

การพัฒนาและพิสูจน์ความใช้ได้ของวิธีทดสอบ curcumin ในตัวอย่างขมิ้นชันผง ด้วยเทคนิค HPLC-DAD

สุนันท์ กิตติจารุวัฒนา ชุศักดิ์ อาจสูงเนิน ศศิกานต์ วุฒิกานต์นนท์ รัตนภรณ์ ขนประชา
องอาจ บุญบรรลุ ธิติ รุจิไชวี่

บทคัดย่อ

การทดสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์หาปริมาณสารสำคัญ curcumin ด้วยเทคนิค high-performance liquid chromatography-photodiode array detection (HPLC-DAD) ด้วยคอลัมน์ Vertical ชนิด C_{18} ขนาด 250 mm x 4.6 mm ID (ขนาดอนุภาค 5 μ m) สารกลุ่ม curcuminoids ถูกแยกออกในเวลา 12 นาที โดยมี run time 15 นาที เฟสเคลื่อนที่คือ 2.0% acetic acid ในน้ำต่อ acetonitrile (60:40, v/v) อัตราการไหล 2.0 มิลลิลิตรต่อนาที ฉีดตัวอย่างปริมาณ 2.0 ไมโครลิตร ตั้งค่าการตรวจวัดที่ 425 นาโนเมตร เตรียมตัวอย่างโดยการสกัดด้วย methanol 3 รอบ และระเหยแห้ง ก่อนละลายและปรับปริมาตรด้วย methanol เพื่อฉีดเข้าเครื่อง HPLC ผลการศึกษาความเป็นเส้นตรงของ curcumin ในช่วงความเข้มข้น 10 – 150 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร พบว่าได้ค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ (correlation coefficient; r) เท่ากับ 0.9991 การทดสอบความแม่นยำซึ่งประเมินจากร้อยละการกลับคืน อยู่ในช่วง 99.76 – 101.50 % และมี precision (repeatability) เท่ากับ 1.33 %RSD มีระดับต่ำสุดที่สามารถวัดปริมาณได้ (LOQ) เท่ากับ 0.1 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ดังนั้นวิธีที่พัฒนาขึ้นนี้มีความเหมาะสมสำหรับใช้ทดสอบหาปริมาณสารสำคัญ curcumin ในผงขมิ้นชัน

คำสำคัญ : curcumin, curcuminoid, bisdemethoxycurcumin, demethoxycurcumin,
HPLC-DAD

กลุ่มตรวจสอบคุณภาพยาสัตว์และวัตถุอันตรายด้านการปศุสัตว์ สำนักตรวจสอบคุณภาพสินค้า
ปศุสัตว์ กรมปศุสัตว์

Method validation for curcumin in turmeric powder by HPLC-DAD

Sunan Kittijaruwattana, Chusak Ardsoongnearn, Sasikan Wutthikannon, Rattanaporn Chonpracha, Ongart Boonbanlu, Titi Rujichao

Abstract

A simple and reliable reversed phase high-performance liquid chromatography coupled with a diode array detector (HPLC - DAD) method for curcumin has been developed and validated. Curcuminoids were separated in 12 minutes (15 minutes run time) with a Vertical, C₁₈ HPLC column, 250 x 4.6 mm ID, packed with 5 micrometer particles. The mobile phase comprised 2% acetic acid in water and acetonitrile, in the ratio of 60: 40, v/v with isocratic program, flow rate 2.0 mL/min and 20 µL injection volume. The absorption wavelength was set at 425 nm. Three times extraction with methanol before evaporation and diluting with methanol before LC injection were used to prepare the sample. The linearity of curcumin calibration curve was evaluated at the range of 10 – 150 µg/mL. The correlation coefficients (*r*) were 0.9991. The accuracy in term of bias were ranged from 99.76 – 101.50 % and precision (repeatability) was 1.33 %RSD. The intermediate precision ranged from 0.32 – 0.46 %RSD. The LOQ were 0.1 µg/mL. The result of the method validation showed that this method is suitable for the determination of curcumin.

Keywords: curcumin, curcuminoid, bisdemethoxycurcumin, demethoxycurcumin, HPLC-DAD

Veterinary Drugs and Hazardous Substances Assay Division, Bureau of Quality Control of Livestock Products, Department of Livestock Development.

การพัฒนาและพิสูจน์ความใช้ได้ของวิธีทดสอบ curcumin ในตัวอย่างขมิ้นชันผง ด้วยเทคนิค HPLC-DAD

สุนันท์ กิตติจารุวัฒนา ชุศักดิ์ อาจสูงเนิน ศศิกานต์ วุฒิกานต์นนท์ รัตนภรณ์ ขนประชา
องอาจ บุญบรรลุ ธิติ รุจิไชว

บทนำ

ขมิ้นชัน (*Curcuma Longa* L.) เป็นสมุนไพรที่ได้รับการบรรจุอยู่ในบัญชียาหลักแห่งชาติ ในส่วนของบัญชียาจากสมุนไพร ปรับปรุงล่าสุด เรื่องบัญชียาหลักแห่งชาติ (ฉบับที่ 2) พ.ศ.2555 (ยาพัฒนาจากสมุนไพร ยารักษากลุ่มอาการของระบบทางเดินอาหาร) ซึ่งมีสรรพคุณทางยาอยู่ในกลุ่ม ยาขับลม บรรเทาอาการท้องอืด ท้องเฟ้อ โดยมีสารสำคัญที่ใช้ในการรักษาเช่น curcumin, bisdemethoxycurcumin และ demethoxycurcumin เป็นต้น

Thai Herbal pharmacopoeia (2016) ได้ศึกษาวิธีวิเคราะห์หาสารสำคัญ curcumin ในสมุนไพรขมิ้นชัน (KHAMIN CHAN) โดยการพิสูจน์เอกลักษณ์ (identification) ด้วยวิธี Thin layer chromatography

Tayyem et al. (2006) ได้ศึกษาการหาปริมาณสาร curcumin ใน turmeric และ curry powders ด้วยเทคนิค HPLC โดยใช้เครื่องทดสอบจำนวน 28 ชนิด ในการศึกษาครั้งนี้พบว่าในผลิตภัณฑ์ทั้งหมดสามารถพบปริมาณ curcumin เฉลี่ยที่ 3.14 %w/w ซึ่งในการศึกษาครั้งนี้พบบางผลิตภัณฑ์ที่พบปริมาณ curcumin ปริมาณน้อยและมากแตกต่างกันไป และยังพบความแปรปรวนของเนื้อหาที่ค่อนข้างมาก ทำให้จำเป็นต้องทำการศึกษาต่อไป

Monton et al. (2016) ได้ศึกษาการหาปริมาณของสารกลุ่ม curcuminoid การละลาย การหาโปรไฟล์ของสาร และปริมาณสารระเหยของขมิ้นชันแคปซูล ด้วยเทคนิค HPLC การศึกษาพบว่าปริมาณของ curcumin ในแคปซูลมีสูงกว่า bisdemethoxycurcumin และ demethoxycurcumin ซึ่งจากการสุ่มตรวจพบว่าปริมาณของสาร curcuminoid ในผลิตภัณฑ์ที่นำมาศึกษาผ่านเกณฑ์การยอมรับของ Thai Herbal Pharmacopoeia

Wichitnithad et al. (2008) ได้ศึกษาการหาปริมาณของสารกลุ่ม curcuminoid ในสารสกัดขมิ้นชัน ด้วยเทคนิค HPLC การศึกษาครั้งนี้จะทำการวิเคราะห์สาร 3 ชนิดได้แก่ curcumin, bisdemethoxycurcumin และ demethoxycurcumin ผลการศึกษาสามารถแยกสารของ curcuminoid ทั้ง 3 ชนิดออกจากกันได้เป็นอย่างดี

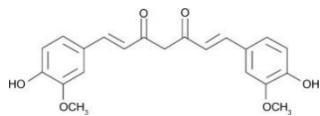


Fig.1. Curcumin.

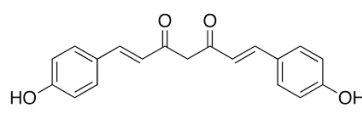


Fig.2. Bisdemethoxycurcumin.

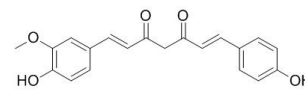


Fig.3. demethoxycurcumin.

กรมปศุสัตว์โดยคณะกรรมการส่งเสริมและการขับเคลื่อนการนำสมุนไพรไทยกัญชาและกัญชง มาใช้ในการเลี้ยงปศุสัตว์และสัตว์เลี้ยว ผลักดันให้มีการใช้สมุนไพรไทยในการเลี้ยงสัตว์ สำนักตรวจสอบคุณภาพสินค้าปศุสัตว์จึงเตรียมความพร้อมห้องปฏิบัติการด้านสมุนไพร โดยศึกษาคุณสมบัติของสมุนไพร เช่น การพิสูจน์เอกลักษณ์ การตรวจสอบคุณภาพเชิงปริมาณ เพื่อเป็นการเพิ่มศักยภาพขั้นพื้นฐานและเตรียมความพร้อมในการแยกและผลิตสารสำคัญจากสมุนไพร เพื่อให้ความร่วมมือกับหน่วยงานอื่นต่อไปในอนาคต

1. วัตถุประสงค์

เพื่อพัฒนาและพิสูจน์ความใช้ได้ของวิธีทดสอบ curcumin ในตัวอย่างไขมันชั้นผง ด้วยเทคนิค HPLC-DAD

2. ขอบข่าย

ใช้สำหรับหาปริมาณสารสำคัญ curcumin ในตัวอย่างไขมันชั้นผง ด้วยเทคนิค HPLC-DAD

3. ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

ได้วิธีทดสอบที่สามารถวิเคราะห์และหาปริมาณสารสำคัญ curcumin ในตัวอย่างไขมันชั้นผง ได้

4. วิธีดำเนินการ

4.1 เครื่องมือและอุปกรณ์

- 4.1.1 ชุดแยกชนิดและปริมาณสารด้วยหลักการ High Performance Liquid Chromatography (HPLC) พร้อมอุปกรณ์
- 4.1.2 คอมพิวเตอร์ควบคุมระบบ โปรแกรม Lab Solution
- 4.1.3 คอลัมน์ HPLC ชนิด C₁₈ ขนาด 250 mm × 4.6 mm ID (5 µm particle size) ยี่ห้อ vertical S/N 1517
- 4.1.4 เครื่องทำน้ำบริสุทธิ์พร้อมอุปกรณ์
- 4.1.5 เครื่องชั่งน้ำหนักไฟฟ้าทศนิยม 5 ตำแหน่ง
- 4.1.6 เครื่องลดอนุภาคด้วยระบบคลื่นเสียงความถี่สูง ยี่ห้อ Crest รุ่น 575DAE
- 4.1.7 เครื่องปั่นเหวี่ยงแยกสารละลายชนิดควบคุมอุณหภูมิแบบตั้งพื้น ยี่ห้อ Sorvall รุ่น LYNX4000
- 4.1.8 เครื่องเขย่าสารละลายตัวอย่าง ยี่ห้อ Stuart Scientific รุ่น 32BL79
- 4.1.9 Syringe filter nylon 0.45 µL
- 4.1.10 Vial HPLC ใส่ พร้อมฝา ขนาด 2 mL
- 4.1.11 Amber glass vial ขนาด 4 mL
- 4.1.12 Volumetric pipette ขนาด 1, และ 5 mL
- 4.1.13 Volumetric flask ขนาด 10, 25, 50 และ 100 mL

- 4.1.14 Beaker ขนาด 25, 500 mL
- 4.2 วัสดุวิทยาศาสตร์
- 4.2.1 สารมาตรฐาน curcumin ($C_{21}H_{20}O_6$) ยี่ห้อ HPC
- 4.2.2 สารมาตรฐาน bisdemethoxycurcumin ($C_{19}H_{16}O_4$) ยี่ห้อ USP
- 4.2.3 สารมาตรฐาน demethoxycurcumin ($C_{20}H_{18}O_5$) ยี่ห้อ USP
- 4.2.4 Acetonitrile (CH_3CN) ชนิด AR grade และ HPLC grade
- 4.2.5 Glacial acetic acid ($C_2H_4O_2$) ชนิด AR grade
- 4.2.6 Methanol (CH_3OH) ชนิด AR grade
- 4.2.7 น้ำบริสุทธิ์ความต้านทานไม่น้อยกว่า $18.2\text{ M}\Omega\cdot\text{cm}$ (น้ำ deionized)
- 4.2.8 ตัวอย่างขมิ้นชันผง
- 4.3 วิธีทดสอบ
- 4.3.1 การเตรียมสารมาตรฐานและตัวอย่างขมิ้นชัน
- 4.3.1.1 การเตรียม stock สารมาตรฐาน curcumin ที่ความเข้มข้น 5 mg/mL โดยชั่งสารมาตรฐาน curcumin ให้มีเนื้อสาร 5 mg/mL ลงใน volumetric flask ละลายและปรับปริมาตรด้วย methanol
- 4.3.1.2 การเตรียม working standard solution ที่ความเข้มข้น 100 $\mu\text{g/mL}$ โดยปิเปต 1 mL ของ stock สารมาตรฐาน curcumin ความเข้มข้น 1 mg/mL ลงใน volumetric flask ขนาด 10 mL ปรับปริมาตรด้วย methanol
- 4.3.1.3 การเตรียมตัวอย่างโดย ชั่งตัวอย่าง 1 g (บันทึกน้ำหนักจริง) ลง centrifuge tube ขนาด 50 mL เติม methanol ปริมาตร 20 mL นำไปเขย่า 15 นาที แล้ว centrifuge 10 นาที ที่ 5,500 rpm, 20 องศาเซลเซียส เก็บส่วนใสที่ได้ นำไประเหยแห้งด้วยเครื่อง TurboVap ที่ 40 องศาเซลเซียส (ทำการสกัดซ้ำ 3 รอบ) ละลายและปรับปริมาตรด้วย methanol ให้ได้ 50 mL จากนั้นปิเปต 2 mL ลง volumetric flask ขนาด 5 mL และปรับปริมาตรด้วย methanol
- 4.3.2 ทดสอบช่วงของการวิเคราะห์ (range)
- 4.3.2.1 เตรียม calibration curve ของ curcumin ให้มีความเข้มข้นอยู่ในช่วง 10 – 300 $\mu\text{g/mL}$ (10, 25, 50, 75, 100, 125, 150, 200, 250 และ 300 $\mu\text{g/mL}$) โดยเตรียม range ตาม table 1 เตรียมความเข้มข้นละ 1 ซ้ำๆ ละ 2 injection

Table 1 Preparation of a solution for curcumin range testing.

No.	Stock Curcumin (1.0 mg/mL).	Volume (ACN).	Final curcumin conc. (µg/mL).
1	100	10	10
2	250	10	25
3	500	10	50
4	750	10	75
5	1000	10	100
6	1250	10	125
7	1500	10	150
8	2000	10	200
9	2500	10	250
10	3000	10	300

นำค่าพื้นที่ใต้พีคของสารมาตรฐานและความเข้มข้นไปสร้างกราฟหาค่า correlation coefficient (r) เกณฑ์การยอมรับ $r > 0.99$ (AOAC, 2019)

4.3.2.2 ทดสอบความเป็นเส้นตรง (linearity) โดยเตรียม calibration curve ของ Curcumin ให้มีความเข้มข้นอยู่ในช่วง 10 – 150 µg/mL (10, 25, 50, 75, 100, 125 และ 150 µg/mL) ซึ่งเตรียมตาม table 2 และเตรียมความเข้มข้นละ 1 ซ้ำๆ ละ 2 injection ทำการทดสอบ 3 วัน นำค่าพื้นที่ใต้พีคของสารมาตรฐานและความเข้มข้นไปสร้างกราฟหาค่า correlation coefficient (r) โดยมีเกณฑ์การยอมรับ $r > 0.99$ (AOAC, 2019)

Table 2 Preparation of a solution for curcumin linearity testing.

No.	Stock Curcumin (1.0 mg/mL)	Volume (ACN)	Final curcumin conc. (µg/mL)
1	100	10	10
2	250	10	25
3	500	10	50
4	750	10	75
5	1000	10	100
6	1250	10	125
7	1500	10	150

4.3.2.3 การทดสอบ bias และ precision ของ curcumin

4.3.2.3.1. ทดสอบ bias โดยทำ curcumin standard addition ลงในตัวอย่างที่ปรับให้มีความเข้มข้นที่ความเข้มข้น 3 ระดับ คือ 75, 100 และ 125 µg/mL ซึ่งมีขั้นตอนการเตรียมตาม table 3 โดยทำความเข้าใจความเข้มข้นละ 10 ซ้ำๆ ละ 2 injection ทำการทดสอบ 3 วัน เหน็จการยอมรับ % recovery อยู่ในช่วง 98-102 และ %RSD ≤ 1.9 (AOAC, 2019)

Table 3 Preparation of a solution for bias testing curcumin.

No.	Turmeric powder (mg)	Stock standard curcumin (5 mg/mL)	The added and native analyte conc.	The concentration of added and native analytes
1	200	250 µL	Std 25 µg/mL sample 50 µg/mL	75 µg/mL
2	200	500 µL	Std 50 µg/mL sample 50 µg/mL	100 µg/mL
3	200	750 µL	Std 75 µg/mL sample 50 µg/mL	125 µg/mL

4.3.2.3.2. การทดสอบ precision (repeatability) ของตัวอย่าง curcumin โดยเตรียมตัวอย่างความเข้มข้น 100 µg/mL ตาม table 4 โดยเตรียมจำนวน 10 ซ้ำๆ ละ 2 injection ทำการทดสอบ 3 วัน เหน็จการยอมรับ %RSD ≤ 1.9 (AOAC, 2019)

Table 4 Preparation of a solution for precision testing curcumin.

Stock curcumin (1.0 mg/mL)	Volume (ACN)	Final curcumin conc. (µg/mL)
(1)	(2)	(3)
1000	10	100

4.3.1.3.3 การทดสอบ intermediate precision คำนวณจากการทำ precision ทำการทดสอบ 3 วัน เหน็จการยอมรับ %RSD ≤ 1.9 (AOAC, 2019)

4.4 การทดสอบ LOQ (limit of quantitation)

ทดสอบที่ความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถวิเคราะห์ได้ใน curcumin เตรียม โดยการประเมินจาก signal to noise จาก standard solution ณ จุดที่ความเข้มข้นให้สัญญาณ ≥ 10

4.5 ความจำเพาะเจาะจงต่อสารที่ทดสอบ (selectivity)

โดยแสดงความสามารถของการแยกสาร (resolution) ระหว่างพีก curcumin กับ พีกสารอื่น การศึกษานี้ใช้สารกลุ่ม Curcuminoids 2 ชนิด ได้แก่ bisdemethoxycurcumin และ demethoxycurcumin ที่ความเข้มข้น 100 $\mu\text{g/mL}$ โดยทำการทดสอบจำนวน 3 ซ้ำ ซ้ำละ 2 injection เหนือการยอมรับ พีกของสาร bisdemethoxycurcumin และ demethoxycurcumin ไม่รบกวนพีกของ curcumin (Eurachem, 2014)

4.6 Robustness

เป็นการทดสอบความคงทนของวิธีว่าเมื่อมีการเปลี่ยนแปลงปัจจัยที่ใช้ในการทดสอบแล้วจะยังให้ผลการทดสอบเหมือนเดิมหรือไม่ โดยปัจจัยต่างๆ มีดัง table 5 และวางแผนการทดสอบตามวิธีของ Youden's ดัง table 6 โดยเตรียม standard stock solution ให้ได้ความเข้มข้น 100 $\mu\text{g/mL}$ ตาม table 4 ซึ่งเตรียมจำนวน 2 ซ้ำๆ ละ 2 injection

Table 5 Parameters for the robustness testing.

Factor	Units	Limits	Level (-1)	Level (+1)	Normal value
Injection volume (A/a)	$^{\circ}\text{C}$	± 10	10 = A	30 = a	20
The column temperature (B/b)	$^{\circ}\text{C}$	± 5	30 = B	40 = b	35
Percentage organic solvent (%B) in the mobile phase at start of the gradient (C/c)	%	± 1	35 = C	45 = c	40
Concentration buffer solvent (%A) in the mobile phase (D/d)	%	± 0.5	1.5 = D	2.5 = d	2.0
Extraction temperature (E/e)	$^{\circ}\text{C}$	± 5	35 = E	45 = e	40
Time of extraction cycles (F/f)	min	± 5	10 = F	20 = f	15
The wavelength of detector (G/g)	nm	± 5	420 = G	430 = g	425

Table 6 Robustness test plan with Youden's method.

Parameter	จำนวนการทดสอบ							
	1	2	3	4	5	6	7	8
Injection volume (A/a)	A	A	A	A	a	a	a	a
The column temperature (B/b)	B	B	b	b	B	B	b	b
Percentage organic solvent (%B) in the mobile phase at start of the gradient (C/c)	C	c	C	c	C	c	C	c
Concentration buffer solvent (%A) in the mobile phase (D/d)	D	D	d	d	d	d	D	D
Extraction temperature (E/e)	E	e	E	e	e	E	e	E
Time of extraction cycles (F/f)	F	f	f	F	F	f	f	F
The wavelength of detector (G/g)	G	g	g	G	g	G	G	g
ผล	S	T	U	V	W	X	Y	Z

5. ผลการทดลอง

5.1 ทำการปรับแต่งค่า parameters ของเครื่อง HPLC-DAD ยี่ห้อ Shimadzu รุ่น LC-40D สำหรับการทดสอบ curcumin ได้ condition ที่เหมาะสมสำหรับการทดสอบความใช้ได้ของวิธี ดัง table 7

Table 7 HPLC condition for the separation of curcumin.

Parameters	Condition
Column:	HPLC column C ₁₈ , 250 x 4.6 mm ID, 5 µm, Vertical
Mobile phase:	2% acetic acid in water: acetonitrile, V/V
Isocratic program:	60% acetic acid in water: 40% acetonitrile V/V
Flow rate:	2.0 mL/min
Injection volume:	20 µL
Detector:	DAD 425 nm

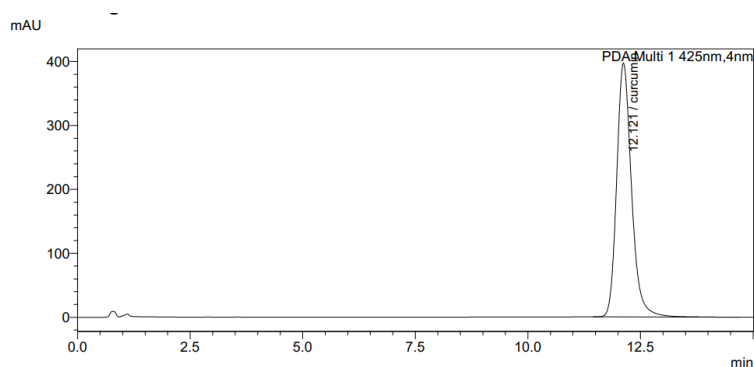


Fig.4. Chromatogram of Curcumin (condition in Table 7).

Table 8 Summary of peak parameters for curcumin separation

Name	RT (min)	Area	Height	Tailing F.	Resolution	k'
Curcumin	12.121	9080187	396972	1.226	0.000	0.0

5.2 ผลการทดสอบช่วงของการวิเคราะห์ (range) สำหรับ curcumin โดยเตรียม calibration curve ให้มีความเข้มข้นอยู่ในช่วง 10 – 300 µg/mL (10, 25, 50, 75, 100, 125, 150, 200, 250 และ 300 µg/mL) ให้ผลดัง table 9 และ Fig. 5

Table 9 Working range of curcumin.

Concentration (µg/mL)	Curcumin (Area)
10	904,833
25	2,269,482
50	4,637,180
75	7,140,457
100	9,285,321
125	12,185,201
150	14,737,676
200	19,484,864
250	24,838,331
300	28,997,711
Slope	98,462.5878
Intercept	204,337.1378
r ²	0.99941
r	0.99970

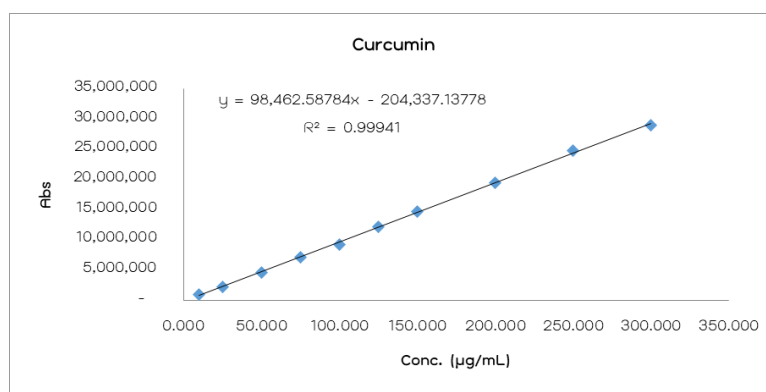


Fig.5. Working range of curcumin.

ผลการทดสอบพบว่า range ของ curcumin ที่ระดับความเข้มข้นในช่วง 10 – 300 µg/mL มีความเป็นเส้นตรงตลอดช่วงดังกล่าว โดยมีค่า $r = 0.9994$ ผ่านเกณฑ์การทดสอบที่กำหนด

5.3 ผลการทดสอบความเป็นเส้นตรง (linearity) โดยเตรียม calibration curve ของ Curcumin ให้มีความเข้มข้นอยู่ในช่วง 10 – 150 µg/mL (10, 25, 50, 75, 100, 125, และ 150 µg/mL) ให้ผลดัง table 10

Table 10 Linearity of curcumin.

Concentration (µg/mL)	Day 1	Day 2	Day 3
10	912,503	925,611	932,740
25	2,235,684	2,237,800	1,972,624
50	4,578,334	4,573,179	4,356,669
75	7,063,130	7,083,900	6,848,464
100	9,103,377	9,095,955	9,079,777
125	11,946,333	11,952,869	11,681,378
150	14,508,461	14,525,631	14,483,826
Slope		96,780	
Intercept		-249194.47	
r ²		0.9982	
r		0.9991	

ผลการทดสอบความเป็นเส้นตรงของ curcumin ได้ค่า r = 0.9991 ซึ่งเกณฑ์กำหนดไว้ที่ r ≤ 0.99 ผ่านเกณฑ์การทดสอบ

5.4 ผลการทดสอบ bias และ precision ของ curcumin

5.4.1 ผลการทดสอบ bias ของ curcumin ได้ผลทดสอบ ดัง table 11

Table 11 Accuracy of curcumin LC analysis.

No.	Day 1			Day 2			Day 3		
	75	100	125	75	100	125	75	100	125
	µg/mL	µg/mL	µg/mL	µg/mL	µg/mL	µg/mL	µg/mL	µg/mL	µg/mL
1	80.10	104.81	131.00	79.91	104.63	130.39	80.79	104.58	129.80
2	80.18	105.08	131.20	79.96	104.38	130.58	80.83	104.70	129.66
3	80.34	105.13	131.13	80.06	104.57	130.46	80.67	104.70	129.80
4	80.24	105.12	131.18	80.11	104.79	130.70	80.38	104.72	129.63
5	80.23	105.12	131.26	80.14	104.48	130.54	80.68	104.85	129.63
6	80.44	103.80	131.13	80.04	103.84	130.79	80.64	104.77	129.63
7	80.44	104.00	131.21	80.02	103.73	130.81	80.71	104.84	129.56
8	80.36	103.86	130.96	80.06	103.75	130.71	79.99	104.93	129.52
9	80.30	105.05	130.55	80.27	104.84	130.31	79.98	104.85	129.90
10	80.32	104.64	130.45	80.27	104.89	129.61	80.01	104.99	130.03
Mean	80.30	104.66	131.01	80.08	104.39	130.49	80.47	104.79	129.72
SD	0.11	0.56	0.28	0.12	0.46	0.35	0.35	0.12	0.16
%RSD	0.13	0.53	0.22	0.15	0.44	0.27	0.43	0.12	0.12
%Recovery	100.86	100.72	101.50	100.19	100.44	100.49	100.12	101.21	99.76

ผลการทดสอบ bias ของสารสำคัญ curcumin ที่ระดับความเข้มข้น 75, 100 และ 125 µg/mL อยู่ในเกณฑ์ 98 – 102 % RSD

5.4.2 ผลการทดสอบ LOQ โดยการประเมินจาก signal to noise จาก standard solution ณ จุดที่ความเข้มข้นให้สัญญาณ ≥ 10 พบว่าจุดต่ำสุดที่สามารถวิเคราะห์ได้อยู่ที่ความเข้มข้น 0.1 mg/mL (n=10)

5.4.3 ผลการทดสอบ precision โดยทดสอบตัวอย่าง curcumin ที่ ความเข้มข้น 100 $\mu\text{g/mL}$ จำนวน 10 ตัวอย่าง ทำการทดสอบ 3 วัน ได้ผลดัง table 12

Table 12 Precision of curcumin LC analysis.

Concentration ($\mu\text{g/mL}$)	Day 1	Day 2	Day 3
1	111.00	109.50	110.26
2	110.24	109.45	109.92
3	108.69	108.18	110.08
4	112.71	111.70	110.65
5	114.83	111.94	110.98
6	112.96	111.68	111.16
7	113.57	111.68	111.10
8	112.42	111.11	109.87
9	113.07	110.93	110.39
10	112.63	110.21	110.14
Mean	112.21	110.64	110.46
SD	1.770	1.259	0.487
%RSD _r	1.58	1.14	0.44
%RSD _R		1.33	

*หมายเหตุ เมื่อ %RSD_r คือ repeatability และ %RSD_R คือ intermediate precision

5.4.4 ผลการทดสอบความจำเพาะเจาะจงต่อสารที่ทดสอบ (selectivity) โดยทำการทดสอบกับสารมาตรฐานในกลุ่ม Curcuminoids 2 ชนิด ได้แก่ demethoxycurcumin และ bisdemethoxycurcumin และตัวอย่างผงขมิ้นชัน พบว่าในตัวอย่างผงขมิ้นชันพบพีคของสาร curcumin, demethoxycurcumin และ bisdemethoxycurcumin ซึ่งทั้ง 3 ชนิด ไม่เกิดการ co-elute สามารถแยกออกจากกันอย่างชัดเจน

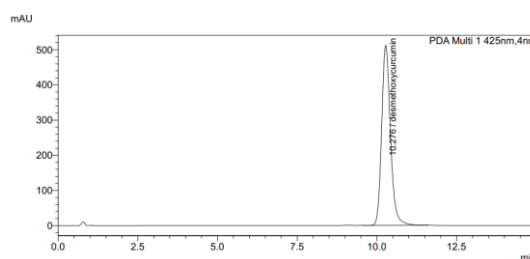
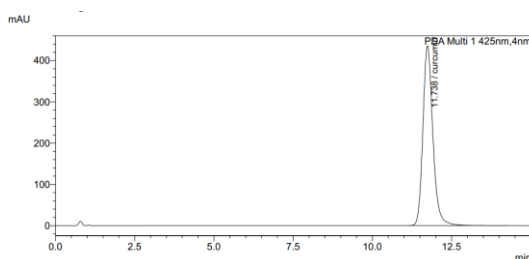


Fig.6. chromatogram of curcumin. Fig.7. chromatogram of demethoxycurcumin.

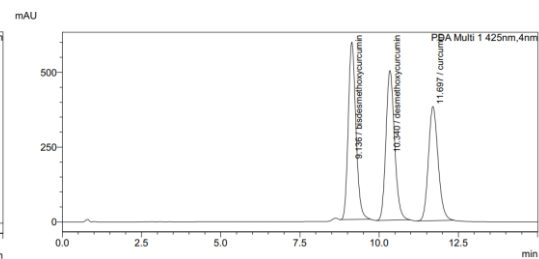
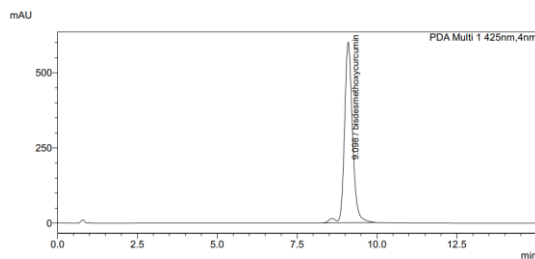


Fig.8. chromatogram of bisdemethoxycurcumin. Fig.9. chromatogram of mix standard.

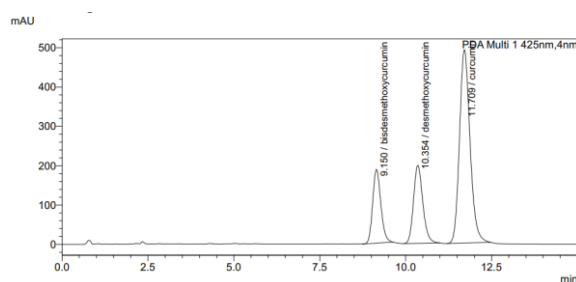


Fig.10. chromatogram of sample curcumin.

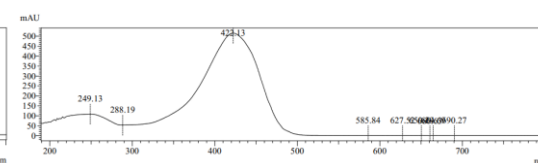
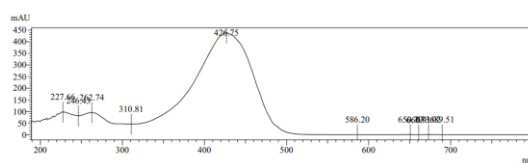


Fig.11. spectrum of curcumin. Fig.12. spectrum of demethoxycurcumin.

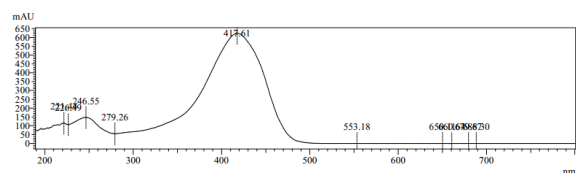
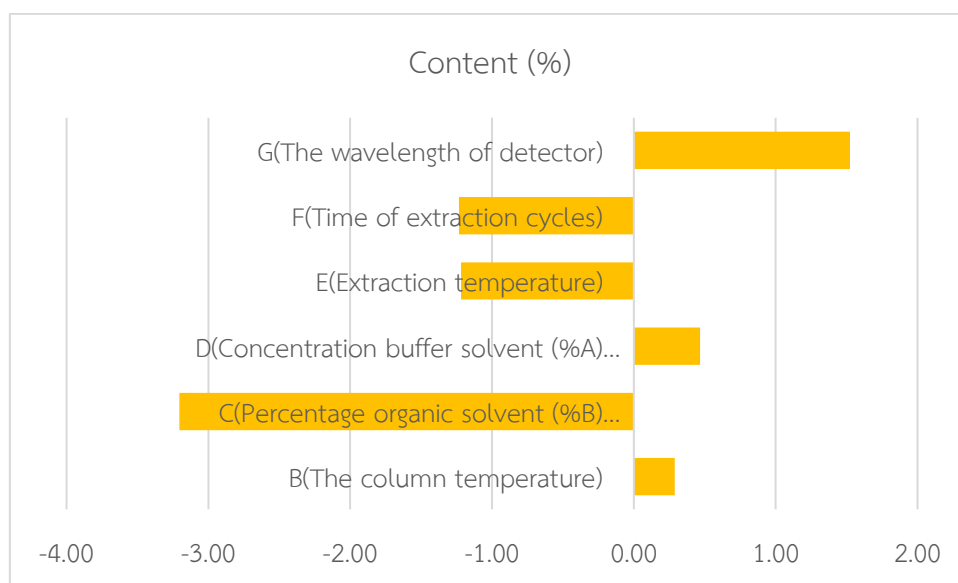


Fig.13. spectrum of bisdemethoxycurcumin.

5.4.5 ผลการทดสอบ robustness ทดสอบตามวิธีของ Youden's ได้ผลดัง table 13

Table 13 Summary of eight robustness evaluation parameters for curcumin LC analysis.

Effect	Content (%)	Retention time	Tailing factor	Resolution
Injection volume (A = 10 μ L, a = 30 μ L)	-109.92	3.31	0.00	0.41
The column temperature (B = 30 $^{\circ}$ C, b = $^{\circ}$ C)	0.29	5.63	-0.01	-0.34
Percentage organic solvent (%B) in the mobile phase at start of the gradient (C = 35%, c = 40%)	-3.21	15.22	-0.02	0.60
Concentration buffer solvent (%A) in the mobile phase (D = 1.5%, d = 2.5%)	0.47	-1.50	0.00	-0.28
Extraction temperature (E = 35 $^{\circ}$ C, e = 45 $^{\circ}$ C)	-1.22	3.10	-0.02	0.17
Time of extraction cycles (F = 10 min, f = 20 min)	-1.23	4.82	-0.02	0.04
The wavelength of detector (G = 420 nm, g = 430 nm)	1.53	-1.56	0.00	-0.15



**หมายเหตุ สำหรับพารามิเตอร์ Injection volume มีอิทธิพลต่อความคงทนสูง (-109.92)

Fig.14. A summary of the variables that influence the robustness of curcumin LC analysis in terms of %content.

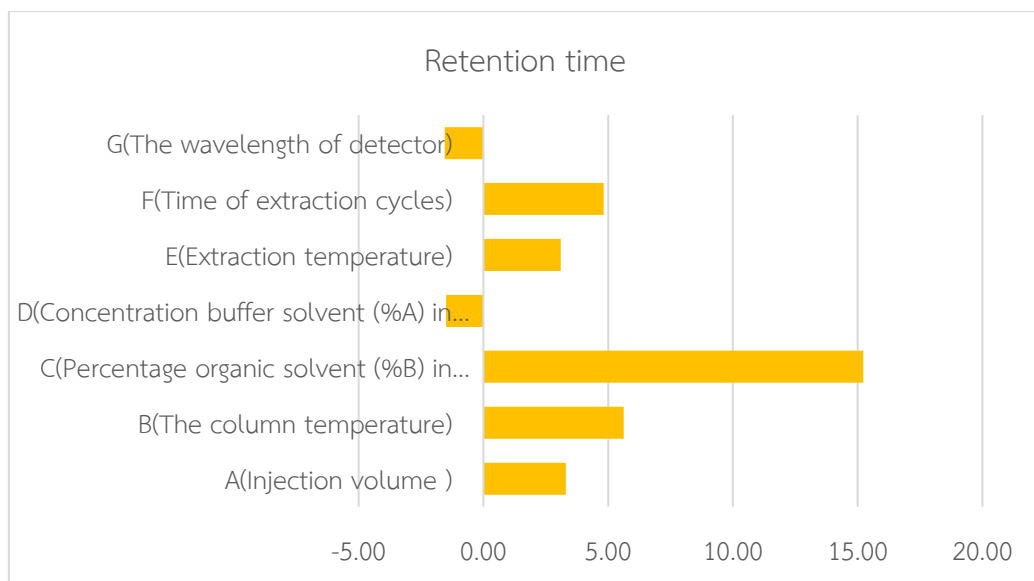


Fig.15. A summary of the variables that influence the robustness of curcumin LC analysis in terms of retention time.

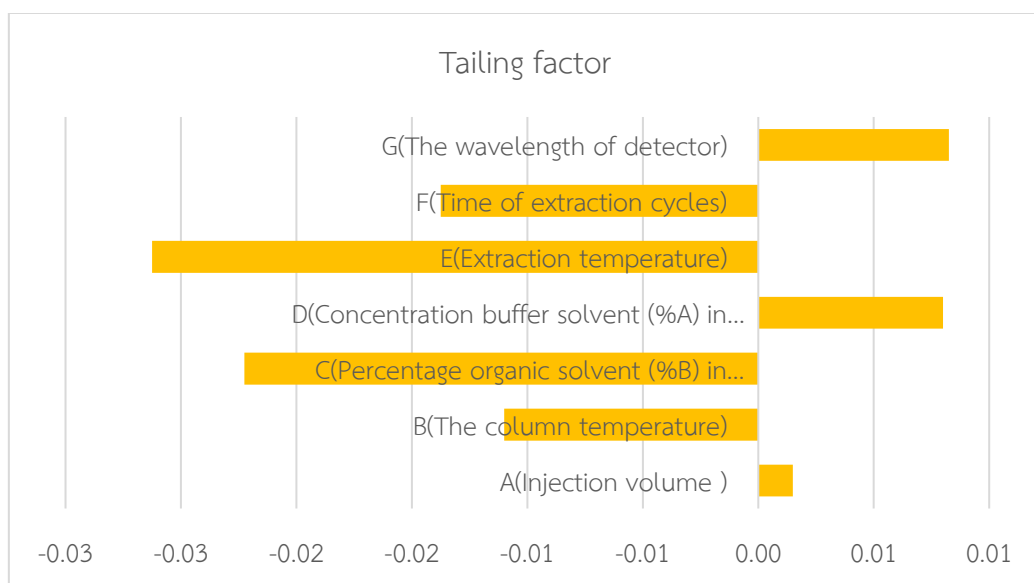


Fig.16. A summary of the variables that influence the robustness of curcumin LC analysis in terms of tailing factor.

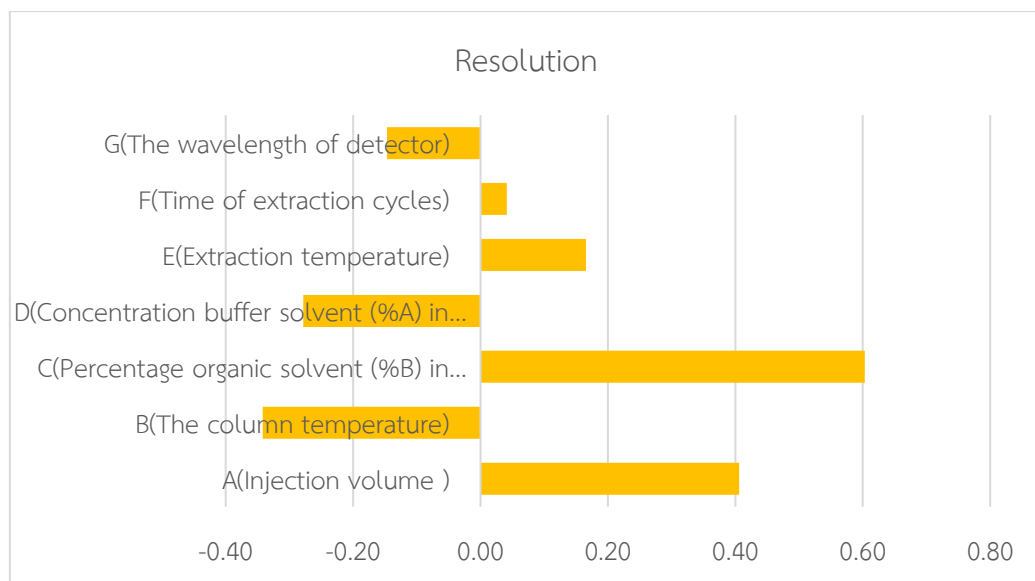


Fig.17. A summary of the variables that influence the robustness of curcumin LC analysis in terms of resolution.

ผลการทดสอบ robustness จะพิจารณา 4 พารามิเตอร์ ประกอบไปด้วย %content, retention time, tailing factor และ resolution การหาความเข้มข้นของสาร (%content) จากผลการทดสอบพบว่า การเปลี่ยนแปลงของ injection volume ในการวิเคราะห์ส่งผลต่อ %content ของสารมากที่สุด และการปรับเปลี่ยน %organic solvent หากใช้ organic solvent มากขึ้นจะทำให้ %content ลดลง สำหรับพารามิเตอร์อื่น ๆ ส่งผลเพียงเล็กน้อยเท่านั้น สำหรับ retention time จากผลการทดสอบพบว่า การปรับเปลี่ยน %organic solvent ส่งผลต่อ retention time หากใช้ปริมาณของ organic solvent มากขึ้นจะทำให้ retention time ลดลง และหากใช้ปริมาณของ organic solvent ลดลง จะทำให้ retention time เพิ่มมากขึ้น สำหรับพารามิเตอร์อื่น ๆ ส่งผลเพียงเล็กน้อยเท่านั้น ส่วน tailing factor และ resolution พบว่าการปรับเปลี่ยนพารามิเตอร์ที่ทำการทดสอบส่งผลต่อ tailing factor และ resolution เพียงเล็กน้อยเท่านั้น

6. สรุปผลการทดลอง

การทดสอบความใช้ได้ของสารกลุ่ม curcumin ในตัวอย่างไขมันชั้นผง ด้วยเทคนิค HPLC-DAD พบว่าการทดสอบ range, linearity, bias, precision, LOQ, selectivity ทุกพารามิเตอร์ผ่านเกณฑ์การยอมรับที่กำหนดไว้ทั้งหมด (Eurachem, 2014), (AOAC, 2019) รวมถึง robustness ซึ่งสามารถวิเคราะห์ curcumin ในผงไขมันชั้น ได้อย่างถูกต้อง และแม่นยำ

7. ข้อเสนอแนะ

การทดสอบในครั้งนี้ใช้ตัวอย่างขมิ้นชันผงเท่านั้น กรณีต้องการตรวจในตัวอย่างที่เป็นรูปแบบอื่น ควรทำการทวนสอบวิธีเพิ่มเติม

8. กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณผู้อำนวยการสำนักตรวจสอบคุณภาพสินค้าปศุสัตว์ที่พิจารณาให้ดำเนินการในปีงบประมาณ 2565 เจ้าหน้าที่ห้องปฏิบัติการ กลุ่มตรวจสอบคุณภาพยาสัตว์ฯ ที่ช่วยเหลือในการปฏิบัติงานให้สำเร็จลุล่วงไปด้วยดี

9. เอกสารอ้างอิง

- AOAC 2019. AOAC Guidelines for Standard Method Performance Requirements official Methods for Analysis. 21st Ed. Appendix, AOAC INTERNATIONAL. pp.1-17.
- Monton C., L. Charoenchai, J. Suksaree and L. Sueree (2016) Quantitation of curcuminoid contents, dissolution profile, and volatile oil content of turmeric capsules produced at some secondary government hospitals. Rangsit University. pp.1-7.
- Tayyem R., H. Dennis, W. Al-Delaimy and C. Rock (2006) Curcumin Content of Turmeric and Curry Powders. Nutrition and Cancer Volume 55, 2006 - Issue 2 (2006) Pages 126-13.
- Wichitnithad W., N. Jongaroonngamsang, S. Pumangura and P. Rojsitthisak (2008) A Simple Isocratic HPLC Method for the Simultaneous Determination of Curcuminoids in Commercial Turmeric Extracts. Phytochem. Anal. 2009; 20: 314–319
- กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ Thai Herbal pharmacopoeia (2016) ขมิ้นชัน (KHAMIN CHAN) 145-151