

PSRU

มหาวิทยาลัยราชภัฏวไลยอลงกรณ์

PLU

มหาวิทยาลัยพิษณุโลก

UDRU

มหาวิทยาลัยราชภัฏอุดรธานี

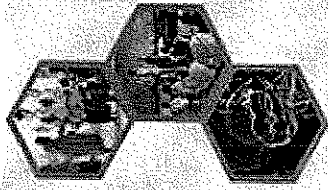
การประชุมวิชาการระดับชาติ “ปัญญาละความวิจัย”

และมีกิจกรรม “การพัฒนาคุณภาพการท่องเที่ยว” จากท้องถิ่นสู่อาเซียน 2557

มหาวิทยาลัยราชภัฏวไลยอลงกรณ์ (ส่วนทะเลแก้ว)

โทรศัพท์ : 0-5526-7000 โทรสาร : 0-5526-7058

www.psu.ac.th



Proceedings รายงานสืบเนื่อง จากการประชุมวิชาการระดับชาติ

การประชุมวิชาการ “ปัญญาละความวิจัย”
และมีกิจกรรม “การพัฒนาคุณภาพการท่องเที่ยว”
จากท้องถิ่นสู่อาเซียน **2557**

19-20 กุมภาพันธ์ 2557
ณ มหาวิทยาลัยราชภัฏวไลยอลงกรณ์ (ส่วนทะเลแก้ว)

O-P22

การวิเคราะห์ปริมาณเคอร์คูมินอยด์ในผลิตภัณฑ์ยาสมุนไพรจากขมิ้นชัน

พิจิตรา วงษ์โท และเฉลิมพร ทองพูน*

คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏพิบูลสงคราม

*Corresponding author, email; cthongpoon@gmail.com

บทคัดย่อ

วัตถุประสงค์ของงานวิจัยนี้ เพื่อพัฒนาเทคนิคยูวี-วิสิเบิล สเปกโตรโฟโตเมตริก สำหรับวิเคราะห์ปริมาณเคอร์คูมินอยด์ในผลิตภัณฑ์ยาสมุนไพร จากขมิ้นชันทั้งในรูปแบบแคปซูลและผง หลักการวิเคราะห์อาศัยการเกิดปฏิกิริยาระหว่างสารสกัดเคอร์คูมินอยด์กับสารละลายโพแทสเซียมไซยาไนด์ เกิดเป็นสารสีแดง ที่สามารถดูดกลืนแสงสูงสุดได้ที่ ความยาวคลื่น 500 นาโนเมตร ในงานวิจัยได้ทำการศึกษาสัดส่วนโมเลกุลที่เหมาะสมในการเกิดปฏิกิริยาก่อน จากนั้นนำสัดส่วนโมเลกุลที่ได้มาใช้ในการวิเคราะห์ปริมาณเคอร์คูมินอยด์ และในงานวิจัยนี้ยังได้ศึกษาปัจจัยที่มีผลต่อการวิเคราะห์อื่นๆเช่น ชนิดตัวทำละลายและเวลาที่ใช้ในการสกัดสารเคอร์คูมินอยด์จากตัวอย่าง เป็นต้น เทคนิคที่พัฒนาขึ้นมีความถูกต้องและมีความแม่นยำ โดยแสดงในรูปของค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ภายในวันเดียวกันและต่างวันกัน เท่ากับ 1.38 และ 1.62เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ กราฟมาตรฐานสำหรับการวิเคราะห์ปริมาณเคอร์คูมินอยด์มีความเป็นเส้นตรงในช่วงความเข้มข้น 0-30 มิลลิกรัมต่อลิตร ($r^2 = 0.9998$) ความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถวิเคราะห์ได้ เท่ากับ 0.0067 มิลลิกรัมต่อลิตร ร้อยละการกลับคืน เท่ากับ 101.31 ปริมาณเคอร์คูมินอยด์ที่ตรวจพบในตัวอย่างผลิตภัณฑ์ยาสมุนไพรที่เก็บภายใน อำเภอเมือง จังหวัดพิษณุโลก มีความแตกต่างกันมากตั้งแต่ 0.68-12.01 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนัก มีเพียงผงขมิ้นชันจำนวน 2 ตัวอย่างที่ไม่ผ่านมาตรฐานตำรามาตรฐานยาสมุนไพรไทย (1995)

คำสำคัญ : เคอร์คูมินอยด์ แคปซูลขมิ้นชัน ผลิตภัณฑ์ยาสมุนไพร ยูวี- วิสิเบิล สเปกโตรโฟโตเมตริก

Determination of curcuminoid in herbal products

Phichitra Wongtho and Chalernporn Thongpoon*

Faculty of Science and Technology Pibulsongkram Rajabhat University

*Corresponding author, email; cthongpoon@gmail.com

Abstract

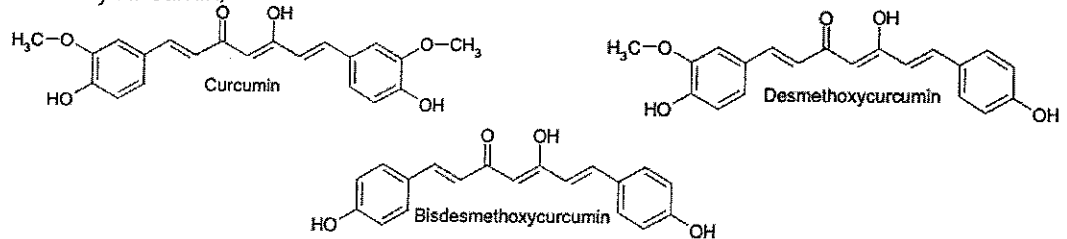
The objective of this research was to develop a UV-Visible spectrophotometric technique for determining curcuminoids in herbal products from both capsules and powders of *Curcuma longa*. This technique based on reaction between curcuminoids extracted and potassium cyanide solution. The red compound was occurred with gave a maximum absorption at 500 nm. In this works, the effects of solvent used and time for extracting curcuminoid were studied. Moreover, the mole fraction of reaction and the mole fraction used in the analysis were also investigated. The recommended method was reproducible and accurate. The relative standard deviation of Intra-day and Inter-day of the method were 1.38% and 1.62%, respectively. Calibration curve was linear over the range 0-30 ppm of curcuminoid with $r^2 = 0.9998$. The limit of detection (LOD) and percentage recovery were 0.0067 mg/L and 101.31%, respectively. Curcuminoids were quantified in the samples which collected from Muang district, Phitsanulok

province. The curcuminoids in those samples were different in range from 0.68-12.01 % (w/w). Only two samples of Turmeric powder did not pass the standard of Thai Herbal Pharmacopoeia (1995).

Keyword: Curcuminoid, *Curcuma longa* capsules, herbal products, UV-Visible spectrophotometry

บทนำ

เคอร์คูมินอยด์เป็นสารสีเหลืองส้มสกัดได้จากเหง้าขมิ้นชัน (*Curcuma longa* Linn.) ประกอบด้วยสารหลัก 3 ชนิด คือ เคอร์คูมิน (Curcumin) ดีเมท็อกซีเคอร์คูมิน (Demethoxycurcumin) และบิสดีเมท็อกซีเคอร์คูมิน (Bisdemethoxycurcumin)



รูปที่ 1 โครงสร้างต่างๆ ของเคอร์คูมินอยด์

สารเคอร์คูมินอยด์มีคุณสมบัติเป็นสารต้านอนุมูลอิสระที่ดี ถูกนำมาใช้ประโยชน์ทั้งทางด้านยา อาหารและเครื่องสำอาง มีการวิจัยทั้งในคนและสัตว์ทดลอง พบว่าเคอร์คูมินอยด์มีฤทธิ์แก้อาการท้องอืดจุกเสียดแน่นท้อง มีคุณสมบัติในการรักษาแผล แก้อาการคันและแผลพุพอง ป้องกันการเกิดมะเร็ง มีฤทธิ์ในการลดระดับคอเลสเตอรอล มีฤทธิ์ในการฆ่าเชื้อราและมีฤทธิ์ต้านการอักเสบ (Cousins, 2007)

ปัจจุบันกระทรวงสาธารณสุขประเทศไทยสนับสนุนการนำสมุนไพรมาใช้ประโยชน์ในการดูแลสุขภาพประชาชนร่วมไปกับการกินยาแผนปัจจุบัน ให้ได้อย่างน้อยร้อยละ 14 ของยอดการใช้ยาทั้งหมด อีกทั้งประชาชนให้ความสนใจดูแลสุขภาพตนเองด้วยการใช้สมุนไพรมากขึ้น เนื่องจากเป็นผลิตภัณฑ์จากธรรมชาติและมีความปลอดภัย ยากจากสมุนไพรแบบที่ได้รับความนิยมมากอย่างหนึ่ง คือ แคปซูลสมุนไพร เนื่องจากขั้นตอนการผลิตไม่ซับซ้อนและต้นทุน การผลิตต่ำ เพียงนำสมุนไพรสดมาบดและอบจนได้ผงแห้งแล้วบรรจุแคปซูล โดยส่วนใหญ่ไม่ต้องเติมสารช่วยอื่นอีก ทำให้แคปซูลสมุนไพรมีการผลิตอย่างแพร่หลาย ตั้งแต่บริษัทผู้ผลิตขนาดใหญ่จนถึงหน่วยงานสาธารณสุขของรัฐและกลุ่มผู้ผลิตรายย่อยในชุมชน การควบคุมคุณภาพของยาในกลุ่มนี้เป็นเรื่องสำคัญเนื่องจากประสิทธิภาพของยามีความสัมพันธ์โดยตรงกับคุณภาพของยาแคปซูลสมุนไพร มักมีปัญหาระหว่างความไม่สม่ำเสมอของตัวยาสสำคัญ ในวัตถุดิบที่นำมาเตรียม (ปรีชาและคณะ, 2549) ตามมาตรฐานของตำรามาตรฐานยาสมุนไพรไทย (1995) กำหนดให้วัตถุดิบขมิ้นชันที่เป็นผงแห้ง มีปริมาณน้ำมันหอมระเหยไม่น้อยกว่า 6 % (v/w) และมีปริมาณเคอร์คูมินอยด์ไม่น้อยกว่า 5 % (w/w) การวิเคราะห์ปริมาณเคอร์คูมินอยด์สามารถใช้เทคนิค ยูวี-วิสิเบิลสเปกโตรโฟโตเมตรีวิเคราะห์ได้ เครื่องมือนี้เป็นเครื่องมือที่มีหลักการไม่ยุ่งยากใช้งานง่าย และเนื่องจากมีงานวิจัยก่อนหน้านี้ ได้นำเคอร์คูมินเป็นสารสำหรับวิเคราะห์หาปริมาณไซยาไนด์ (Chaicham, 2010) งานวิจัยนี้จึงได้มีการนำไซยาไนด์มาประยุกต์หาปริมาณเคอร์คูมินอยด์

ตารางที่ 1 งานวิจัยที่วิเคราะห์เคอร์คูมินอยด์โดยเทคนิคต่างๆ

เทคนิคที่ใช้	ตัวอย่าง	การเตรียมตัวอย่าง	Linear range	LOD	LOQ	References
HPLC , Uv-visible spectrophotometry	แคปซูล ขมิ้นชัน	ละลายและปรับปริมาตร ด้วยเมทานอลเจือจาง ด้วย 50% เมทานอล	0-40 mg/L 0-5 mg/L	ไม่ระบุ	ไม่ระบุ	ปรีชา และ คณะ, 2549
HPTLC	ผงขมิ้นชัน	สกัดด้วยเมทานอล 20 ml 5 ครั้ง	800-1300 ng/spot	49 ng/spot	148 ng/spot	Gantait et al., 2010
TLC-Densitometry	ผงขมิ้นชัน	ใช้วิธีสกัดแบบซอกซ์เลต สกัดด้วยเฮกเซนและ เอทานอล 95%	100-1200 ng/spot	ไม่ระบุ	ไม่ระบุ	Pothitiral & Gritsanapan, 2005
เทคนิคที่ใช้	ตัวอย่าง	การเตรียมตัวอย่าง	Linear range	LOD	LOQ	References
HPLC , Uv-visible spectrophotometry	แคปซูล ขมิ้นชัน	ละลายและปรับปริมาตร ด้วยเมทานอลเจือจาง ด้วย 50% เมทานอล	0-40 mg/L 0-5 mg/L	ไม่ระบุ	ไม่ระบุ	ปรีชา และ คณะ, 2549
HPTLC	ผงขมิ้นชัน	สกัดด้วยเมทานอล 20 ml 5 ครั้ง	800-1300 ng/spot	49 ng/spot	148 ng/spot	Gantait et al., 2010
TLC-Densitometry	ผงขมิ้นชัน	ใช้วิธีสกัดแบบซอกซ์เลต สกัดด้วยเฮกเซนและ เอทานอล 95%	100-1200 ng/spot	ไม่ระบุ	ไม่ระบุ	Pothitiral & Gritsanapan, 2005
เทคนิคที่ใช้	ตัวอย่าง	การเตรียมตัวอย่าง	Linear range	LOD	LOQ	References
HPLC , Uv-visible spectrophotometry	แคปซูล ขมิ้นชัน	ละลายและปรับปริมาตร ด้วยเมทานอลเจือจาง ด้วย 50% เมทานอล	0-40 mg/L 0-5 mg/L	ไม่ระบุ	ไม่ระบุ	ปรีชา และ คณะ, 2549
HPTLC	ผงขมิ้นชัน	สกัดด้วยเมทานอล 20 ml 5 ครั้ง	800-1300 ng/spot	49 ng/spot	148 ng/spot	Gantait et al., 2010
TLC-Densitometry	ผงขมิ้นชัน	ใช้วิธีสกัดแบบซอกซ์เลต สกัดด้วยเฮกเซนและ เอทานอล 95%	100-1200 ng/spot	ไม่ระบุ	ไม่ระบุ	Pothitiral & Gritsanapan, 2005

เครื่องมือ

เครื่องยูวี-วิสิเบิล สเปกโตรโฟโตมิเตอร์ Shimadzu รุ่น UV-1601 ประเทศญี่ปุ่น ใช้ Quartz Cell ขนาด 1 เซนติเมตร

อุปกรณ์เครื่องแก้วพื้นฐาน

ขวดวัดปริมาตร, ปีกเกอร์, หลอดทดลอง, แท่งแก้วคนสาร, บีเปต, กระบอกตวง, ลูกยาง, ขวดเก็บสารละลาย

สารเคมี

1. Curcumin $\geq 95.0\%$ (Fluka), $C_{21}H_{20}O_6 = 368.39$ g/mol
2. Potassium cyanide 97% (AnalaR), KCN = 65.12 g/mol
3. Methanol 99% (Common Grade), $CH_3OH = 32.05$ g/mol

ตัวอย่างที่นำมาวิเคราะห์

ตัวอย่างที่ใช้วิเคราะห์มีทั้งหมด 7 ตัวอย่าง ประกอบด้วยขมิ้นชันแคปซูล 4 ตัวอย่าง และผงขมิ้นชันแห้ง 3 ตัวอย่าง ที่ซื้อจากท้องตลาดจังหวัดพิษณุโลก เก็บรักษาสภาพผลิตภัณฑ์ไว้ในสภาวะที่แห้งและพ้นแสง

วิธีดำเนินการวิจัย

งานวิจัยนี้แบ่งเป็น 3 ส่วน โดยแต่ละส่วนมีวิธีดำเนินการวิจัยดังนี้

ส่วนที่ 1 ศึกษาวิธีที่เหมาะสมในการสกัดสารเคอร์คูมินอยด์จากขมิ้นชัน

1. สกัดส่วนตัวทำละลายที่เหมาะสมในการสกัด

ซึ่งผงขมิ้นชัน ใส่ในหลอดทดลองขนาด 15 มิลลิลิตร จำนวน 5 หลอด หลอดละ 5 มิลลิกรัม แล้วเติม 20 40 60 80 และ 100 % (v/v) เมทานอล จำนวน 10 มิลลิลิตร ลงในหลอดทดลอง ตามลำดับ ผสมให้เข้ากันด้วยเครื่องผสมสาร (Vortex) จากนั้นนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 425 นาโนเมตร ด้วยเครื่องยูวี-วิสิเบิลสเปกโตรโฟโตมิเตอร์

2. การศึกษาระยะเวลาที่เหมาะสมในการสกัด

2.1 ซึ่งผงขมิ้นชัน 5 มิลลิกรัม ละลายด้วย 60 % (v/v) เมทานอล แล้วเทใส่ขวดวัดปริมาตรขนาด 100 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรด้วย 60 % (v/v) เมทานอล จากนั้นเทใส่ขวดเก็บสารขนาด 100 มิลลิลิตร ไม่นำไป sonicate

2.2 เตรียมเหมือนข้อ 2.1 แล้วนำไป sonicate ที่ความถี่ 100 เฮิร์ตซ์ อุณหภูมิ 60 °C เป็นเวลา 30 นาที

2.3 เตรียมเหมือนข้อ 2.1 แล้วนำไป sonicate ที่ความถี่ 100 เฮิร์ตซ์ อุณหภูมิ 60 °C เป็นเวลา 60 นาที

นำสารสกัดทั้ง 3 ขวด ไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 425 นาโนเมตร

ส่วนที่ 2 การศึกษาสัดส่วนโมลที่เหมาะสมในการเกิดปฏิกิริยาระหว่างเคอร์คูมินอยด์กับสารละลายโพแทสเซียมไฮยาไนด์

เตรียมหลอดทดลองจำนวน 11 หลอด จากนั้นบีบเคอร์คูมินอยด์เข้มข้น 0.1 มิลลิโมลาร์ ปริมาตร 0 0.5 1 1.5 2 2.5 3 3.5 4 4.5 และ 5 มิลลิลิตร ตามลำดับ แล้วเติมสารละลายโพแทสเซียมไฮยาไนด์ความเข้มข้น 0.1 มิลลิโมลาร์ ปริมาตร 5 4.5 4 3.5 3 2.5 2 1.5 1 0.5 และ 0 มิลลิลิตร ลงในหลอดทดลองตามลำดับ นำหลอด ที่เปลี่ยนเป็นสีแดงเข้มที่สุดไปวัดค่าการดูดกลืนแสงโดยการสแกนความยาวคลื่นในช่วงความยาวคลื่น 320-700 นาโนเมตร เพื่อหาความยาวคลื่นที่ทำให้การดูดกลืนแสงสูงสุด (λ_{max}) ก่อน แล้ววัดค่าการดูดกลืนแสงของสารผสมทุกหลอดที่ความยาวคลื่นที่ให้ค่าการดูดกลืนแสงสูงสุด (ในการผสมให้ผสมและวัดค่าการดูดกลืนแสงให้เร็วที่สุดเพราะค่าการดูดกลืนแสงของสารผสมไม่คงตัวค่าการดูดกลืนแสงมีการลดลง)

ส่วนที่ 3 การวิเคราะห์ปริมาณเคอร์คูมินอยด์ในผลิตภัณฑ์ยาสมุนไพร

1. สร้างกราฟมาตรฐานสำหรับวิเคราะห์ปริมาณเคอร์คูมินอยด์

บีบเคอร์คูมินอยด์มาตรฐานเคอร์คูมินอยด์ความเข้มข้น 0 0.2 0.5 1 5 10 20 30 และ 50 มิลลิกรัมต่อลิตร ปริมาตร 5 มิลลิลิตร ลงในหลอดทดลองตามลำดับ จากนั้นบีบเคอร์คูมินอยด์โพแทสเซียมไฮยาไนด์ความเข้มข้น 50 มิลลิโมลาร์ ใส่หลอดทดลองปริมาตร 32 ไมโครลิตร เขย่าให้ผสมกันและนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงอย่างรวดเร็ว ที่ความยาวคลื่น 500 นาโนเมตร การผสมและวัดค่าให้ทำที่ละความเข้มข้น ความเข้มข้นและ

ปริมาณสารละลายโพแทสเซียมไฮยาไนด์ที่ใช้ รวมทั้งความยาวคลื่นที่ใช้ในการวิเคราะห์ ได้มาจากการการศึกษาสัดส่วนโมลที่เหมาะสมใน การเกิดปฏิกิริยาระหว่างเคอร์คูมินอยด์กับสารละลายโพแทสเซียมไฮยาไนด์ (ส่วนที่ 2)

2. การศึกษาช่วงความเป็นเส้นตรงของกราฟมาตรฐานและความน่าเชื่อถือของวิธีวิเคราะห์

2.1 การศึกษาช่วงความเป็นเส้นตรง ทำได้โดยคำนวณค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ (Correlation coefficient) (r^2) ต้องไม่น้อยกว่า 0.995 ถ้าค่า r^2 ไม่เป็นไปตามกำหนดให้ตัดจุดที่มีความเข้มข้นสูงออกครั้งละ 1 จุด แล้วพิจารณากราฟอีกครั้งเปรียบเทียบกับ r^2 กับครั้งก่อน จนกระทั่งได้ค่า r^2 มากที่สุด (ไม่น้อยกว่า 0.9950)

2.2 ปิเปต 60 % (v/v) เมทานอล ปริมาตร 5 มิลลิลิตร และปิเปตสารละลายโพแทสเซียมไฮยาไนด์ ความเข้มข้น 50 มิลลิโมลาร์ ปริมาตร 32 ไมโครลิตร ใส่ในหลอดทดลองเขย่าให้ผสมกันแล้วนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 500 นาโนเมตร แล้วทำซ้ำอีก 9 ครั้ง นำค่าที่วัดได้ไปคำนวณหา LOD และ LOQ

2.3 ปิเปตสารมาตรฐานเคอร์คูมินอยด์ความเข้มข้น 5 มิลลิกรัมต่อลิตร ปริมาตร 5 มิลลิลิตร ใส่ในหลอดทดลอง แล้วปิเปตสารละลายโพแทสเซียมไฮยาไนด์ 50 มิลลิโมลาร์ ปริมาตร 32 ไมโครลิตร ใส่ในหลอดทดลอง เขย่าให้ผสมกันและนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงอย่างรวดเร็วที่ความยาวคลื่น 500 นาโนเมตร ทำซ้ำอีก 9 ครั้ง นำค่าที่วัดได้คำนวณหาความเข้มข้นจากกราฟมาตรฐานที่สร้างได้ เพื่อคำนวณหาความผิดพลาดสัมพัทธ์และความถูกต้องสัมพัทธ์

2.4 เตรียมสารสกัดเข้มข้นตามวิธีสกัดที่ให้ปริมาณเคอร์คูมินอยด์สูงสุดจากวิธีดำเนินการวิจัยในส่วนที่ 1 จำนวน 3 ขวด ปิเปตสารละลายเข้มข้นแคปซูล 5 มิลลิลิตร และปิเปตสารละลายโพแทสเซียมไฮยาไนด์ 50 มิลลิโมลาร์ ปริมาตร 32 ไมโครลิตร ใส่ในหลอดทดลองเขย่าให้ผสมกัน นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 500 นาโนเมตร อย่างรวดเร็ว ทำซ้ำอีก 9 ครั้ง ทำเช่นนี้ทั้ง 3 ขวด ส่วนการวิเคราะห์ระหว่างวันทำเช่นเดียวกับการวิเคราะห์ภายในวันเดียวกัน แต่ต่างกันที่ทำการวิเคราะห์วันละขวดติดต่อกัน 3 วัน เครื่องมือเดียวกัน ผู้วิเคราะห์คนเดียวกัน

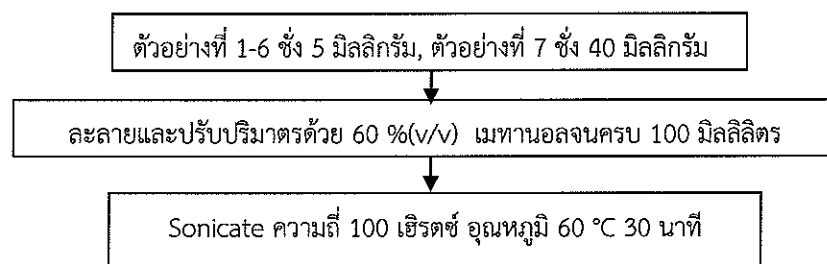
2.5 วัดค่าการดูดกลืนแสงของสารละลายตัวอย่างที่ไม่ได้ spiked sample ด้วยสารละลายมาตรฐานเคอร์คูมินอยด์ ลงในตัวอย่าง และ spiked sample ความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร โดยปิเปตสารละลายตัวอย่างปริมาตร 4 มิลลิลิตร และปิเปตสารละลายโพแทสเซียมไฮยาไนด์ 50 มิลลิโมลาร์ ปริมาตร 32 ไมโครลิตร ใส่ในหลอดทดลองเขย่าให้ผสมกัน แล้วนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 500 นาโนเมตร อย่างรวดเร็ว แล้วทำซ้ำ อีก 9 ครั้ง นำค่าที่วัดได้ มาคำนวณหาความเข้มข้นจากกราฟมาตรฐานที่สร้างได้ เพื่อคำนวณหาเปอร์เซ็นต์การกลับคืนของสาร (% Recovery)

3. การวิเคราะห์ปริมาณเคอร์คูมินอยด์ในผลิตภัณฑ์ยาสมุนไพร

3.1 ตัวอย่างที่ใช้วิเคราะห์ทั้งหมด 7 ตัวอย่าง ประกอบด้วยไขมันชั้นแคปซูล 4 ตัวอย่าง และผงไขมันชั้น
 แห้ง 3 ตัวอย่าง ดังรูปที่ 2



รูปที่ 2 ตัวอย่างที่ใช้ในการวิเคราะห์



รูปที่ 3 แผนผังการเตรียมตัวอย่าง

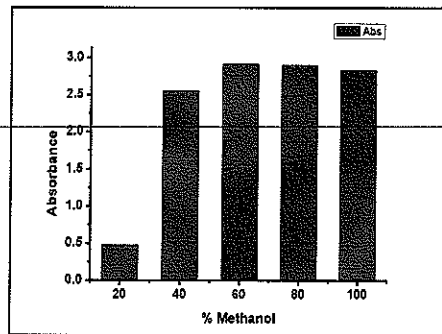
เตรียมตัวอย่างไขมันชั้นตามแผนผัง ข้างต้น จากนั้น ปิเปตสารละลายไขมันชั้นตัวอย่างทั้ง 7 ตัวอย่าง ปริมาตรอย่างละ 5 มิลลิลิตร และปิเปตสารละลายโพแทสเซียมไฮยาไนด์ 50 มิลลิโมลาร์ ปริมาตร 32 ไมโครลิตร ใส่ในหลอดทดลองเขย่าให้ผสมกัน แล้วนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงอย่างรวดเร็วที่ความยาวคลื่น 500 นาโนเมตร ทำซ้ำอีก 9 ครั้ง

นำค่าที่วัดได้จากทั้ง 2 วิธี คำนวณหาความเข้มข้นจากกราฟมาตรฐานที่สร้างได้

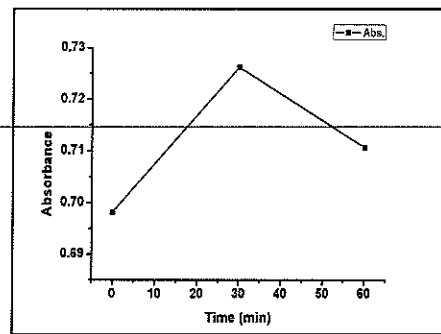
ผลการวิจัย

1. ศึกษาวิธีที่เหมาะสมในการสกัดสารเคอร์คูมินอยด์จากไขมันชั้น

ตัวทำละลายที่เหมาะสมในการสกัดสารเคอร์คูมินอยด์ คือ 60 % (v/v) เมทานอล ส่วนเวลาที่ใช้ในการ sonicate ความถี่ 100 เฮิร์ตซ์ อุณหภูมิ 60°C แล้วให้ปริมาณเคอร์คูมินอยด์สูงสุดคือ 30 นาที ดังแสดงในรูปที่ 3 และ 4



รูปที่ 4 % เมทานอลที่ใช้ในการสกัด

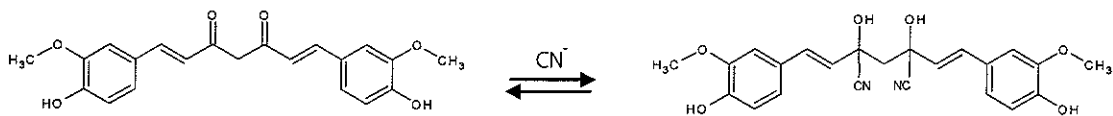


รูปที่ 5 ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 425 nm ของสารสกัดเทียบกับเวลาที่ผ่านไปในช่วง 60 นาที

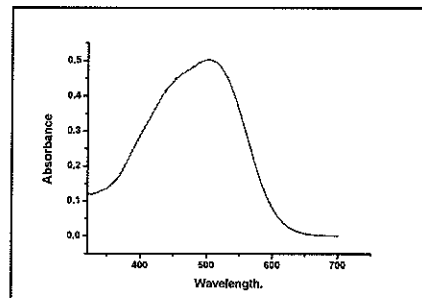
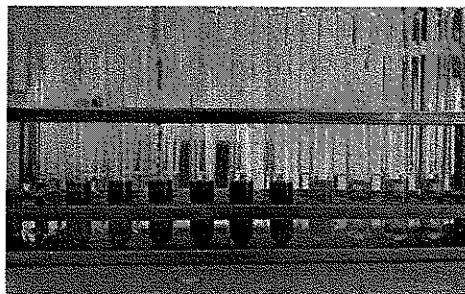
2. การศึกษาสัดส่วนโมลที่เหมาะสมในการเกิดปฏิกิริยาระหว่างเคอร์คูมินอยด์กับสารละลายโพแทสเซียมไฮยาไนด์

จากการศึกษาสัดส่วนโมลที่เหมาะสมในการเกิดปฏิกิริยาระหว่างเคอร์คูมินอยด์กับสารละลายโพแทสเซียมไฮยาไนด์ พบว่าสารผสมมีสีแดง ที่สามารถดูดกลืนแสงได้ที่ความยาวคลื่น 500 นาโนเมตร เป็นเช่นนี้เพราะเคอร์คูมินอยด์เกิดปฏิกิริยากับไฮยาไนด์มีการถ่ายโอนอิเล็กตรอนทำให้หมู่ฟังก์ชันในโครงสร้างของเคอร์คูมินอยด์เปลี่ยนไป สัดส่วนโมล ที่วิเคราะห์ได้คือ 3 โมลเคอร์คูมินอยด์ทำปฏิกิริยาพอดีกับ 7 โมลสารละลายโพแทสเซียมไฮยาไนด์ ดังแสดงในรูปที่ 5

ปฏิกิริยาที่เกิดขึ้น



รูปที่ 6 สัดส่วนโมลที่เหมาะสมในการเกิดปฏิกิริยาระหว่างเคอร์คูมินอยด์กับสารละลายโพแทสเซียมไฮยาไนด์



รูปที่ 7 สัดส่วนโมลที่เหมาะสมในการเกิดปฏิกิริยา

รูปที่ 8 สเปกตรัมการดูดกลืนแสงของสารละลายผสมระหว่างเคอร์คูมินอยด์กับสารละลายโพแทสเซียมไฮยาไนด์

3. การวิเคราะห์ปริมาณเคอร์คูมินอยด์ในผลิตภัณฑ์ยาสมุนไพร

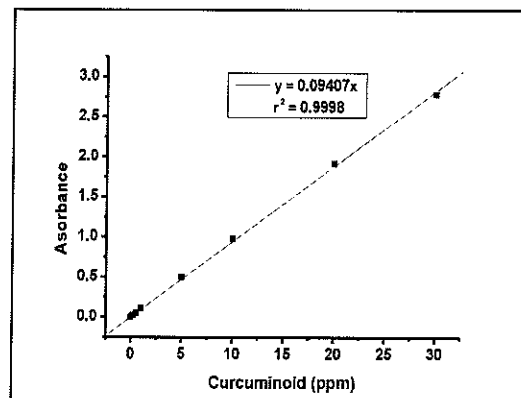
1. กราฟมาตรฐานสำหรับวิเคราะห์ปริมาณเคอร์คูมินอยด์

สร้างกราฟมาตรฐานโดยใช้เคอร์คูมินอยด์ความเข้มข้น 0 ถึง 50 มิลลิกรัมต่อลิตร นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 500 นาโนเมตร ผลที่ได้แสดงดังตารางที่ 2

ตารางที่ 2 ค่าการดูดกลืนแสงของสารมาตรฐานเคอร์คูมินอยด์ ที่ความยาวคลื่น 500 นาโนเมตร

[Curcuminoid] (ppm)	Absorbance
0	0.0020
0.2	0.0221
0.5	0.0502
1	0.1134
5	0.5021
10	0.9762
20	1.9131
30	2.7830
40	3.5242
50	3.7628

เมื่อสร้างกราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่าการดูดกลืนแสงกับความเข้มข้นของเคอร์คูมินอยด์ พบว่าได้กราฟมาตรฐานที่เป็นเส้นตรง ในช่วงความเข้มข้น 0 ถึง 30 มิลลิกรัมต่อลิตร และมีค่า r^2 เท่ากับ 0.9998 แสดงดังรูปที่ 7



รูปที่ 7 กราฟมาตรฐานสำหรับวิเคราะห์เคอร์คูมินอยด์

2. ผลการศึกษาช่วงความเป็นเส้นตรงของกราฟมาตรฐานและความน่าเชื่อถือของวิธีวิเคราะห์

การศึกษาความน่าเชื่อถือของวิธีวิเคราะห์ไม่ว่าจะเป็น ความถูกต้อง ความแม่นยำของวิธีวิเคราะห์และเปอร์เซ็นต์การกลับคืน โดยความผิดพลาดสัมพัทธ์ (relative error) ต้องไม่เกิน 10% ความถูกต้องสัมพัทธ์ (relative accuracy) ต้องอยู่ระหว่าง 90-110% ความแม่นยำของวิธีวิเคราะห์ (Precision) ในรูป %RSD ต้องน้อยกว่า 5% และค่าเปอร์เซ็นต์การกลับคืนต้องอยู่ระหว่าง 95-115% จากการศึกษาพบว่าค่าต่างๆ อยู่ในเกณฑ์ที่ยอมรับได้ แสดงดังตารางที่ 3

ตารางที่ 3 ผลการศึกษาช่วงความเป็นเส้นตรงของกราฟมาตรฐานและความน่าเชื่อถือของวิธีวิเคราะห์

Parameters validate	ค่าที่วิเคราะห์
Linear range (mg/L)	0 - 30
r^2	0.9998

LOD (mg/L)	0.0067
LOQ (mg/L)	0.0190
Accuracy relative error	0.65 - 7.71
relative accuracy	100.65 - 107.71
Precision (%RSD)	
Intra-day	1.38
Inter-day	1.62
% Recovery sample + 0.5 ppm	101.31

3. ผลการวิเคราะห์ปริมาณเคอร์คูมินอยด์ในตัวอย่าง

จากการวิเคราะห์ปริมาณเคอร์คูมินอยด์ในตัวอย่างผลิตภัณฑ์สมุนไพรขึ้นชั้นทั้ง 7 ตัวอย่าง ผลปรากฏว่า มีสองตัวอย่างที่ไม่ผ่านมาตรฐานตำรามาตรฐานยาสมุนไพรไทย (1995) ซึ่งกำหนดให้วัตถุบขมิ้นชั้นที่เป็นผงแห้งต้องมีปริมาณเคอร์คูมินอยด์ ไม่น้อยกว่า 5 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนัก ตัวอย่างดังกล่าวมีปริมาณเคอร์คูมินอยด์เพียง 4.65 และ 0.68 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนัก ดังแสดงในตารางที่ 4

ตารางที่ 4 ผลการวิเคราะห์ปริมาณเคอร์คูมินอยด์ในตัวอย่าง

ตัวอย่าง	ปริมาณเคอร์คูมินอยด์ (%w/w)	มาตรฐานยาสมุนไพรไทยกำหนด
	$\bar{x} \pm S.D.$	(%w/w)
ขมิ้นชันแคปซูลอ้อยอัน	11.76 $\pm$ 0.04	5
ขมิ้นชันแคปซูลอภัยเบศร	10.88 $\pm$ 0.04	5
ขมิ้นชันแคปซูลวัดใหญ่	4.65 $\pm$ 0.03	5
ขมิ้นชันแคปซูลฉันทพรสมุนไพร	7.49 $\pm$ 0.02	5
ผงขมิ้นชันวัดใหญ่	10.09 $\pm$ 0.02	5
ผงขมิ้นชันอบแห้ง	12.01 $\pm$ 0.04	5
ผงขมิ้นชันที่อบแห้งแล้วทั้งหัว	0.68 $\pm$ 0.02	5

สรุปผลการวิจัย

การพัฒนาเทคนิคยูวี-วิสิเบิล สเปกโทรโฟโตเมตรีสำหรับวิเคราะห์ปริมาณเคอร์คูมินอยด์ในตัวอย่างขมิ้นชัน โดยอาศัยการเกิดปฏิกิริยาระหว่างสารเคอร์คูมินอยด์กับสารละลายโพแทสเซียมไฮยาไนด์ เกิดเป็นสารสีแดงที่สามารถดูดกลืนแสงได้ที่ความยาวคลื่น 500 นาโนเมตร สัดส่วนโมลที่เหมาะสมในการเกิดปฏิกิริยาคือ 3 โมลเคอร์คูมินอยด์ ทำปฏิกิริยาพอดีกับ 7 โมลสารละลายโพแทสเซียมไฮยาไนด์ เทคนิคที่พัฒนาขึ้นมีความถูกต้องและแม่นยำ โดยแสดง ในรูปของค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ภายในวันเดียวกันและต่างวันกันเท่ากับ 1.38 และ 1.62 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ กราฟมาตรฐาน สำหรับการวิเคราะห์ปริมาณเคอร์คูมินอยด์มีความเป็นเส้นตรงในช่วงความเข้มข้น 0 - 30 มิลลิกรัมต่อลิตร ($r^2 = 0.9998$) ความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถวิเคราะห์ได้ เท่ากับ 0.0067 มิลลิกรัมต่อลิตร ร้อยละการกลับคืน เท่ากับ 101.31 ปริมาณเคอร์คูมินอยด์ที่ตรวจพบในตัวอย่างผลิตภัณฑ์ยาสมุนไพรที่เก็บภายในอำเภอเมือง จังหวัดพิษณุโลก มีความแตกต่างกันมากตั้งแต่ 0.68-12.01 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนัก มีเพียงผงขมิ้นชันจำนวน 2 ตัวอย่างที่ไม่ผ่านมาตรฐานตำรามาตรฐานยาสมุนไพรไทย (1995) ซึ่งกำหนดให้วัตถุบขมิ้นชั้นที่เป็นผงแห้งต้องมีปริมาณเคอร์คูมินอยด์ ไม่น้อยกว่า 5 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนัก ตัวอย่างดังกล่าวมีปริมาณเคอร์คูมิ

นอยด์เพียง 4.65 และ 0.68 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนัก การวิเคราะห์ด้วยวิธีนี้ ไม่ควรวิเคราะห์ในสถานะที่เป็นกรด เนื่องจากอาจเกิดแก๊สไฮโดรเจนไซยาไนด์ได้

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบพระคุณ อาจารย์และเจ้าหน้าที่สาขาวิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏพิบูลสงคราม ที่ให้คำปรึกษาและช่วยเหลือในเรื่องเครื่องมือ สารเคมีและอุปกรณ์ต่างๆ ในการทำงานวิจัยครั้งนี้ ขอขอบพระคุณครอบครัวที่ให้การสนับสนุนทุนการศึกษาให้กำลังใจ คอยช่วยเหลือจนประสบความสำเร็จและขอขอบคุณเพื่อนๆ และน้องๆ ทุกคนที่ให้ความสนใจเสมอมา

เอกสารอ้างอิง

- ปรีชา บุญจูง, วิภาวี เสหาหิน, วิรัตน์ จันทร์ตรี, บัณฑิต กิตติจารุขจร, พรมมินทร์ ไกรยสินธ์ และ สุลักษณ์ มะลิทอง. 2549. การวิเคราะห์หาปริมาณสารสำคัญในแคปซูลขมิ้นชันและฟ้าทะลายโจรโดยใช้โครมาโทกราฟี ชนิดของเหลวสมรรถนะสูง. ไทยเภสัชศาสตร์และวิทยาการสุขภาพ, 1, 45-55.
- แมน อมรสิทธิ์ และ อมร เพชรสม. 2539. หลักการและเทคนิคการวิเคราะห์เชิงเครื่องมือ, กรุงเทพฯ, โรงพิมพ์ชวนพิมพ์.
- กรณีการ์ แสงรัตนกุล. 2549. การสกัดและหาปริมาณเคอร์คูมินจากขมิ้นชันและขมิ้นอ้อย. วิทยานิพนธ์ฉบับเต็ม.
- Cousins, M., Adelberg, J. & Rieck, F. C. J. 2007. Antioxidant capacity of fresh and dried rhizomes from four clones of turmeric (Curcuma longa L.) grown in vitro. *Industrial Crops and Products*, 129-135.
- Chaicham, A., Kulchat, S. & Tumcharern, G. 2010. Synthesis, photophysical properties, and cyanide detection in aqueous solution of BF₂-curcumin dyes. *Tetrahedron*, 6217 - 6223.
- Gantait, A., Barman, T. & Mukherjee, P. K. 2011. 9. Validated method for estimation of curcumin in turmeric powder. *Indian Journal of Traditional Knowledge*, 10(2).
- Pothitirat, W. & Gritsanapan, W. 2005. Quantitative Analysis of Curcumin, Demethoxycurcumin and Bisdemethoxycurcumin in the Crude Curcuminoid Extract from Curcuma longain Thailand by TLC-Densitometry. *Mahidol University Journal of Pharmaceutical Science*, 32(1-2), 23 - 30.