอบล่างประมาณ 1 เซนติเมตร และทำเครื่องหมาย solvent front ด้านบนแผ่น TLC ห่างจากขอบบน ประมาณ 0.5 เซนติเมตร จากนั้นทำการ spot ตัวอย่าง โดยใช้ capillary tube ที่มีปลายแหลม หลังจากการ spot แล้ว ทิ้งแผ่น TLC ไว้ให้แห้ง เตรียม

developing solvent ตามอัตราส่วนที่กำหนดเอาไว้ ใส่ลงใน tank ที่บุด้วยกระดาษกรอง เพื่อสังเกตการณ์
อิมพัลส์ของตัวทำละลาย นำแผ่น TLC ไปวางไว้ใน tank ให้ solvent ขึ้นไปถึงตำแหน่ง solvent front จึงเอา
ออก ปล่อยให้ solvent ระเหยให้หมดแล้วตรวจวิเคราะห์เทียบกับสารละลายมาตรฐาน

บทที่ 4

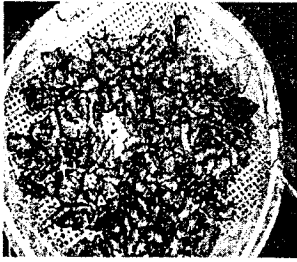
ผลการวิจัย

4.1 การศึกษาการเตรียมพืชตัวอย่าง

จากการศึกษาได้ทำการเก็บตัวอย่างพืชทั้งหมด 5 ตัวอย่างจากแหล่งพืชตัวอย่างที่แตกต่างกัน และได้กำหนดสัญลักษณ์ขึ้นเพื่อให้ง่ายต่อการเข้าใจ โดยแสดงรหัสที่กำหนดดังตารางที่ 1

ตารางที่ 1 แสดงตัวอย่างพืชขมิ้นจากแหล่งต่างๆ และรหัสที่กำหนดขึ้น

ชื่อพืช	แหล่งที่มา	รหัสที่กำหนด
1. ขมิ้นชัน	ต.ชัยนาม อ.วังทอง จ.พิษณุโลก	A1
2. ขมิ้นชัน	ร้านค้าที่วัดพระศรีรัตนมหาธาตุวรมหาวิหาร อ.เมือง จ.พิษณุโลก	A2
3. ขมิ้นชัน	ต.ท่างาม อ.วัดโบสถ์ จ.พิษณุโลก	A3
4. ขมิ้นอ้อย	ต.ท่างาม อ.วัดโบสถ์ จ.พิษณุโลก	A4
5. ขมิ้นดำ	ต.ท่างาม อ.วัดโบสถ์ จ.พิษณุโลก	A5
6. Curcuma cream	ท.จ.ก. ยูเอส คอสเมติกส์	C1
7. Bio kurmin cream	ไอโอคอสมิก จำกัด	C2



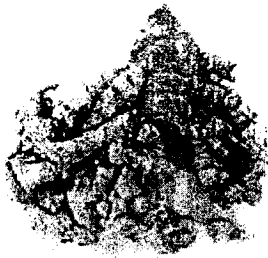
ขมิ้นชัน (A1)



ขมิ้นชัน (A2)



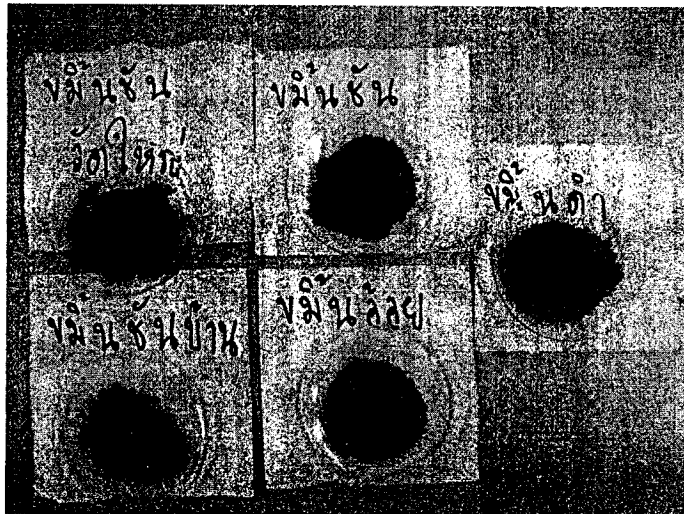
ขมิ้นชัน (A3)



ขมิ้นอ้อย (A4)



ขมิ้นดำ (A5)



ขมิ้นที่ผ่านการอบแล้ว

รูปที่ 1 แสดงลักษณะและชนิดของขมิ้นทั้ง 5 ตัวอย่าง

4.2 ผลของการสกัดสารสำคัญจากไขมันตัวอย่างด้วยตัวทำละลายที่เหมาะสมโดยวิธี Soxhlet extraction

จากการนำตัวอย่างไขมันชั้น ไขมันอ่อน และไขมันดำ โดยเลือกเหง้าของไขมันตัวอย่างที่มีลักษณะสมบูรณ์ นำเหง้าที่ผ่านการทำความสะอาดสิ่งให้แห้ง มาหั่นเป็นแผ่นบาง ๆ อบที่อุณหภูมิ 60 °C เป็นเวลา 48 ชั่วโมง ให้แห้งและบดให้เป็นผงละเอียดด้วยเครื่องบดละเอียด จากนั้นนำผงพืชแห้งมาชั่งให้มีน้ำหนักประมาณ 2 กรัม แล้วสกัดด้วยเฮกเซน (hexane) ปริมาตร 200 มิลลิลิตร เป็นเวลา 2 ชั่วโมง สกัดซ้ำอีกด้วย methanol เป็นเวลา 2 ชั่วโมง จากนั้นเก็บแยกสารสกัดเข้มข้นที่ได้ใส่ลงในขวดที่มีฝาปิดสนิท นำสารสกัดที่ได้นำมาคำนวณหาค่า %yield หาผลการทดลองดังนี้

ตารางที่ 2 แสดงขั้นตอนของการสกัดโดยวิธี Soxhlet extraction

ขั้นตอนที่ 1 สกัดด้วย Hexane

ระบบ	อุณหภูมิ (°C)	รอบ	เวลา (นาที)
Step 1	11	20	120
Step 2	11	20	15
Step 3	10	20	10

ขั้นตอนที่ 2 สกัดด้วย Ethanol

ระบบ	อุณหภูมิ (°C)	รอบ	เวลา (นาที)
Step 1	13	20	120
Step 2	11	20	15
Step 3	10	20	10

ตารางที่ 3 แสดงค่า %yield ของตัวอย่างสารที่สกัดได้จากไขมันชนิดต่างๆ

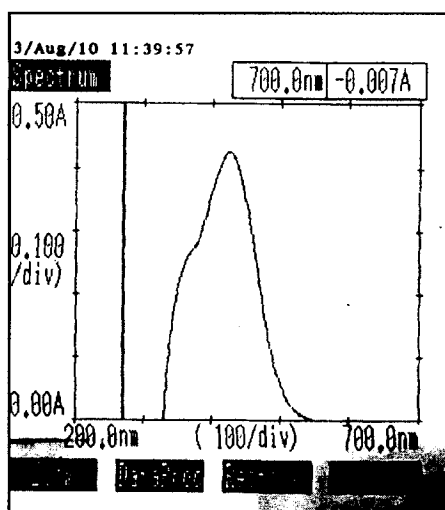
ตัวอย่างพืช (รหัส)	ลักษณะสี	น้ำหนักของพืชที่ใช้สกัด (กรัม)	%yield
A1	ส้มแดง	2	0.5523
A2	ส้มแดง	2	0.5741
A3	ส้มแดง	2	1.0406
A4	น้ำตาลส้ม	2	0.9627
A5	น้ำตาล	2	0.6066



รูปที่ 2 แสดงลักษณะสารสกัดของพืชทั้ง 5 ตัวอย่างที่บรรจุในขวดเก็บสาร

4.3 ผลการวิเคราะห์ความยาวคลื่นของการดูดกลืนแสงสูงสุดด้วยเทคนิคยูวี-วิสิเบิลสเปกโทรโฟโตเมตรี

จากการศึกษาค่าการดูดกลืนแสงสูงสุดของสารละลายมาตรฐานเคอร์คูมินอยด์โดยการเตรียมสารละลายมาตรฐานเคอร์คูมินอยด์ที่มีความเข้มข้น 1000 mg/L แล้วเจือจาง (dilute) ด้วยน้ำกลั่นให้ได้สารมาตรฐานเคอร์คูมินอยด์ที่มีความเข้มข้น 20 mg/L แล้วนำไปสแกนวัดค่าการดูดกลืนแสงสูงสุดด้วยเครื่อง UV-Visible Spectrophotometer ที่ความยาวคลื่นตั้งแต่ 200–700 นาโนเมตร พบว่าค่าการดูดกลืนแสงสูงสุดของสารละลายมาตรฐานเคอร์คูมินอยด์ มีค่าเท่ากับ 425 นาโนเมตร แสดงดังรูปที่ 3



รูปที่ 3 แสดงสัญญาณ UV-Visible spectrum ของสารละลายมาตรฐานเคอร์คูมินอยด์ที่มีความเข้มข้น 20 mg/L

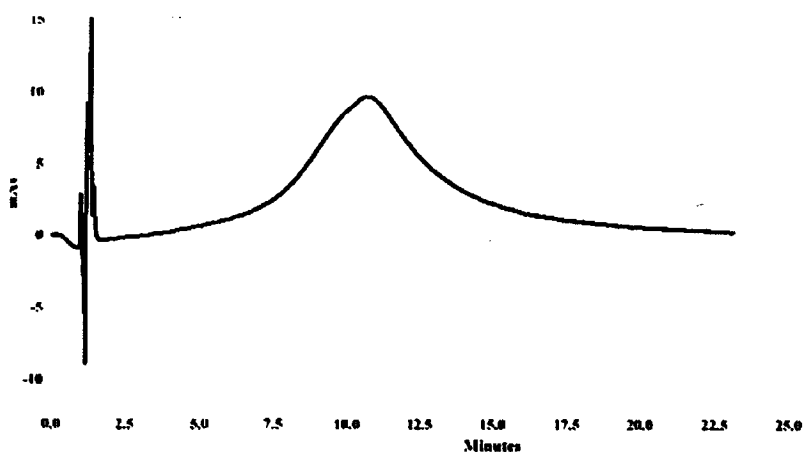
4.4 ผลการวิเคราะห์โดยวิธีโครมาโตกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง (HPLC)

4.4.1 ผลการศึกษาชนิดของวัฏภาคเคลื่อนที่และสัดส่วนที่เหมาะสม

ระบบวัฏภาคเคลื่อนที่ที่นำมาศึกษามี 4 ระบบคือ ระบบที่ (1) propanol กับ sodium dodecyl sulfate (SDS) pH7, 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 โดยใช้คอลัมน์ Inertsil ODS-3 ขนาด 4.60×150 mm ตรวจวัดที่ความยาวคลื่น 425 nm ปริมาตรสารละลายที่ฉีดเท่ากับ 10 μ L โดยฉีดสารละลายมาตรฐานผสมเคอร์คูมินอยด์ที่มีความเข้มข้นของสารละลายผสมเท่ากับ 20 mg/L ได้โครมาโทแกรมดังแสดงในรูปที่ 4

จากโครมาโทแกรมที่แสดงในรูปที่ 4 พบว่าการฉีดสารละลายมาตรฐานเคอร์คูมินอยด์ซึ่งพีคของสารละลายมาตรฐานทั้งสามชนิดไม่สามารถทำให้แยกออกจากกันได้และนอกจากนี้ยังมีปัญหาเรื่องฟองทำให้ไม่สามารถนำระบบนี้มาใช้เป็นวัฏภาคเคลื่อนที่ได้

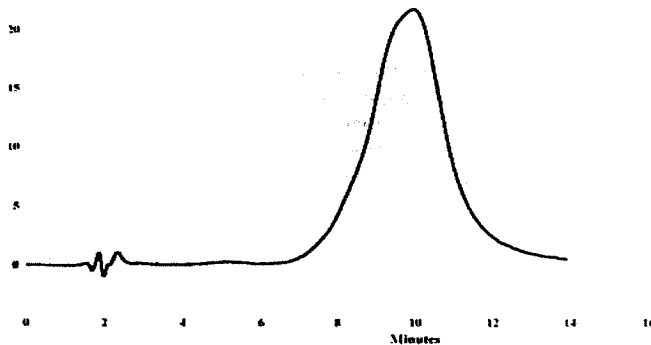


รูปที่ 4 แสดงลักษณะโครมาโตแกรมของระบบ isocratic elution ของวัฏภาคเคลื่อนที่ผสมระหว่าง propanol กับ sodium dodecyl sulfate (SDS) pH 7 ที่อัตราส่วน 5:95 v/v

ระบบที่ 2 เมื่อนำ water กับ 70% methanol มาใช้เป็นวัฏภาคเคลื่อนที่ในเทคนิค HPLC ด้วยระบบ isocratic elution อัตราการไหลเท่ากับ 1 mL/min โดยใช้คอลัมน์ Inertsil ODS-3 ขนาด 4.60×150 mm ตรวจวัดที่ความยาวคลื่น 425 nm ปริมาตรสารละลายที่ฉีดเท่ากับ 10 μ L โดยฉีด

สารละลายมาตรฐานผสมเคอร์คูมินอยด์ที่มีความเข้มข้นของสารละลายผสมเท่ากับ 20 mg/L ได้โครมาโทแกรมดังแสดงในรูปที่ 5

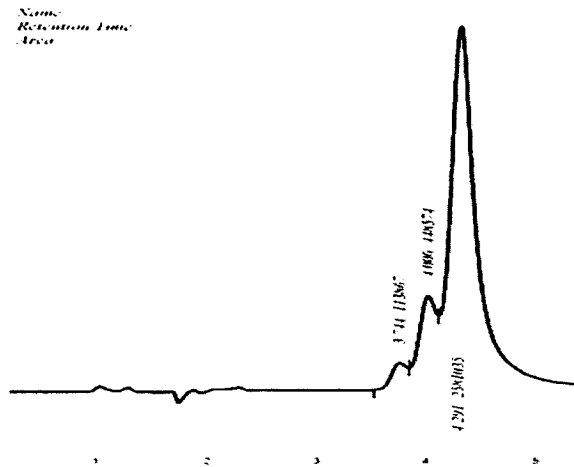
จากโครมาโทแกรมที่แสดงในรูปที่ 5 พบว่าการฉีดสารละลายมาตรฐานเคอร์คูมินอยด์ซึ่งพีคของสารละลายมาตรฐานทั้งสามชนิดไม่สามารถทำให้แยกออกจากกันได้ ทำให้ไม่สามารถนำระบบนี้มาใช้เป็นวัฏภาคเคลื่อนที่ได้



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

ระบบที่ 3 เมื่อนำ water กับ acetonitrile มาใช้เป็นวัฏภาคเคลื่อนที่ในเทคนิค HPLC ด้วยระบบ isocratic elution อัตราการไหลเท่ากับ 1 mL/min โดยใช้คอลัมน์ Inertsil ODS-3 ขนาด 4.60×150 mm ตรวจวัดที่ความยาวคลื่น 425 nm ปริมาตรสารละลายที่ฉีดเท่ากับ 10 μ L โดยฉีดสารละลายมาตรฐานผสมเคอร์คูมินอยด์ที่มีความเข้มข้นของสารละลายผสมเท่ากับ 20 mg/L ได้โครมาโทแกรมดังแสดงในรูปที่ 6

จากโครมาโทแกรมที่แสดงในรูปที่ 6 พบว่าการฉีดสารละลายมาตรฐานเคอร์คูมินอยด์ซึ่งหัวพีคของสารละลายมาตรฐานทั้งสามชนิดแยกออก แต่ไม่สามารถแยกออกจากกันได้ และมีค่า resolution ต่ำ ทำให้ไม่สามารถนำระบบนี้มาใช้เป็นวัฏภาคเคลื่อนที่ได้



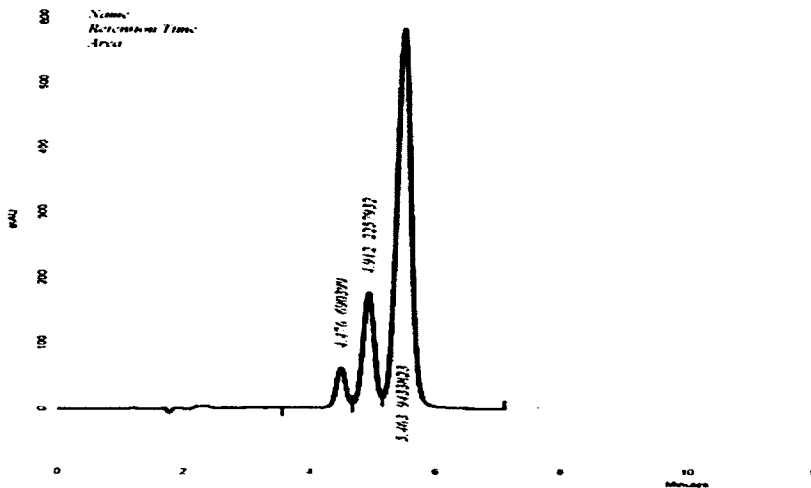
รูปที่ 6 แสดงลักษณะโครมาโตแกรมของระบบ isocratic elution ของวัฏภาคเคลื่อนที่ผสมระหว่าง water กับ acetonitrile ที่อัตราส่วน 5:95 v/v

ระบบที่ 4 เมื่อนำ 2% acetic acid กับ acetonitrile มาใช้เป็นวัฏภาคเคลื่อนที่ในเทคนิค HPLC ด้วยระบบ gradient elution สัดส่วนวัฏภาคเคลื่อนที่แสดงดังตารางที่ 4 อัตราการไหลเท่ากับ 1 mL/min โดยใช้คอลัมน์ Inertsil ODS-3 ขนาด 4.60x150 mm ตรวจวัดที่ความยาวคลื่น 425 nm ปริมาตรสารละลายที่ฉีดเท่ากับ 10 μ L โดยฉีดสารละลายมาตรฐานผสมเคอร์คูมินอยด์ที่มีความเข้มข้นของสารละลายผสมเท่ากับ 20 mg/L ได้โครมาโตแกรมดังแสดงในรูปที่ 7

จากโครมาโตแกรมที่แสดงในรูปที่ 7 พบว่าการฉีดสารละลายมาตรฐานเคอร์คูมินอยด์ซึ่งห้วพีคของสารละลายมาตรฐานทั้งสามชนิดแยกออกจากกันได้ดีและมีค่า resolution ที่ดีพอสำหรับการวิเคราะห์ ทำให้สามารถเลือกระบบนี้มาใช้เป็นวัฏภาคเคลื่อนที่ได้ และใช้เวลาในการแยก 12 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 7 แสดงลักษณะโครมาโตแกรมของระบบ gradient elution ของวัฏภาคเคลื่อนที่ผสมระหว่าง 2% acetic acid กับ acetonitrile

4.4.2 ผลการศึกษาชนิดของคอลัมน์

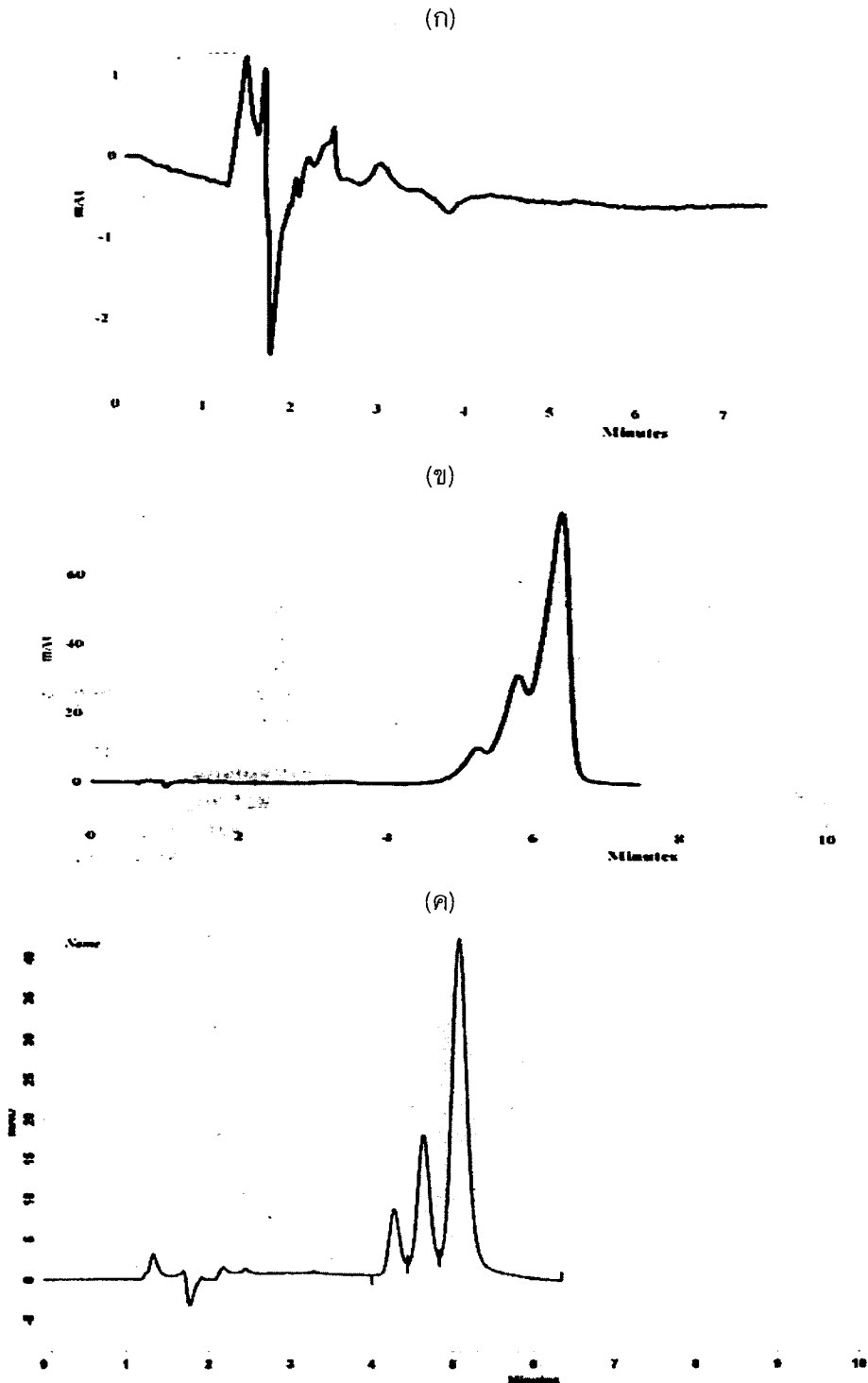
เมื่อได้ระบบของวัฏภาคเคลื่อนที่ที่เหมาะสมจากการทดลอง คือ ระบบที่ 4 จากนั้นทำการศึกษาชนิดของคอลัมน์ที่เหมาะสมสำหรับแยกสารสำคัญทั้ง 3 ชนิดจากขมิ้น คอลัมน์ที่นำมาศึกษาทั้งหมด 3 ชนิดคอลัมน์ ได้แก่ คอลัมน์ที่ 1: Chromolith RP-18 ขนาด 4.60×25 mm (Merck, Germany), คอลัมน์ที่ 2: Hypersil ODS-3 ขนาด (GL Sciences Inc. Japan) และคอลัมน์ที่ 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 9 อัตราการไหลเท่ากับ 1 mL/min โดยใช้คอลัมน์ชนิดที่ 1: Chromolith RP-18 ขนาด 4.60×25 mm ตรวจวัดที่ความยาวคลื่น 425 nm ปริมาตรสารละลายที่ฉีดเท่ากับ 10 μ L โดยฉีดสารละลายมาตรฐานผสมเคอร์คูมินอยด์ที่มีความเข้มข้นของสารละลายผสมเท่ากับ 20 mg/L ได้โครมาโตแกรมดังแสดงในรูปที่ 8 (ก) พบว่าสารละลายมาตรฐานเคอร์คูมินอยด์ ทั้ง 3 ชนิด ไม่สามารถทำให้แยกออกจากกันได้ด้วยคอลัมน์ชนิดนี้

เมื่อใช้คอลัมน์ชนิดที่ 2: Hypersil ODS-3 ขนาด 4.60×150 mm มาใช้แยกสารละลายมาตรฐานผสมเคอร์คูมินอยด์ที่มีความเข้มข้นของสารละลายผสมเท่ากับ 20 mg/L ได้โครมาโตแกรมดังแสดงในรูปที่ 8 (ข) พบว่าสารละลายมาตรฐานเคอร์คูมินอยด์ทั้ง 3 ชนิด แยกออกจากกันได้ไม่ดี มีค่า resolution ต่ำ จึงไม่สามารถใช้คอลัมน์ชนิดนี้มาทำการแยกสารได้

และเมื่อใช้คอลัมน์ชนิดที่ 3: Inertsil ODS-3 ขนาด 4.60×150 mm มาใช้แยกสารละลายมาตรฐานผสมเคอร์คูมินอยด์ที่มีความเข้มข้นของสารละลายผสมเท่ากับ 20 mg/L ได้โครมาโตแกรมดัง

แสดงในรูปที่ 8 (ค) พบว่าสารละลายมาตรฐานเคอร์คูมินอยด์ทั้ง 3 ชนิด แยกออกจากกันได้ดี มีค่า resolution เป็นที่ยอมรับได้ และใช้เวลาในการวิเคราะห์ประมาณ 6 นาที จึงยอมรับคอลัมน์ชนิดนี้มาใช้ในการแยกสารเคอร์คูมินอยด์จากขมิ้นได้



รูปที่ 8 แสดงลักษณะโครมาโตแกรมที่แยกสารเคอร์คูมินอยด์ด้วยคอลัมน์

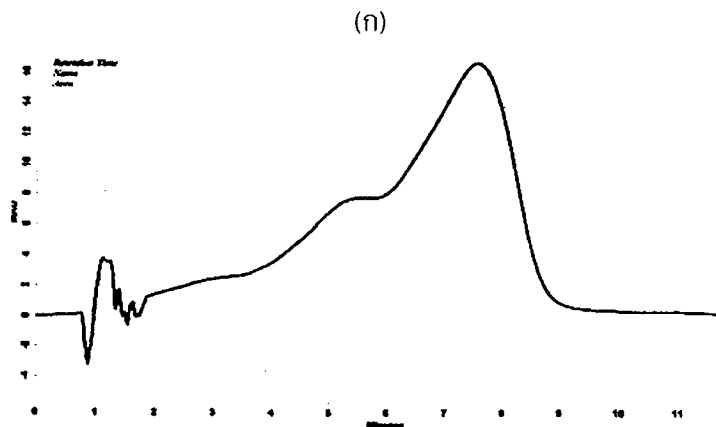
(ก) Chromolith RP-18 ขนาด 4.60×25 mm

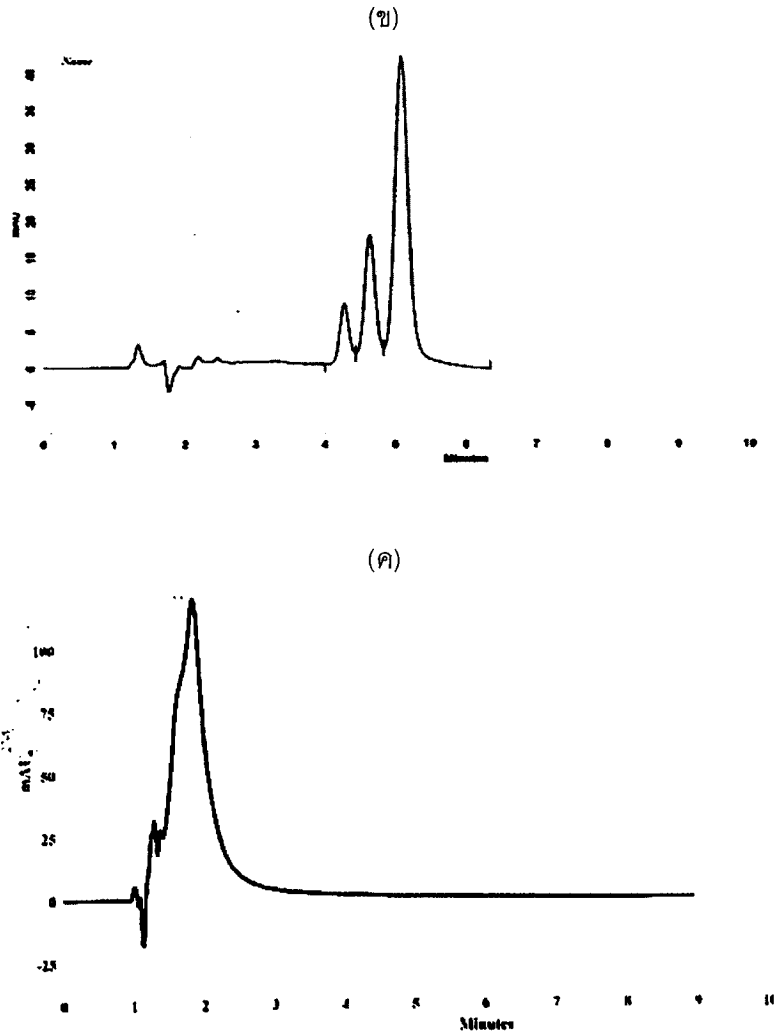
(ข) Hypersil ODS-3 ขนาด 4.60×150 mm

(ค) Inertsil ODS-3 ขนาด 4.60×150 mm

4.4.3 การศึกษาอัตราการไหล (flow rate) ที่เหมาะสม

จากการศึกษาอัตราการไหลของระบบที่อัตราการไหลต่างๆ คือ 0.5, 1.0 และ 1.5 mL/min ตามลำดับ ใช้วัฏภาคเคลื่อนที่ของระบบที่ 4 คือ 2% acetic acid กับ acetonitrile ด้วยระบบ gradient elution โดยใช้คอลัมน์ Inertsil ODS-3 ขนาด 4.60×150 mm มาใช้แยกสารละลายมาตรฐานผสม เคอร์คูมินอยด์ที่มีความเข้มข้นของสารละลายผสมเท่ากับ 20 mg/L จากการทดลองพบว่า เมื่อลดอัตราการไหลของวัฏภาคเคลื่อนที่ที่เป็น 0.5 mL/min ปรากฏว่าสารทั้ง 3 ชนิดของเคอร์คูมินอยด์ไม่สามารถแยกออกจากกันได้ เมื่อเพิ่มอัตราการไหลของวัฏภาคเคลื่อนที่ที่เป็น 1.0 mL/min ได้พีคของ BDMC, DMC และ C แยกออกจากกันได้ดี แต่เมื่อเพิ่มอัตราการไหลของวัฏภาคเคลื่อนที่ที่เป็น 1.5 mL/min นั้นทำให้สารที่ต้องการแยกออกเร็วขึ้นและไม่สามารถแยกพีคของ BDMC, DMC และ C ได้จึงเลือกอัตราการไหลของวัฏภาคเคลื่อนที่เท่ากับ 1.0 mL/min ให้ผลการทดลองที่เหมาะสมที่สุด โครมาโตแกรมแสดงในรูปที่ 9 (ข)





รูปที่ 9 แสดงลักษณะโครมาโตแกรมที่แยกสารมาตรฐานเคอร์คูมินอยด์ด้วยอัตราการไหล (ก) 0.5 mL/min, (ข) 1.0 mL/min และ (ค) 1.5 mL/min

4.5 ผลการวิเคราะห์โดยวิธีโครมาโตกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง (HPLC) สำหรับวิเคราะห์ปริมาณ curcuminoids ในตัวอย่างพืชสมุนไพรขมิ้นและตัวอย่างครีม

ในการทดลองวิเคราะห์ปริมาณเคอร์คูมินอยด์จากขมิ้นด้วยเทคนิค HPLC จากการศึกษได้สภาวะที่เหมาะสมที่สุดในการวิเคราะห์ดังนี้

ชนิดคอลัมน์: HPLC Packed Column Inertsil ODS-3 ขนาด 4.60×150 mm

(GL Sciences Inc. Japan)

วัฏภาคเคลื่อนที่: ระบบ gradient elution (A) acetonitrile และ (B) 2% acetic acid ดังนี้

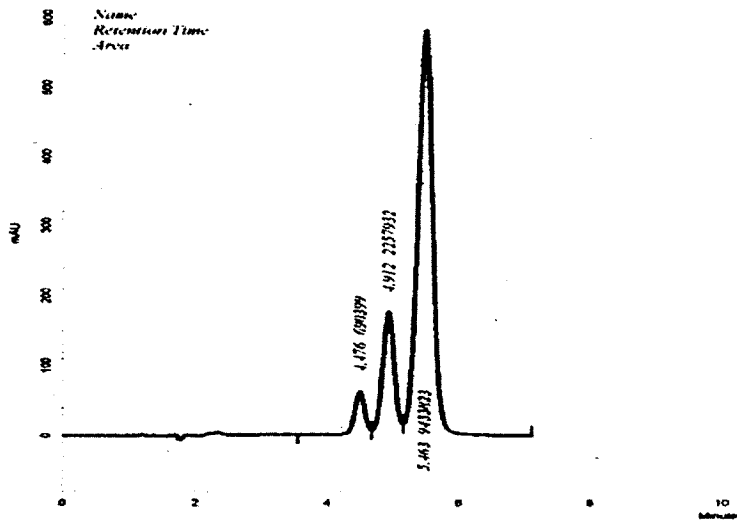
เวลา (นาที)	%B	%A
0.01	40	60
10.00	20	80
12.00	40	60

เวลาที่ใช้ทั้งหมด : 12 นาที

อัตราเร็ว : 1 มิลลิลิตรต่อนาที

ปริมาตรของสารที่ฉีด : 10 ไมโครลิตร

ตรวจวัดที่ความยาวคลื่น : 425 นาโนเมตร



รูปที่ 10 แสดงลักษณะโครมาโตแกรมกราฟมาตรฐานเคอร์คูมินอยด์ ที่ความเข้มข้น 20 mg/L

ตารางที่ 5 แสดงชนิดของสารมาตรฐานเคอร์คูมินอยด์และ Retention time

ชนิดของสารมาตรฐาน	Retention time (min)
Bisdemethoxycurcumin (BDMC)	4.47
Demethoxycurcumin (DMC)	4.91
Curcumin (C)	5.46

จากโครมาโตแกรม รูปที่ 14 ของสารมาตรฐานเคอร์คูมินอยด์มีองค์ประกอบจำนวน 3 ชนิด ได้แก่ bisdemethoxycurcumin มี retention time เท่ากับ 4.47 นาที, demethoxycurcumin มี retention time เท่ากับ 4.91 นาที และ curcumin มี retention time เท่ากับ 5.46 นาที ตามลำดับ

4.6 ผลการศึกษาความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์ (Validation method)

4.6.1 ผลการศึกษาขีดจำกัดต่ำสุดของการตรวจวัด (Limit of detection)

จากการศึกษาขีดจำกัดต่ำสุดของการตรวจวัด (Limit of detection) เพื่อดู sensitivity ของวิธีวิเคราะห์ปริมาณ bisdemethoxycurcumin (BDMC), demethoxycurcumin (DMC) และ curcumin (C) โดยการคำนวณจากกราฟมาตรฐาน (standard curve) ที่ทำการฉีดสารละลายมาตรฐานที่เตรียมขึ้นภายในวันเดียวและระหว่างวันของสารละลายมาตรฐาน โดยคำนวณจากสมการ $3S.D/s$ เมื่อ S.D คือค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานที่คำนวณได้จากพื้นที่ใต้พีคของ bisdemethoxycurcumin (BDMC), demethoxycurcumin (DMC) และ curcumin (C) ตามลำดับ ส่วน s คือ ค่าความชันที่ได้จากกราฟที่แสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นกับพื้นที่ใต้พีคที่วิเคราะห์ได้ พบว่ามีค่าขีดจำกัดต่ำสุดที่สามารถตรวจวัดได้ที่ความเข้มข้นเท่ากับ 0.10 mg/L ของ bisdemethoxycurcumin, 0.14 mg/L ของ demethoxycurcumin และ 0.15 mg/L ของ curcumin ตามลำดับ

4.6.2 ผลการศึกษาขีดจำกัดของการวิเคราะห์ปริมาณ (limit of quantitation)

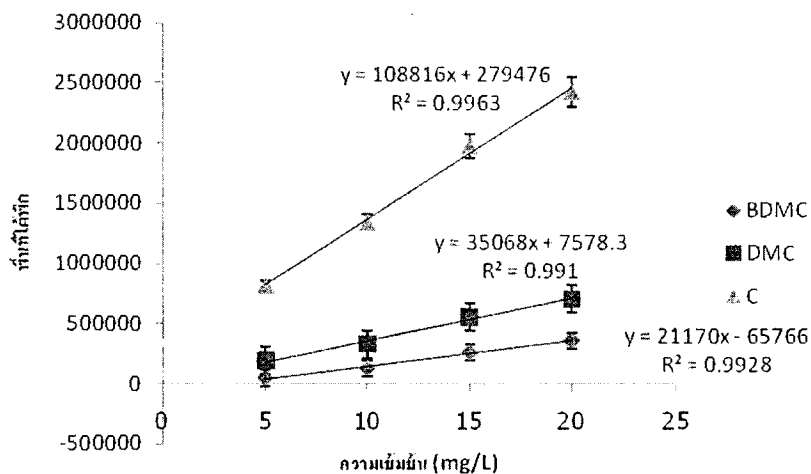
จากการศึกษาขีดจำกัดต่ำสุดของการวิเคราะห์ปริมาณ (limit of quantitation) เพื่อดูขีดต่ำสุดที่สามารถหาปริมาณได้ของวิธีวิเคราะห์ปริมาณ bisdemethoxycurcumin (BDMC), demethoxycurcumin (DMC) และ curcumin (C) โดยการคำนวณจากกราฟมาตรฐาน (standard curve) ที่ทำการฉีดสารละลายมาตรฐานที่เตรียมขึ้นภายในวันเดียวและระหว่างวันของสารละลายมาตรฐาน โดยคำนวณจากสมการ $10S.D/s$ เมื่อ S.D คือค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานที่คำนวณได้จากพื้นที่ใต้พีคของ bisdemethoxycurcumin (BDMC), demethoxycurcumin (DMC) และ curcumin (C) ตามลำดับ ส่วน s คือ ค่าความชันที่ได้จากกราฟที่แสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นกับพื้นที่ใต้พีคที่วิเคราะห์ได้ พบว่ามีค่าขีดต่ำสุดที่สามารถวิเคราะห์ได้ที่ความเข้มข้นเท่ากับ 0.32 mg/L ของ bisdemethoxycurcumin, 0.49 mg/L ของ demethoxycurcumin และ 0.51 mg/L ของ curcumin ตามลำดับ

4.6.3 ผลการศึกษาช่วงความเป็นเส้นตรง (linearity)

จากการศึกษา linearity ของกราฟมาตรฐาน (standard curve) เมื่อตรวจวัดปริมาณสารละลายมาตรฐานเคอร์คูมินอยด์ในช่วงความเข้มข้นระหว่าง 5-20 mg/L ที่ได้จากการทดลองทั้ง 2 วันพบว่าค่า R^2 ของทั้ง 2 วันมีค่ามากกว่า 0.99 และมีความคงตัวของเส้นกราฟทั้ง 2 วันสูงโดยดูจากค่า slope และค่า R^2

ตารางที่ 6 แสดงความสัมพันธ์ระหว่างพื้นที่ใต้พีคกับความเข้มข้นของ bisdemethoxycurcumin, demethoxycurcumin และ curcumin วันที่ 1

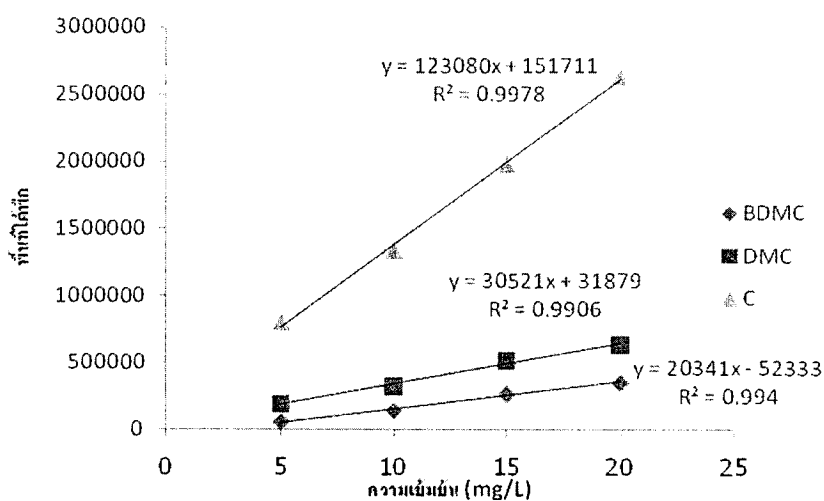
ความเข้มข้น (mg/L)	พื้นที่เฉลี่ย (average)		
	BDMC	DMC	C
5	48167	193686	819932
10	129529	330967	1342402
15	260321	555880	1973068
20	357395	703181	2423313



รูปที่ 11 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างพื้นที่ใต้พีคกับความเข้มข้นของสารมาตรฐานทั้ง 3 คือ bisdemethoxycurcumin, demethoxycurcumin, curcumin วันที่ 1

ตารางที่ 7 แสดงความสัมพันธ์ระหว่างพื้นที่ใต้พีคกับความเข้มข้นของ bisdemethoxycurcumin, demethoxycurcumin, curcumin วันที่ 2

ความเข้มข้น (mg/L)	พื้นที่เฉลี่ย (average)		
	BDMC	DMC	C
5	52923	188686	802636
10	139597	318301	1338322
15	265080	514640	1979721
20	350109	631917	2640175



รูปที่ 12 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างพื้นที่ใต้พีคกับความเข้มข้นของ bisdemethoxycurcumin, demethoxycurcumin, curcumin วันที่ 2

ตารางที่ 8 แสดงผลการศึกษาความคงตัวของ standard curve ที่ได้จากการทดลองทั้ง 2 วัน

Day	Standard	Slope	Intercept	R-square
Day 1	BDMC	108816	279476	0.9963
	DMC	35068	7578.3	0.9910
	C	21170	67566	0.9928
Day 2	BDMC	123080	151711	0.9978
	DMC	30521	31879	0.9906
	C	20341	52333	0.9940

การศึกษา linearity ของ standard curve ที่ได้จากการทดลองทั้ง 2 วัน พบว่า ค่า R-square ของทั้ง 2 วัน มีค่ามากกว่า 0.99 ดังแสดงในตารางที่ 7 และมีความคงตัวของเส้นกราฟทั้ง 2 วันสูง

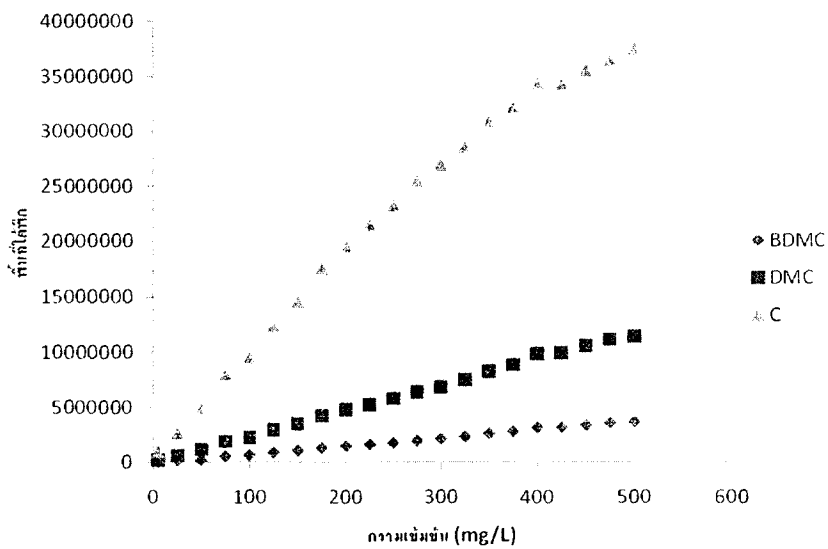
4.6.4 ผลการศึกษาช่วงความเป็นเส้นตรง (Range)

จากการศึกษา range ในช่วงความเข้มข้นของสารมาตรฐานที่สูงกว่า standard curve โดยเปลี่ยนแปลงความเข้มข้นตั้งแต่ 5 mg/L ถึง 500 mg/L แล้วดูความเป็นเส้นตรง ได้ข้อมูลดังตารางที่ 9 ได้กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างพื้นที่ใต้พีคกับความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐาน เคอร์คูมินอยด์ จะได้กราฟของ bisdemethoxycurcumin, demethoxycurcumin และ curcumin ดังรูปที่ 13

ตารางที่ 9 แสดงความสัมพันธ์ระหว่างพื้นที่ใต้พีคกับความเข้มข้นของ bisdemethoxycurcumin, demethoxycurcumin และ curcumin

ความเข้มข้น (mg/L)	พื้นที่ใต้พีค (Peak area)		
	BDMC	DMC	C
5	63442	218075	939175
25	186995	628212	2637037
50	247550	1189444	4969825
75	592384	1910381	7973452

100	702695	2265840	9458084
125	928078	2964584	12324613
150	1101719	3511086	14545687
175	1339507	4254742	17527087
200	1513556	4775305	19551067
225	1669825	5264267	21500840
250	1817321	5767645	23241620
275	2017005	6395505	25448589
300	2173394	6864871	26913174
325	2381371	7522291	28575460
350	2666715	8282971	30879677
375	2853539	8878258	32202886
400	3177436	9853481	34312476
425	3201399	9929104	34298083
450	3415499	10562019	35548921
475	3624726	11164264	36453129
500	3720442	11422823	37467714



รูปที่ 13 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างพื้นที่ใต้พีคกับความเข้มข้นของ bisdemethoxycurcumin, demethoxycurcumin และ curcumin

นั่นคือพื้นที่ใต้พีคมีความสัมพันธ์เป็นเส้นตรงกับความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐานเคอร์คูมินอยด์ในช่วงความเข้มข้น 5-200 mg/L

4.6.5 ผลการศึกษาความแม่นยำ (Precision)

การศึกษาความแม่นยำของวิธีวิเคราะห์โดยศึกษา repeatability และ reproductability คำนวณหาค่า % RSD ของผลการทดลอง ได้ % RSD ไม่เกิน $\pm 5\%$ จะอยู่ในช่วงที่ยอมรับได้ ดังรายละเอียดผลการทดลองในตารางที่ 10

ตารางที่ 10 แสดงค่าความแม่นยำของวิธีวิเคราะห์

ความ เข้มข้น (mg/L)	Repeatability (% R.S.D)			Reproductability (% 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

ดังนั้นผลการศึกษาความแม่นยำ โดยการนำข้อมูลเบื้องต้นมาแปลผลทางสถิติ แล้วได้ค่า % RSD ตามตารางที่ 10 ซึ่งมีค่า % RSD ไม่เกิน $\pm 5\%$ ซึ่งยอมรับได้

4.6.6 ผลการศึกษาความถูกต้อง (Accuracy)

การศึกษาความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์โดยการหา % recovery ดังรายละเอียดผลการทดลองในตารางที่ 11 และ 12

ตารางที่ 11 ตารางแสดงค่า % recovery ของการศึกษา accuracy ของตัวอย่างไขมันหลายชนิด

สมการเส้นตรงของ bisdemethoxycurcumin คือ $y = 111435x - 13280$

สมการเส้นตรงของ demethoxycurcumin คือ $y = 382988x + 47026$

สมการเส้นตรงของ curcumin คือ $y = 200000+06x + 21127$

ตัวอย่าง	สารสำคัญ	% recovery
A1	bisdemethoxycurcumin,	98.49
	demethoxycurcumin,	102.19
	curcumin	96.57
A2	bisdemethoxycurcumin,	101.46
	demethoxycurcumin,	97.11
	curcumin	97.19
A3	bisdemethoxycurcumin,	97.75
	demethoxycurcumin,	95.06
	curcumin	97.71
A4	bisdemethoxycurcumin,	98.88
	demethoxycurcumin,	95.80
	curcumin	95.68
A5	bisdemethoxycurcumin,	97.22
	demethoxycurcumin,	96.84
	curcumin	96.83

ตารางที่ 12 ตารางแสดงค่า % recovery ของการศึกษา accuracy ของตัวอย่างครีมบำรุงผิว

ตัวอย่าง	สารสำคัญ	% recovery
C1	bisdemethoxycurcumin,	97.04
	demethoxycurcumin,	96.73
	curcumin	95.95
C2	bisdemethoxycurcumin,	96.01
	demethoxycurcumin,	97.66
	curcumin	99.73

จากผลการทดลองทั้งตัวอย่างพืชและครีมโดยการเติมสารมาตรฐานลงไปในตัวอย่างไม่ความเข้มข้น 5, 10 และ 15 mg/L ตามลำดับ เมื่อทำการวิเคราะห์แล้วนำค่าได้พีค มาทำการแปลผลทางสถิติ โดยการหาค่า % recovery ได้ไม่เกิน $\pm 5\%$ จึงจะยอมรับได้ จากตารางที่ 12 ค่า % recovery ของแต่ตัวอย่างที่วิเคราะห์ได้มี % recovery ไม่เกิน $\pm 5\%$ ดังนั้น วิธีนี้จึงยอมรับได้

ตารางที่ 13 แสดงค่าการวิเคราะห์หาปริมาณเคอร์คูมินอยด์ของสารสกัดจากขมิ้นชนิดต่างๆ และเครื่องสำอางที่มีส่วนผสมของขมิ้นด้วยเทคนิค HPLC ที่พัฒนาขึ้น

ตัวอย่าง	สารสำคัญ	ปริมาณสารสำคัญ	
		mg/L	mg/g
A1	bisdemethoxycurcumin,	18.27	0.18
	demethoxycurcumin,	5.23	0.05
	curcumin	20.61	0.20
A2	bisdemethoxycurcumin,	16.14	0.16
	demethoxycurcumin,	3.91	0.04
	curcumin	98.85	0.89
A3	bisdemethoxycurcumin,	23.71	0.23
	demethoxycurcumin,	7.88	0.08
	curcumin	132.07	1.32
A4	bisdemethoxycurcumin,	31.33	0.31
	demethoxycurcumin,	8.78	0.09
	curcumin	174.53	1.74
A5	bisdemethoxycurcumin,	22.05	0.22
	demethoxycurcumin,	6.31	0.06
	curcumin	122.82	1.22
C1	bisdemethoxycurcumin,	1.66	0.016
	demethoxycurcumin,	1.18	0.011
	curcumin	9.21	0.092
C2	bisdemethoxycurcumin,	0.44	0.004
	demethoxycurcumin,	0.12	0.001
	curcumin	2.37	0.023

4.7 การวิเคราะห์หาองค์ประกอบที่สำคัญของสารสกัดจากขมิ้น โดยเทคนิค TLC

จากการศึกษาได้สถานะในการวิเคราะห์ดังนี้

วิธีการ : ทิศทางเดียว ในแนวขึ้น

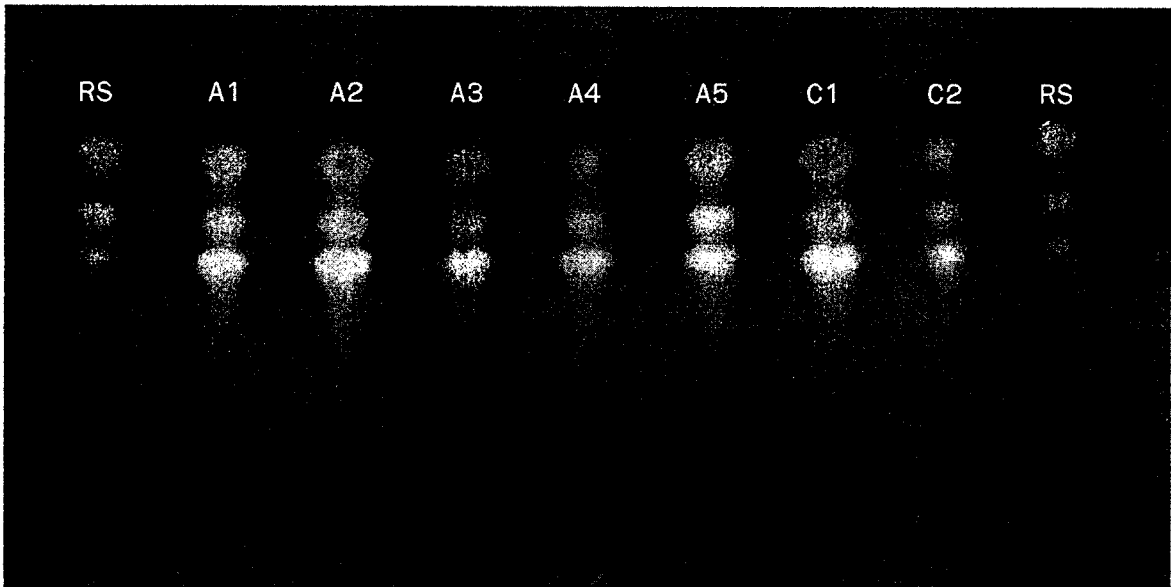
ตัวดูดซับ: ซิลิกาเจล 60 เอฟ 254 บนแผ่นอลูมิเนียม (Merck, Germany)

ขนาดแผ่น: 20×13 เซนติเมตร

ความหนาของชั้นตัวดูดซับ : 0.25 มิลลิเมตร

ระบบตัวทำละลาย : benzene: chloroform: ethanol (49:49:2, v/v/v)

การตรวจวัดหาบนแผ่น TLC: UV-365 nm



รูปที่ 14 แสดง TLC chromatogram โดยใช้ระบบตัวทำละลายเป็น benzene: chloroform: ethanol (49:49:2) ตรวจหาที่ความยาวคลื่น 365 nm

จากการทดลองได้เลือกสถานะในการวิเคราะห์ TLC chromatogram fingerprint ของตัวอย่างพืชและครีมทั้ง 5 ชนิด โดยใช้วิธีโครมาโตกราฟีผิวบาง (TLC) พบว่า สารสกัดพืชในตระกูลขมิ้นและครีมมี curcuminoids เป็นองค์ประกอบ ซึ่งเปรียบเทียบกับสารมาตรฐานเคอร์คูมินอยด์มีค่า R_f ดังตารางที่ 14 ในสารมาตรฐานจะประกอบไปด้วยสารสำคัญอยู่ 3 ตัว คือ bisdemethoxycurcumin, demethoxycurcumin และ curcumin โดยสารทั้ง 3 ตัวนี้จะแยกออกจากกันและมีสีเหลืองเมื่อสังเกต

ด้วยตาเปล่าจากแถบที่แยกได้บนแผ่น TLC หลังจากตรวจสอบที่ความยาวคลื่น 365 nm ซึ่งได้แสดงค่า ดังตารางที่ 15

ตารางที่ 14 แสดงค่า R_f ของสารละลายมาตรฐานเคอร์คูมินอยด์ที่ความเข้มข้น 20 mg/L บนแผ่น TLC

สารมาตรฐาน	ค่า R_f	การตรวจสอบด้วย UV-365
bisdemethoxycurcumin	0.06	เหลือง
demethoxycurcumin	0.16	เหลือง
curcumin	0.34	เหลืองเข้ม

ตารางที่ 15 แสดงค่า R_f ขององค์ประกอบของสารสกัดพืชในตระกูลขมิ้นและครีมบนแผ่น TLC

แถบที่/ตัวอย่าง	ค่า R_f	การตรวจสอบด้วย UV-365 nm
1/Std.	0.34	เหลือง
2/A1	0.87	ส้ม
3/A2	0.88	ส้ม
4/A3	0.86	ส้ม
5/A4	0.62	ส้ม
6/A5	0.61	ส้ม
7/C1	0.63	เหลืองอ่อน
8/C2	0.65	เหลืองอ่อน
9/Std.	0.34	เหลือง

บทที่ 5

สรุปผลการทดลอง วิเคราะห์ และข้อเสนอแนะ

จากการศึกษาการเตรียมขม้นทั้ง 5 ตัวอย่างและทำการสกัดสารสำคัญจากเหง้า ได้ตั้งรหัสขึ้น แสดงดังตารางที่ 1 แสดงลักษณะและชนิดของขม้นทั้ง 5 ตัวอย่างดังรูปที่ 1 และผลของการสกัด สารสำคัญจากตัวอย่างขม้นด้วยทำละลายที่เหมาะสมโดยวิธี soxhlet extraction และได้หาค่า % yield ของขม้นทั้ง 5 ตัวอย่างพบว่ามีความเท่ากับ 0.55, 0.57, 1.04, 0.96 และ 0.60 ของ A1, A2, A3, A4 และ A5 ตามลำดับ

จากการศึกษาหาความยาวคลื่นที่เหมาะสมของการดูดกลืนแสงสูงสุดด้วยเทคนิคทาง UV-visible spectrophotometry สำหรับวิเคราะห์ปริมาณเคอร์คูมินอยด์ (curcuminoids) พบว่ามีความยาว คลื่นของการดูดกลืนแสงสูงสุดที่ 425 นาโนเมตร

จากการศึกษาการวิเคราะห์โดยวิธีโครมาโตกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง (HPLC) ได้สภาวะที่ เหมาะสม ได้ลักษณะโครมาโตแกรมกราฟมาตรฐานเคอร์คูมินอยด์และมีค่า retention time ของ สารละลายมาตรฐานเท่ากับ 4.47, 4.91 และ 5.46 นาที ของสารละลาย bisdemethoxycurcumin, demethoxycurcumin และ curcumin ตามลำดับ การศึกษาการหาค่า limit of detection และ limit of quantitative พบว่าขีดต่ำสุดที่สามารถตรวจวัดได้ที่ความเข้มข้นที่ 0.10 mg/L ของ bisdemethoxycurcumin 0.14 mg/L ของ demethoxycurcumin และ 0.15 mg/L ของ curcumin ตามลำดับ และขีดต่ำสุดที่สามารถวิเคราะห์หาปริมาณได้ที่ความเข้มข้นที่ 0.32 mg/L ของ bisdemethoxycurcumin, 0.49 mg/L ของ demethoxycurcumin และ 0.50 mg/L ของ curcumin ตามลำดับ

จากการศึกษา linearity ของ standard curve ที่ได้จากการทดลองทั้ง 2 วันพบว่าค่า R-square ของทั้ง 2 วันมีค่า 0.999 และมีความคงตัวของเส้นกราฟทั้ง 2 วันสูงโดยดูจากค่า slope และ ค่า R-square และค่าของ standard curve ที่ได้จากการทดลองมีความเป็นเส้นตรงสูง จากการศึกษา ความแม่นยำ (precision) ได้ % RSD ไม่เกิน 5% ซึ่งเป็นที่ยอมรับได้ จากการศึกษาความถูกต้อง (accuracy) ได้แสดงค่า % recovery ของตัวอย่างครีมบำรุงผิว เมื่อทำการวิเคราะห์แล้วนำค่าได้พีค มา ทำการแปลผลทางสถิติโดยการหาค่า % recovery ได้ไม่เกิน $\pm 5\%$ จึงจะยอมรับได้ จากตารางที่ 12 ค่าของ % recovery ของแต่ตัวอย่างที่วิเคราะห์ได้มี % recovery ไม่เกิน $\pm 5\%$ ดังนั้น วิธีนี้จึงยอมรับได้

การวิเคราะห์หาปริมาณเคอร์คูมินอยด์ของสารสกัดจากขมิ้นชนิดต่างๆ และเครื่องสำอางที่มีส่วนผสมของขมิ้นด้วยเทคนิค HPLC ที่พัฒนาขึ้นวิธีนี้สามารถหาปริมาณสารสำคัญได้

จากการวิเคราะห์หาองค์ประกอบที่สำคัญจากสารสกัดจากขมิ้นโดยเทคนิค TLC ได้แสดง TLC chromatogram โดยใช้ระบบตัวทำละลายเป็น benzene:chloroform:ethanol (49:49:2) ตรวจสอบที่ความยาวคลื่น 365 nm และเมื่อนำมาคำนวณหาค่า R_f ของสารละลายมาตรฐาน เคอร์คูมินอยด์ และค่า R_f ขององค์ประกอบของสารสกัดพืชในตระกูลขมิ้นและครีมบนแผ่น TLC พบว่ามีค่า R_f ของ bisdemethoxycurcumin, demethoxycurcumin และ curcumin เท่ากับ 0.06, 0.16 และ 0.34 ตามลำดับ

ดังนั้นการพัฒนาเทคนิคทางโครมาโตกราฟีสำหรับวิเคราะห์หาปริมาณเคอร์คูมินอยด์สามารถหาปริมาณสารสำคัญได้อย่างถูกต้อง แม่นยำและรวดเร็ว ซึ่งวิธีการนี้สามารถนำไปใช้ตรวจสอบและวิเคราะห์หาปริมาณเคอร์คูมินอยด์ในผลิตภัณฑ์เครื่องสำอางและพืชสมุนไพรได้

เอกสารอ้างอิง

1. นันทวัน บุญยะประภัสร์ และ อรนุช โชคชัยเจริญพร. 2544. *สมุนไพร..ไม้พื้นบ้าน* เล่ม 4: 315-349.
2. Veayudhan, K. C. Muralidharan, V. K. and Amalaraj, V. A. 1990. *J. Econ. Tax. Bot.*, 14: 579-582
3. นันทวัน บุญยะประภัสร์ และ อรนุช โชคชัยเจริญพร. 2539. *สมุนไพร..ไม้พื้นบ้าน* เล่ม 1: 366-399.
4. มาตรฐานสมุนไพรไทย *สมุนไพรชั้น*. 2544. สถาบันวิจัยสมุนไพร กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข. โรงพิมพ์ ร.ส.พ., กรุงเทพฯ. 28
5. วิทย์ เทียงบูรณธรรม. 2531. *พจนานุกรม สมุนไพรไทย*. โอ.เอส.พรินติ้ง เฮ้าส์., กรุงเทพฯ. 9091.
6. กรมการแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข. 2542. การตรวจเอกลักษณ์พืชสมุนไพร ภาคพิเศษ คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่. โรงพิมพ์องค์การส่งเสริมการค้าระหว่างประเทศ, กรุงเทพฯ.
7. กิตติพันธ์ ดันตระรุ่งโรจน์ และคณะ. 2529. เภสัชกรรมเทคโนโลยีและโครมาโตกราฟี. คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่. 301-326.
8. กฤษณา ภูตะคาม และ วิริยา คณารักษ์. 2546. น้ำมันหอมระเหย. คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่. 25-26.
9. 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.
10. Elise Portes, Christian Gardrat and Alain Castellan. (2007). A comparative study on the antioxidant properties of tetrahydrocurcuminoids and curcuminoids. *Tetrahedron* 63 (37), 9092-9099.
11. McGuffin M., Hobbs C. and Upton R. (1997). American Herbal Products Association's Botanical Safety Handbook. CRC Press. Boca Raton. 177-179.

12. 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.
13. Govindarajan V. S. (1980). Turmeric–chemistry, technology, and quality. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* 12, 199–301.
14. 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.
15. Naczk M. and Shahidi F. (2004). Extraction and analysis of phenolic in food. *Journal of Chromatography A* 1054, 95–111.
16. J.S. Zhang, J. Guan, F.Q. Yang, H.G. Liu, X.J. Cheng and S.P. Li, (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.
17. B.K. Jadhav, K.R. Mahadik and A.R. Paradkar (2007). Development and validation of improved reversed phase–HPLC method for simultaneous determination of curcumin, demethoxycurcumin, and bisdemethoxycurcumin, *Chromatographia* 65, 483–488.
18. 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.
19. N.Y. Qin, F.Q. Yang, Y.T. Wang and S.P. Li, (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.
20. E.M.B. Mara, R.M.M. Silvania and A.M. Angela (2006). Effects of supercritical fluid extraction on *Curcuma longa* L. and *Zingiber officinale* R. starches, *Carbohydrate Polymers* 63, 340–346.
21. Joseph Sherma (2000). Thin–layer chromatography in food and agricultural analysis. *Journal of Chromatography A* 880 (1–2), 129–147
22. Xin Zhoua, Zhangwan Li, Guangyi Liang, Jin Zhub, 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.
23. 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.
24. Jin Hwan Lee and Myoung–Gun Choung. (2011). Determination of curcuminoid colouring principles in commercial foods by HPLC. *Food Chemistry* 124 (3), 1217–1222.
25. 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.
26. Xiuhua Sun, Xiurong Yang and Erkang Wang, (2005). Chromatographic and electrophoretic procedures for analyzing plant pigments of pharmacologically interests. *Analytica Chimica Acta* 547(2), 153–157.
27. 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.
28. Osawa T., Sugiyama Y., Inayoshi M. and Kawakishi S. (1995). Antioxidative activity of tetrahydro–curcuminoids. *Bioscience Biotechnology and Biochemistry* 59, 1609–1612.
29. 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.
30. 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, 1039–1044.
31. 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.

32. 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 J. Exp. Biol.* 17, 1363–1366.
33. Chosdu R., Erizal I.T. and Hilmy N. (1995). The effect of gamma irradiation on curcumin component of *Curcuma domestica*. *Radiat. Phys. Chem.* 46, 663– 667.

ประวัติผู้วิจัย

1. ผู้สมัครขอรับทุน (ชื่อ-สกุล ภาษาไทย) ดร. วิษณุ ธงไชย
(ชื่อ-สกุล ภาษาอังกฤษ) Dr. WISANU THONGCHAI
เพศ ชาย อายุ 35 ปี

2. หมายเลขบัตรประจำตัวประชาชน
36507 00158 25 1

3. ตำแหน่งปัจจุบัน
ตำแหน่งปัจจุบัน อาจารย์ (ประธานสาขาวิชาเคมี)

4. หน่วยงานและสถานที่ติดต่อได้สะดวก
สาขาวิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏพิบูลสงคราม
จังหวัด พิษณุโลก รหัสไปรษณีย์ 65000
โทรศัพท์ 08-6659-0729 โทรสาร 0-5526-7106
E-mail: wisanuthongchai@hotmail.com, wisanuthongchai@gmail.com
ที่อยู่ (ที่บ้าน)
777/356 หมู่ 9 ตำบลอรุณภูมิ อำเภอเมืองพิษณุโลก
จังหวัดพิษณุโลก รหัสไปรษณีย์ 65000
โทรศัพท์ 08-6659-0729 โทรสาร -
E-mail: wisanuthongchai@hotmail.com, wisanuthongchai@gmail.com

5. ประวัติการศึกษา

5.1 ปริญญาตรี สาขาวิชา เคมี คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี
มหาวิทยาลัยราชภัฏพิบูลสงคราม
ปีที่สำเร็จ พ.ศ. 2542

5.2 ปริญญาโท สาขาวิชา วิทยาศาสตร์เภสัชกรรม คณะเภสัชศาสตร์
มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
ปีที่สำเร็จ พ.ศ. 2548
หัวข้อวิทยานิพนธ์ที่ทำ

Development of High Performance Liquid Chromatographic Method for the
Determination of Arbutin in Creams and Medicinal Plant Extracts

5.3 ปริญญาเอก สาขาวิชา เกษศาสตร์

คณะเภสัชศาสตร์

มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

ปีที่สำเร็จ พ.ศ. 2553

หัวข้อวิทยานิพนธ์ที่ทำ (ทุนโครงการปริญญาเอกกาญจนาภิเษก)

Development of Flow Injection Analysis Methods for the Determination of Bioactive Compounds from Thai Medicinal Plants and Drug Residue

6. สาขาวิชาการที่มีความเชี่ยวชาญพิเศษ

- Medicinal plant and pharmaceutical analysis
- Flow injection techniques เช่น Flow injection analysis, microflow injection analysis, sequential injection analysis
- Microfluidic system and Lab on a chip

7. งานวิจัยที่ได้รับทุน (หัวหน้าโครงการ)

1. ทุนสนับสนุนการวิจัยจากงบประมาณแผ่นดินของมหาวิทยาลัยราชภัฏพิบูลสงคราม ประจำปีงบประมาณ พ.ศ. 2554 เรื่อง เทคนิคทางโครมาโทกราฟีในการควบคุมคุณภาพและการวิเคราะห์สารเคอร์คูมินอยด์ในวัตถุดิบและผลิตภัณฑ์เครื่องสำอางจากพืชในสกุลเคอร์คูมา
2. ทุนงบประมาณเครือข่ายการวิจัยภาคเหนือตอนล่าง ประจำปีงบประมาณ พ.ศ. 2554 เรื่อง การเตรียมและวิเคราะห์ทางเคมีของน้ำมันข้าวโพดเพื่อพัฒนาเป็นผลิตภัณฑ์เสริมสุขภาพและเครื่องสำอาง
3. ทุนสนับสนุนการวิจัยจากงบประมาณแผ่นดินของมหาวิทยาลัยราชภัฏพิบูลสงคราม ประจำปีงบประมาณ พ.ศ. 2554 เรื่อง การพัฒนาวิธีสกัดและวิเคราะห์สารออกฤทธิ์ทางชีวภาพจากลำไยสำหรับใช้ทางการแพทย์และเครื่องสำอางด้วยเทคนิคไมเลกุลาร์อิมพรีนเต็ดโพลีเมอร์ร่วมกับแผลปอโนอะซิฟ
4. ทุนสำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ ประจำปีงบประมาณ พ.ศ. 2554 เรื่อง การประยุกต์ใช้น้ำมันจากผลอะโวคาโดและพัฒนาเป็นผลิตภัณฑ์เสริมอาหารและเครื่องสำอางนาโนพาร์ติเคิลเพื่อพัฒนาสู่ชุมชน

7. ผลงานวิจัย

1. W. Thongchai, B. Liawruangrath, C. Thongpoon and T. Machan, High performance thin layer chromatographic method for the determination of diclofenac sodium in pharmaceutical formulations, *Chiang Mai J. Sci.* 2006; **33** (1), 123–128. มี Impact factor 0.0

2. **W. Thongchai**, B. Liawruangrath and S. Liawruangrath, High performance liquid chromatographic determination of arbutin in skin whitening creams and medicinal plant extracts, *J. Cosmet. Sci.* 2007; **58**, 35–44. มี Impact factor 0.233
3. **W. Thongchai**, B. Liawruangrath and S. Liawruangrath, High performance liquid chromatographic determination of arbutin in skin whitening creams and medicinal plant extracts, *Int. J. Cosmet. Sci.* 2007; **29** (6), 488. มี Impact factor 0.633
4. **W. Thongchai**, B. Liawruangrath and S. Liawruangrath, Arbutin determination in medicinal plants and creams, *Int. J. Cosmet. Sci.* 2009; **31**, 87–96. มี impact factor 0.837
5. **W. Thongchai**, B. Liawruangrath and S. Liawruangrath, Flow injection analysis of total curcuminoids in turmeric and total antioxidant capacity using 2,2'-diphenyl-1-picrylhydrazyl assay, *Food Chemistry* 2009; **112**, 494–499. มี Impact factor 3.146
6. **W. Thongchai**, B. Liawruangrath and S. Liawruangrath, Sequential injection analysis with lab-at-valve (SI-LAV) for the determination of solasodine in *Solanum* species, *Talanta* 2010; **81**, 565–571. มี Impact factor 3.290
7. **W. Thongchai**, B. Liawruangrath, S. Liawruangrath and G.M. Greenway, A microflow chemiluminescence system for the determination of chloramphenicol in honey with preconcentration using a molecularly imprinted polymer, *Talanta* 2010; **82** (2), 560–566. มี Impact factor 3.290
8. **W. Thongchai**, B. Liawruangrath, S. Liawruangrath and S. Saisin, High performance liquid chromatographic determination of solasodine in *solanum* species, *Asian Journal of Science* (2011); Article in press.

8. ผลงานวิชาการอื่นๆ

1. S. Liawruangrath, B. Liawruangrath and **W. Thongchai**, Flow injection analysis of arbutin, *International Conference on Flow Injection Analysis and Related Techniques (ICFIA) 14th*, Berlin, (02/09/2007).
2. **W. Thongchai**, B. Liawruangrath and S. Liawruangrath, Flow injection analysis of total curcuminoids in turmeric extracts, *RSC International Conference on Analytical Research Forum 2008*, University of Hull, United Kingdom, (21–23/06/2008)
3. B. Liawruangrath, S. Liawruangrath and **W. Thongchai**, Determination of heavy metal contents contaminated in herbal drugs, *The Sixth Princess Chulabhorn International Science Congress*, 2007.

4. **W. Thongchai**, B. Liawruangrath and S. Liawruangrath, High-performance liquid chromatographic determination of arbutin in skin whitening creams and medicinal plant extracts, *The Sixth Princess Chulabhorn International Science Congress*, 2007.
5. **W. Thongchai**, B. Liawruangrath, D. Winijkul, S. Natakankikul, C. Thongpoon and T. Machan, Determination of Diclofenac Sodium by High Performance Thin Layer Chromatography, *The 30th Congress on Science and Technology of Thailand*, 2004.
6. B. Liawruangrath, S. Liawruangrath, **W. Thongchai** and T. Machan, Determination of malic Acid and Citric Acid in Ripe Berries of *Eugenia paniaia* Roxb. by High Performance Liquid Chromatography, *The 31st Congress on Science and Technology of Thailand*, 2005.
7. **W. Thongchai**, B. Liawruangrath, C. Chiyasut and P. Leelapornpisid, Determination of Arbutin in Skin-Whitening Cosmetics by High Performance Liquid Chromatography, *The 31st Congress on Science and Technology of Thailand*, 2005.
8. C. Thongpoon, B. Liawruangrath, S. Liawruangrath, T. Marchan and **W. Thongchai**, High Performance Liquid Chromatographic (HPLC) Method for the Determination of Cephalexin, Cefazolin and Cefoxitin, *The 32nd Congress on Science and Technology of Thailand*, 2006.
9. **W. Thongchai**, B. Liawruangrath, S. Liawruangrath, C. Thongpoon, S. Saysin, T. Marchan and C. Raweewan, Determination of Curcuminoid Contents by High Performance Liquid Chromatography, *The 32nd Congress on Science and Technology of Thailand*, 2006.
10. B. Liawruangrath, S. Liawruangrath, **W. Thongchai**, S. Saysin, P. Srisom, J. Chuangbunyat and T. Machan, Determination of Tetracyclin Residues in Milk and Milk Products by High Performance Liquid Chromatography, *The 32nd Congress on Science and Technology of Thailand*, 2006.
11. **W. Thongchai**, B. Liawruangrath, S. Liawruangrath, T. Marchan, S. Saysin, and C. Thongpoon, Determination of High Performance Liquid Chromatographic Method for the Determination of Solasodine, *The 33rd Congress on Science and Technology of Thailand*, 2007.
12. C. Thongpoon, **W. Thongchai** and T. Marchan Spectrophotometric method for the determination of amoxicillin in pharmaceutical formulations, *The 33rd Congress on Science and Technology of Thailand*, 2007.

13. T. Wonganan, S. Liawruangrath, B. Liawruangrath and **W. Thongchai**, Determination of Ascorbic Acid in Orange Juice by Differential Pulse Polarography, *The 34th Congress on Science and Technology of Thailand*, 2008.
14. **W. Thongchai**, B. Liawruangrath and S. Liawruangrath, Flow injection analysis of total curcuminoids in turmeric and total antioxidant capacity using 2,2'-diphenyl-1-picrylhydrazyl assay, *Research for better for better life quality: Symposium on flow based analysis*, 2009.
15. B. Liawruangrath, S. Liawruangrath, **W. Thongchai** and S. Saysin, High Performance Thin Layer Chromatographic Determination of Erythromycin in Pharmaceutical Preparations, *The 35th Congress on Science and Technology of Thailand*, 2009.
16. **W. Thongchai**, B. Liawruangrath and S. Liawruangrath, Determination of Chloramphenicol Residue in Honey and Milk Samples based on Molecularly Imprinted Polymer, *The 35th Congress on Science and Technology of Thailand*, 2009.
17. **W. Thongchai**, B. Liawruangrath, S. Liawruangrath and S. Saysin, High performance liquid chromatographic method for the determination of solasodine in *solanum* species, *PACCON conference*, 2010.
18. **W. Thongchai**, C. Thongpoon, B. Liawruangrath and S. Liawruangrath, LC-MS/MS ON MICROFLUIDIC DEVICE FOR CHLORAMPHENICOL DETERMINATION IN MILK AND HONEY SAMPLES BASED ON MOLECULAR IMPRINTED POLYMERS, ICNST 2012. (Preceeding)