

การพัฒนาและพิสูจน์ความใช้ได้ของวิธีทดสอบ curcumin ในตัวอย่างขมิ้นชันผงด้วยเทคนิค HPTLC

ชูศักดิ์ อาจสูงเนิน สุนันท์ กิตติจารุวัฒนา นครรัช อ่องพิมาย
ศศิกานต์ วุฒิกานต์นนท์ รัตนาภรณ์ ชนประชา

บทคัดย่อ

ทำการพัฒนาและทดสอบความใช้ได้ของวิธีทดสอบหาปริมาณเคอร์คูมิน (curcumin) ในตัวอย่างขมิ้นชันผงด้วยเทคนิค high-performance thin-layer chromatography (HPTLC) โดยใช้ HPTLC plate silica gel 60 ใช้สารละลายเฟสเคลื่อนที่คือ toluene: dichloromethane: ethanol: acetic acid (39: 59: 2: 2, v/v/v/v) ค่าการตรวจวัดที่ 420 nm พบว่า มีความเป็นเส้นตรงที่ระดับความเข้มข้น 50 -150 µg/mL ได้ค่า correlation coefficient (r) เท่ากับ 0.9993 การทดสอบความแม่นยำ มีร้อยละการคืนกลับอยู่ในช่วง 99.10 – 101.47 การทดสอบความเที่ยง (repeatability) อยู่ในช่วง 0.17 – 0.59 และ intermediate precision เท่ากับ 0.48 %RSD มีระดับต่ำสุดที่สามารถวัดปริมาณ curcumin ได้ในตัวอย่าง (LOQ) เท่ากับ 50 µg/mL และสามารถแยก curcumin ออกจาก bisdemethoxycurcumin และ demethoxycurcumin ได้ ดังนั้นจากผลการทดสอบความใช้ได้ของวิธีอยู่ในเกณฑ์การยอมรับ สามารถนำไปทดสอบหาปริมาณสารสำคัญ curcumin ในตัวอย่างขมิ้นชันผงได้

คำสำคัญ : ขมิ้นชันผง เคอร์คูมิน ทดสอบความใช้ได้ของวิธี HPTLC

กลุ่มตรวจสอบคุณภาพยาสัตว์และวัตถุอันตรายด้านการปศุสัตว์ สำนักตรวจสอบคุณภาพสินค้าปศุสัตว์ กรมปศุสัตว์

HPTLC method development and validation for determining curcumin in turmeric powder

Chusak Ardsoongnearn, Sunan Kittijaruwattana, Nakhonratch Ongpimai
Sasikan Wutthikannon and Rattanaporn Chonpracha

Abstract

The development and validation of the high-performance thin-layer chromatography (HPTLC) method for the curcumin assay in samples of turmeric powder (*Curcuma longa* L.) were completed. An HPTLC plate with silica gel 60 as the stationary phase was used in the procedure. Toluene, dichloromethane, ethanol, and acetic acid (39: 59: 2: 2, v/v/v/v) made up the solvent system. The extracted chromatogram had a wavelength of 420 nm. The linearity was examined with a correlation coefficient (*r*) of 0.9993 at concentrations between 50 and 150 µg/mL. The accuracy ranged from 99.10 to 101.47 % in terms of recovery percentage. The accuracy (repeatability) ranged from 0.17 to 0.59 over the course of three days, and the intermediate precision was 0.48 %RSD. The sample's curcumin has a limit of quantification (LOQ) of 50 µg/mL. Demethoxycurcumin and bisdemethoxycurcumin were able to be distinguished from curcumin. The outcome of the approach validation was satisfactory. Therefore, the quantification of curcumin in the turmeric powder sample can be performed using this validation approach.

Keywords : Turmeric powder, curcumin, method validation, HPTLC

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

การพัฒนาและพิสูจน์ความใช้ได้ของวิธีทดสอบ curcumin ในตัวอย่างขมิ้นชันผงด้วยเทคนิค HPTLC

ชูศักดิ์ อาจสูงเนิน สุนันท์ กิตติจารุวัฒนา นครรัช อ่องพิมาย
ศศิกานต์ วุฒิกานต์นนท์ รัตนาภรณ์ ชนประชา

บทนำ

กรมปศุสัตว์โดยคณะกรรมการส่งเสริมและการขับเคลื่อนการนำสมุนไพรไทยกัญชาและกัญชง มาใช้ในการเลี้ยงปศุสัตว์และสัตว์เลี้ยง ผลักดันให้มีการใช้สมุนไพรไทยในการเลี้ยงสัตว์ สำนักตรวจสอบคุณภาพสินค้าปศุสัตว์ จึงเตรียมความพร้อมห้องปฏิบัติการด้านสมุนไพร โดยศึกษาคุณสมบัติของสมุนไพร เช่น การพิสูจน์เอกลักษณ์ การตรวจสอบคุณภาพเชิงปริมาณ เพื่อเป็นการเพิ่มศักยภาพขั้นพื้นฐานและเตรียมความพร้อมในการแยกและผลิตสารสำคัญจากสมุนไพรสำหรับความร่วมมือกับหน่วยงานอื่นภายในกรมปศุสัตว์ต่อไปในอนาคต

ขมิ้นชัน (*Curcuma Longa* L.) เป็นสมุนไพรที่ได้รับการบรรจุอยู่ในบัญชียาหลักแห่งชาติ ในส่วนของบัญชียาจากสมุนไพร ปรับปรุงล่าสุด เรื่องบัญชียาหลักแห่งชาติ (ฉบับที่ 2) พ.ศ.2555 (ยาพัฒนาจากสมุนไพร ยารักษากลุ่มอาการของระบบทางเดินอาหาร) ซึ่งมีสรรพคุณทางยาอยู่ในกลุ่มยาขับลม บรรเทาอาการท้องอืด ท้องเฟ้อ โดยมีสารสำคัญที่ใช้ในการรักษาเช่น เคอร์คูมิน (curcumin) บิสดีเมท็อกซีเคอร์คูมิน (bisdemethoxycurcumin) และ ดีเมท็อกซีเคอร์คูมิน (demethoxycurcumin) จึงเป็นพืชสมุนไพรที่มีความสำคัญ สามารถใช้ได้ทั้งในมนุษย์และสัตว์ เหมาะกับการใช้เป็นต้นแบบในการศึกษาและพัฒนาวิธีทดสอบในห้องปฏิบัติการ

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

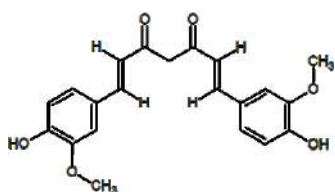
Paramasivam et al. (2009) ได้ทำการทดสอบวิธีวิเคราะห์หาปริมาณยา curcuminoids ในเหง้าขมิ้นชัน โดยสารที่มีฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาประกอบด้วย curcumin, demethoxycurcumin และ bisdemethoxycurcumin การเตรียมตัวอย่างทำโดยนำเหง้ามาสกัดด้วย soxhlet extraction ก่อนนำไปแยกสารด้วย column chromatography พิสูจน์เอกลักษณ์ด้วย spectroscopy และหาความบริสุทธิ์ด้วยเทคนิค high-performance thin layer chromatography ศึกษาการแยกด้วย mobile phase 5 ชนิด พบว่า mobile phase ที่สามารถแยก curcuminoids ได้ดีที่สุดคือ chloroform : methanol (48 : 2, v/v) scanning wavelength 425 nm

Kharat et al. (2017) ได้ทำการพัฒนาวิธีและทดสอบความใช้ได้ของวิธีของสาร curcumin และ galangin ในยาสมุนไพร ด้วยเทคนิค HPTLC โดยนำตัวอย่างที่เป็น capsules มาสกัดด้วย methanol และพ่นลง TLC aluminium plate silica gel 60 F254 ขนาด 20 × 10 cm ใช้ mobile phase เป็น n-hexane : ethyl acetate : acetic acid : methanol (7:2:0.5:0.5 v/v/v/v) ซึ่งทำให้มีตัวล้างหน้าใน chamber เป็นเวลา 30 นาที scanning ที่ 404 nm และทดสอบความใช้ได้ของ

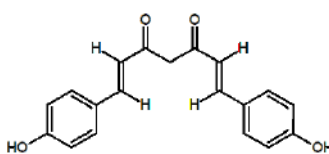
วิธี ตาม ICH guideline โดย range ของ curcumin และ galangin อยู่ในช่วง 80 – 450 ng และ 200 – 1200 ng ตามลำดับ ค่า $r^2 \geq 0.9998$ และ LOD ของ curcumin และ galangin เป็น 18.31 และ 40.50 ng ตามลำดับ

สุนันท์ และคณะ (2562) ได้ศึกษาและพัฒนาวิธีพิสูจน์เอกลักษณ์สารสำคัญ curcumin ในผงขมิ้นชัน โดยดัดแปลงวิธีจาก Thai Herbal Pharmacopoeia (2016) ขมิ้นชัน (*Curcuma Longa* L.) โดยเปลี่ยนชนิด TLC plate ชนิด silica gel G เป็น silica gel 60 เปลี่ยนขนาด TLC plate จาก 10 x 20 เซนติเมตร เป็นขนาด 10 x 10 เซนติเมตร เปลี่ยน mobile phase เป็น toluene: dichloromethane: ethanol (39:59:2 v/v/v) และไม่ใช้สารเคมีในการ derivatization พบว่าค่า Rf ที่ได้จากพัฒนาแตกต่างกันไม่เกิน 0.01 และได้มีการยืนยันชนิดสารด้วย LC-MS ion trap

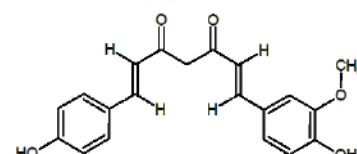
วิธีที่พัฒนาขึ้นสามารถตรวจพบสารสำคัญ curcumin ในตัวอย่างขมิ้นชันผง จึงนำวิธีที่พัฒนาดังกล่าวมาศึกษาต่อในการหาปริมาณสำคัญ curcumin และทดสอบความใช้ได้ของวิธีต่อไป



รูปที่ 1. curcumin



รูปที่ 2 bisdemethoxycurcumin



รูปที่ 3 demethoxycurcumin

1. วัตถุประสงค์

เพื่อพัฒนาและพิสูจน์ความใช้ได้ของวิธีทดสอบ curcumin ในตัวอย่างขมิ้นชันผงด้วยเทคนิค High performance thin layer chromatography (HPTLC)

2. ขอบข่าย

ใช้สำหรับหาปริมาณสารสำคัญ curcumin ในตัวอย่างขมิ้นชันผงด้วย เทคนิค HPTLC

3. ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

ได้วิธีทดสอบที่สามารถทดสอบและหาปริมาณสารสำคัญ curcumin ในตัวอย่างขมิ้นชันผงได้

4. วิธีดำเนินการ

4.1 เครื่องมือและอุปกรณ์

4.1.1 เครื่องชั่งน้ำหนักไฟฟ้าทศนิยม 5 ตำแหน่ง ยี่ห้อ Mettler Toledo รุ่น XP205DR

4.1.2 ชุดวิเคราะห์ชนิดและปริมาณสารโดยหลักการ HPTLC พร้อมอุปกรณ์ ยี่ห้อ CAMAG รุ่น AUTOMATIC TLC SAMPLER4

4.1.3 เครื่องตรวจวัดปริมาณ ยี่ห้อ CAMAG รุ่น TLC scanner3

4.1.4 เครื่องถ่ายภาพพร้อมเก็บข้อมูลบนแผ่น TLC/HPTLC ยี่ห้อ CAMAG รุ่น TLC Visualizer

4.1.5 TLC developing chamber

- 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 Fume Hood ยี่ห้อ NewLab รุ่น 252N
- 4.1.10 เครื่อง Hot plate magnetic stirrer
- 4.1.11 Vortex mixer
- 4.2 วัสดุวิทยาศาสตร์
 - 4.2.1 Acetonitrile, AR grade
 - 4.2.2 Ammonia solution, AR grade
 - 4.2.3 Dichloromethane, AR grade
 - 4.2.4 Ethanol, AR grade
 - 4.2.5 Formic acid, AR grade
 - 4.2.6 Glacial acetic acid, HPLC grade
 - 4.2.7 Methanol, AR grade
 - 4.2.8 Toluene, AR grade
 - 4.2.9 Amber glass vial ขนาด 16 mL
 - 4.2.10 Beaker แก้ว ขนาด 50 และ 100 mL
 - 4.2.11 Cylinder ขนาด 10, 25, 50 และ 100 mL
 - 4.2.12 Centrifuge tube ขนาด 50 mL
 - 4.2.13 Disposable syringe ชนิดไม่มีหัวเข็ม ขนาด 1 mL
 - 4.2.14 HPTLC plate silica gel 60 ขนาด 10 x 10 cm
 - 4.2.15 HPTLC plate silica gel 60 ขนาด 10 x 20 cm
 - 4.2.16 HPTLC amber vial พร้อมฝา ขนาด 2 mL
 - 4.2.17 Syringe membrane filter, PTFE, 13 mm 0.45 μ m
 - 4.2.18 TLC plate silica gel 60 ขนาด 10 x 10 cm
 - 4.2.19 Syringe membrane filter, nylon, 13 mm 0.45 μ m
 - 4.2.20 Volumetric flask ขนาด 10, 25, 50 และ 100 mL class A
 - 4.2.21 กระดาษซังสาร
 - 4.2.22 กรวยกรอง
 - 4.2.23 ขวดใส่สารละลาย ขนาด 100, 250 และ 500 mL
- 4.3 สารมาตรฐานและตัวอย่าง
 - 4.3.1 สารมาตรฐาน curcumin purity, 97.6 % ยี่ห้อ HPC
 - 4.3.2 สารมาตรฐาน bisdemethoxycurcumin, purity 100 % ยี่ห้อ USP
 - 4.3.3 สารมาตรฐาน demethoxycurcumin purity, 100 % ยี่ห้อ USP
 - 4.3.4 ตัวอย่างขมิ้นชันผงจากท้องตลาด

4.4 การพัฒนาวิธีทดสอบหาปริมาณสารสำคัญ curcumin

- 4.4.1 การเตรียม stock สารมาตรฐาน curcumin ที่ความเข้มข้น 1 mg/mL โดยชั่งสารมาตรฐาน curcumin ลงใน volumetric flask ละลายและปรับปริมาตรด้วย methanol
- 4.4.2 การเตรียม working standard solution ที่ความเข้มข้น 100 µg/mL โดยปิเปต 1 mL ของ stock สารมาตรฐาน curcumin ความเข้มข้น 1 mg/mL ลงใน volumetric flask ขนาด 10 mL ปรับปริมาตรด้วย methanol
- 4.4.3 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
- 4.4.4 ทดสอบหาสารละลายเฟสเคลื่อนที่ที่เหมาะสมสำหรับหาปริมาณ curcumin ด้วยเทคนิค HPTLC ตามตารางที่ 1

ตารางที่ 1 ศึกษา mobile phase ที่เหมาะสม ในการหาปริมาณ curcumin ดัดแปลงจากวิธี in-house ปี (2562)

Parameter	In-house method
plate	TLC plate Silica 60 aluminium sheet ขนาด 10 x 10 cm
Mobile phase	Toluene : dichloromethane : ethanol (39:59:2, v/v/v)
Injection volume	2 µL
Saturation	10 min
Solvent front	80 mm
Visualization	254 nm, 366nm
Detection	Scanner 3, extracted chromatogram at 420 nm

ตารางที่ 2 ศึกษาความมีขั้ว และความเป็น กรด – เบส ของ mobile phase ที่เหมาะสม ในการหาปริมาณ curcumin ดัดแปลงจากวิธี in-house ปี (2562)

Condition	Toluene	dichloromethane	ethanol	NH ₃	formic acid	acetic acid
1	39	59	2	-	-	-
2	39	59	1	1	-	-
3	39	59	2	-	2	-
4	39	59	1.5	-	0.5	-
5	39	59	1	-	-	1
6	39	59	3	-	-	1
7	39	59	2	-	-	2

4.4.5 ศึกษาหาวิธีการสกัดที่เหมาะสมเพื่อหาลอยละการคืนกลับของสารสำคัญ curcumin ในตัวอย่างขมิ้นชันผง

4.4.5.1 การเตรียม stock สารมาตรฐาน curcumin ที่ความเข้มข้น 5 mg/mL โดยชั่งสารมาตรฐาน curcumin ลงใน volumetric flask ละลายและปรับปริมาตรด้วย acetonitrile

4.4.5.2 การเตรียมตัวอย่าง

- Native sample เตรียมโดย ชั่งตัวอย่าง 200 mg (บันทึกน้ำหนักจริง) ลง centrifuge tube ขนาด 50 mL เติม methanol ปริมาตร 20 mL นำไปแช่ 15 นาที centrifuge 10 นาที ที่ 5,500 rpm, 20 องศาเซลเซียส เก็บส่วนใสที่ได้ นำไประเหยแห้งด้วยเครื่อง TurboVap ที่ 40 องศาเซลเซียส (ทำการสกัดซ้ำ 3 รอบ) ละลายและปรับปริมาตรด้วย methanol ให้ได้ 50 mL
- Spike sample เตรียมโดย ชั่งตัวอย่าง 200 mg (บันทึกน้ำหนักจริง) ลง centrifuge tube ขนาด 50 mL ปิเปิด stock สารมาตรฐาน curcumin ที่ความเข้มข้น 5 mg/mL ปริมาตร 250, 500 และ 750 μ L ความเข้มข้นสุดท้ายเป็น 75, 100 และ 125 mg/mL ที่้งไว้ให้แห้งอย่างน้อย 1 ชั่วโมง จากนั้นเติม methanol ปริมาตร 20 mL นำไปแช่ 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

4.4.5.3 Condition สำหรับทดสอบสาร curcumin

ตารางที่ 3 Condition การทดสอบสาร curcumin ตามวิธี in-house

Parameter	In-house method
plate	HPTLC plate Silica 60 ขนาด 10 x 20 cm HPTLC plate Silica 60 ขนาด 10 x 10 cm
Mobile phase	Toluene : dichloromethane : ethanol : acetic acid (39:59:2:2, v/v/v/v)
Injection volume	2 μ L
Saturation	25 min
Solvent front	80 mm
Visualization	254 nm, 366nm
Detection	Scanner 3, extracted chromatogram at 420 nm

4.5 การทดสอบความใช้ได้ของวิธี

ดำเนินการทดสอบความใช้ได้ของวิธีตาม ICH, AOAC 2019 ในหัวข้อ Linear and range, accuracy, precision, LOQ, selectivity และ robustness

4.5.1 ทดสอบช่วงของการวิเคราะห์ (range)

นำ stock standard solution จากข้อ 4.4.5.1 เตรียมเป็น calibration curve ให้มีความเข้มข้นอยู่ในช่วง 10 – 300 µg /mL (10, 25, 50, 75, 100, 125, 150, 200, 250 และ 300 µg /mL) เตรียมความเข้มข้นละ 1 ซ้ำๆ ละ 2 injection นำค่าพื้นที่ใต้พีคของสารมาตรฐานที่ได้จากการวิเคราะห์ด้วยเทคนิค HPTLC และความเข้มข้น ไปสร้างกราฟมาตรฐาน และสมการเส้นตรง หาค่า correlation coefficient (r) เกณฑ์การยอมรับ $r > 0.99$ (AOAC, 2019)

4.5.2 ทดสอบความเป็นเส้นตรง (linearity)

โดยเตรียมสารละลายมาตรฐาน curcumin ให้มีความเข้มข้นอยู่ในช่วง 50 – 150 µg/mL (50, 75, 100, 125 และ 150 µg /mL) เตรียมความเข้มข้นละ 2 ซ้ำๆ ละ 2 injection ทำการทดสอบ 3 วัน นำค่าพื้นที่ใต้พีคของสารมาตรฐานและความเข้มข้นไปสร้างกราฟมาตรฐาน และสมการเส้นตรง หาค่า correlation coefficient (r) เกณฑ์การยอมรับ $r > 0.99$ (AOAC, 2019)

4.5.3 ทดสอบ accuracy

โดยการเติมสารมาตรฐานลงในตัวอย่าง (spike) ให้ตัวอย่างมีความเข้มข้น 3 ระดับ (75, 100 และ 125 µg/mL) และหาร้อยละการคืนกลับ (%recovery) เกณฑ์การยอมรับ %recovery ของการทดสอบ curcumin ในตัวอย่างขมิ้นชันผง มีค่าอยู่ในช่วง 97-103 % ที่ความเข้มข้น 1 % และ %RSD ≤ 1.9 (AOAC, 2019)

4.5.3.1 การเตรียม calibration curve ตามข้อ 4.5.2

4.5.3.2 การเตรียม native sample เตรียมโดย ชั่งตัวอย่าง 200 mg (บันทึกน้ำหนักจริง) ลง centrifuge tube ขนาด 50 mL เติม methanol ปริมาตร 20 mL นำไปแช่ 15 นาที จากนั้น centrifuge 10 นาที ที่ 5,500 rpm, 20 องศาเซลเซียส เก็บส่วนใสที่ได้ นำไประเหยแห้งด้วยเครื่อง TurboVap ที่ 40 องศาเซลเซียส (ทำการสกัดซ้ำ 3 รอบ) ละลายและปริมาตรด้วย methanol ให้ได้ 50 mL

4.5.3.3 Spike sample เตรียมโดย ชั่งตัวอย่าง 200 mg (บันทึกน้ำหนักจริง) ลง centrifuge tube ขนาด 50 mL เปิด stock สารมาตรฐาน curcumin ที่ความเข้มข้น 5 mg/mL ปริมาตร 250, 500 และ 750 µL ได้ความเข้มข้นสุดท้ายเป็น 75, 100 และ 125 mg/mL ทั้งไว้ให้แห้งอย่างน้อย 1 ชั่วโมง จากนั้นเติม methanol ปริมาตร 20 mL นำไปแช่ 15 นาที จากนั้น centrifuge 10 นาที ที่ 5,500 rpm, 20 องศาเซลเซียส เก็บส่วนใสที่ได้ นำไประเหยแห้งด้วยเครื่อง TurboVap ที่ 40 องศาเซลเซียส (ทำการสกัดซ้ำ 3 รอบ) ละลายและปริมาตรด้วย methanol ให้ได้ 50 mL

ตารางที่ 4 การเตรียม standard addition

No.	ตัวอย่างขมิ้นชันผง (mg)	สารมาตรฐาน curcumin ความเข้มข้น 5 mg /mL (uL)	ความเข้มข้นสุดท้าย (µg/mL)
1	200	250	75
2	200	500	100
3	200	750	125

4.5.4 ทดสอบ precision (repeatability และ intermediate precision)

หาค่าความเข้มข้นที่แท้จริงของสาร curcumin ในตัวอย่างขมิ้นชันผงปริมาณ 400 mg โดยเตรียมจำนวน 10 ซ้ำๆ ละ 2 injection ทำการทดสอบ 3 วัน เกณฑ์การยอมรับ $\%RSD \leq 2.7$ (AOAC, 2019)

4.5.4.1 เตรียม standard ตาม calibration curve ตามข้อ 4.5.2 ความเข้มข้นที่ 100 µg/mL

4.5.4.2 การเตรียมตัวอย่าง โดยชั่งตัวอย่าง 400 mg (บันทึกน้ำหนักจริง) ลง centrifuge tube ขนาด 50 mL เติม methanol ปริมาตร 20 mL นำไปแช่เย็น 15 นาที จากนั้น centrifuge 10 นาที ที่ 5,500 rpm, 20 องศาเซลเซียส เก็บส่วนใสที่ได้ นำไประเหยแห้งด้วยเครื่อง TurboVap ที่ 40 องศาเซลเซียส (ทำการสกัดซ้ำ 3 รอบ) ละลายและปริมาตรด้วย methanol ให้ได้ 50 mL

4.5.5 ทดสอบ LOQ (limit of quantitation)

ทดสอบที่ความเข้มข้นต่ำสุดของสารสำคัญ curcumin ที่สามารถวิเคราะห์ได้ในตัวอย่างขมิ้นชันผง โดยคำนวณจากเกณฑ์การยอมรับ $S/N \geq 10$ เตรียมโดยชั่งตัวอย่าง 200 mg (บันทึกน้ำหนักจริง) ลง centrifuge tube ขนาด 50 mL เติม methanol ปริมาตร 20 mL นำไปแช่เย็น 15 นาที แล้ว centrifuge 10 นาที ที่ 5,500 rpm, 20 องศาเซลเซียส เก็บส่วนใสที่ได้ นำไประเหยแห้งด้วยเครื่อง TurboVap ที่ 40 องศาเซลเซียส (ทำการสกัดซ้ำ 3 รอบ) ละลายและปริมาตรด้วย methanol ให้ได้ 50 mL

4.5.6 ทดสอบ Selectivity

เป็นการตรวจสอบการแยกได้ของ peak จากสารในกลุ่ม curcuminoids โดยการเตรียม standard mixture

4.5.6.1 การเตรียม สารมาตรฐาน curcumin ที่ความเข้มข้น 1 mg/mL โดยปิเปต stock standard จากข้อ 4.4.5.1 ลงใน volumetric flask ละลายและปรับปริมาตรด้วย acetonitrile

4.5.6.2 การเตรียม stock สารมาตรฐาน bisdemethoxycurcumin ที่ความเข้มข้น 1 mg/mL โดยชั่งสารมาตรฐาน bisdemethoxycurcumin ลงใน volumetric flask ละลายและปรับปริมาตรด้วย acetonitrile

4.5.6.3 การเตรียม stock สารมาตรฐาน desmethoxycurcumin ที่ความเข้มข้น 1 mg/mL โดยชั่งสารมาตรฐาน desmethoxycurcumin ลงใน volumetric flask ละลายและปรับปริมาตรด้วย acetonitrile

4.5.6.4 การเตรียม standard mixture ที่ความเข้มข้น 100 µg/mL โดยปิเปตสารจากข้อ 4.5.6.1 – 4.5.6.3 อย่างละ 1 mL ลงใน volumetric flask 10 mL ปรับปริมาตรด้วย methanol

4.5.6.5 การเตรียมตัวอย่างตามข้อ 4.5.4.2

4.5.7 ทดสอบ Robustness

เป็นการทดสอบความคงทนของวิธีว่า เมื่อมีการเปลี่ยนแปลงปัจจัยที่ใช้ในการทดสอบแล้วจะยังให้ผลการทดสอบเหมือนเดิมหรือไม่ โดยปัจจัยต่างๆ ตามแผนการทดสอบของ Youden's โดยทดสอบในตัวอย่างจำนวน 2 ซ้ำๆ ละ 2 injection และใช้สารละลายมาตรฐาน curcumin ความเข้มข้น 100 µg/mL เป็นตัวควบคุม

ตารางที่ 5 parameters ที่ใช้ทดสอบ robustness

No.	Factor	Units	Limit	Level (-1)	Level (+1)	Normal value
1.	Spray volume (A/a)	µL	±1	1 = A	3 = a	2
2.	Volume of toluene in the mobile phase (B/b)	mL	±2	37 = B	41 = b	39
3.	Volume of ethanol in the mobile phase (C/c)	mL	±1	1 = C	3 = c	2
4.	Volume of acetic acid in the mobile phase (D/d)	mL	±1	1 = D	3 = d	2
5.	Temperature of TurboVap (E/e)	°C	±5	35 = E	45 = e	40
6.	Time of extraction (F/f)	min	±5	10 = F	20 = f	15
7.	The wavelength of detector (G/g)	nm	±5	415 = G	425 = g	420

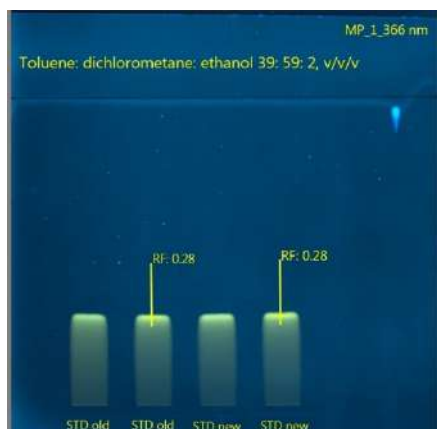
ตารางที่ 6 แผนการทดสอบ robustness ด้วยวิธี Youden's

Parameters	จำนวนผลการทดสอบ							
	1	2	3	4	5	6	7	8
Spray volume (A/a)	A	A	A	A	a	a	a	a
Volume of toluene in the mobile phase (B/b)	B	B	b	b	B	B	b	b
Volume of ethanol in the mobile phase (C/c)	C	c	C	c	C	c	C	c
Volume of acetic acid in the mobile phase (D/d)	D	D	d	d	d	d	D	D
Temperature of TurboVap (E/e)	E	e	E	e	E	e	E	e
Time of extraction (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

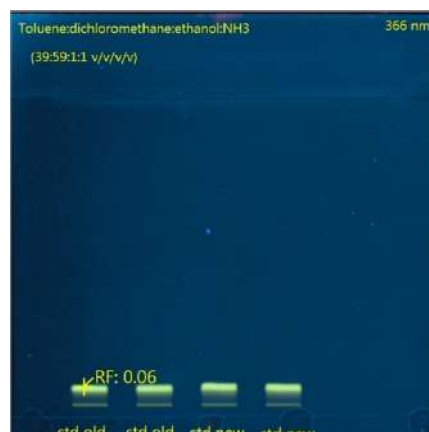
5. ผลการทดสอบ

5.1. ผลการพัฒนาวิธีทดสอบหาปริมาณสารสำคัญ curcumin

5.1.1. ผลศึกษาความมีขั้ว และความเป็น กรด – เบส ของ mobile phase ที่เหมาะสม ในการหาปริมาณ curcumin ดัดแปลงจากวิธี in-house ปี (2562)



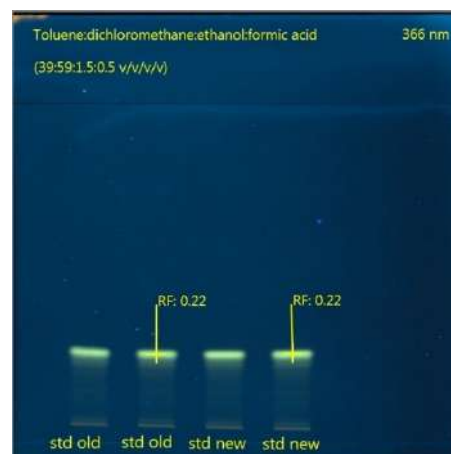
รูปที่ 4 HPTLC band ของ condition ที่ 1 ตารางที่ 2



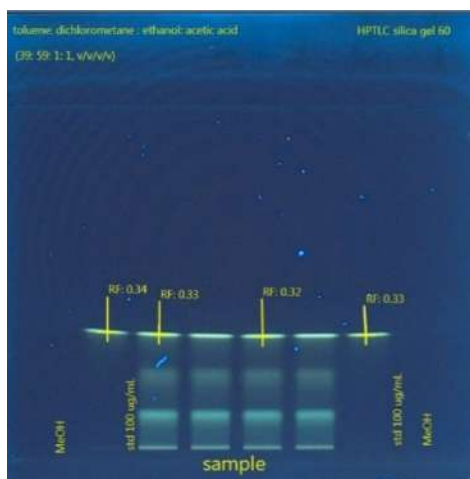
รูปที่ 5 HPTLC band ของ condition ที่ 2 ตารางที่ 2



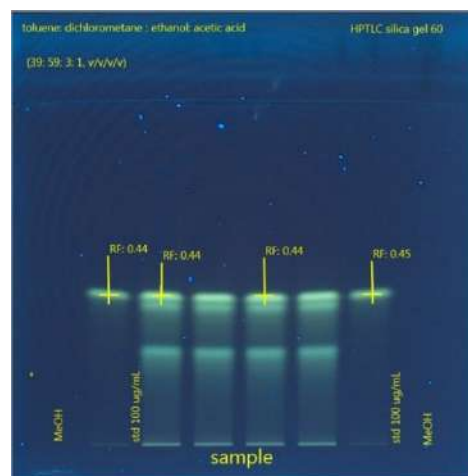
รูปที่ 6 HPTLC band ของ condition ที่ 3 ตารางที่ 2



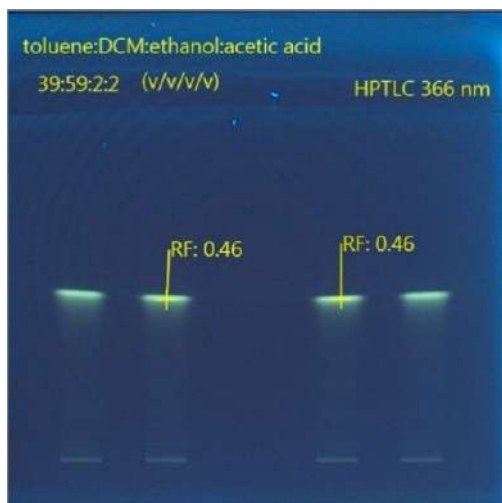
รูปที่ 7 HPTLC band ของ condition ที่ 4 ตารางที่ 2



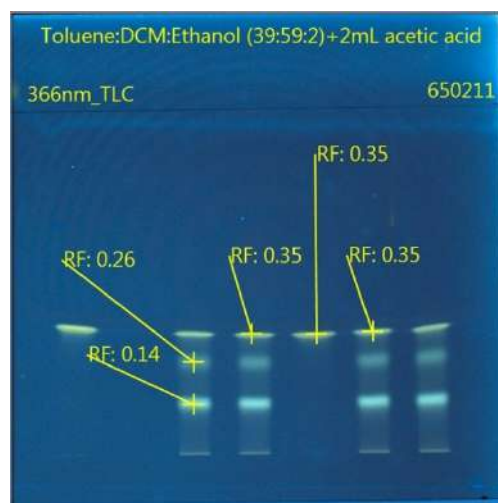
รูปที่ 8 HPTLC band ของ condition ที่ 5 ตารางที่ 2



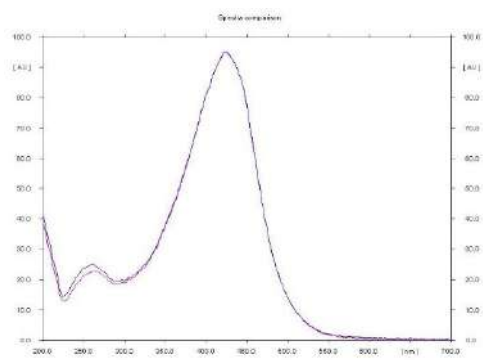
รูปที่ 9 HPTLC band ของ condition ที่ 6 ตารางที่ 2



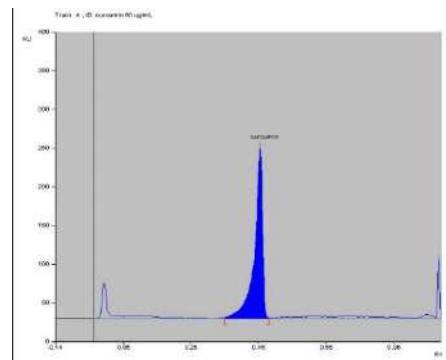
รูปที่ 10 HPTLC band ของ condition ที่ 7 ตารางที่ 2



รูปที่ 11 HPTLC band std. curcumin และตัวอย่างเข้มข้นของ condition ที่ 7 ตารางที่ 2



รูปที่ 12 Spectrum of standard curcumin, mobile phase: Toluene : dichloromethane : ethanol : acetic acid (39:59:2:2, v/v/v/v)



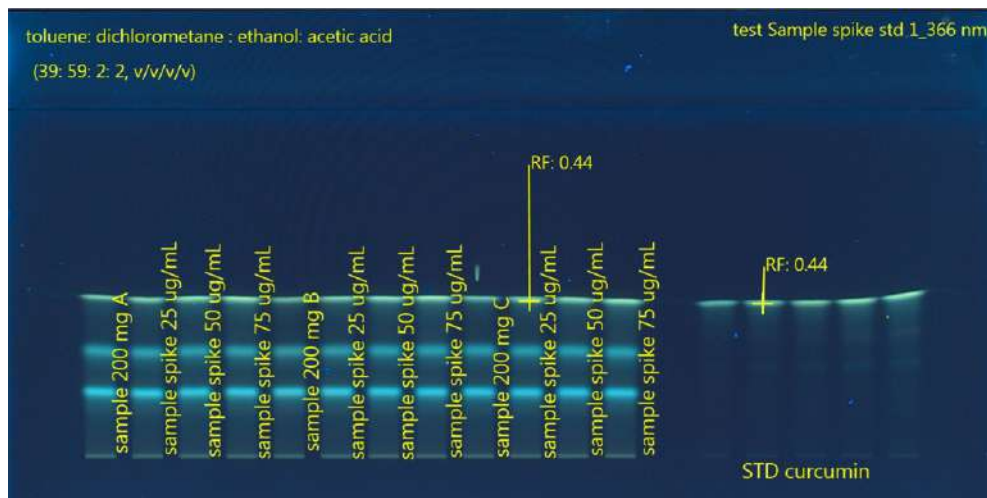
รูปที่ 13 HPTLC chromatogram of standard curcumin, mobile phase: Toluene : dichloromethane : ethanol : formic acid (39:59:2:2, v/v/v/v)

จากผลการศึกษา mobile phase ที่เหมาะสม พบว่า condition ที่มีการเติม acetic acid ลงไป band มีความคมชัด และ ค่า Rf ประมาณ 0.41 – 0.45 ซึ่งอยู่ในระยะที่เหมาะสม จึงได้นำ condition นี้มาใช้ทดสอบร้อยละการคืนกลับในตัวอย่างเข้มข้นผง

5.1.2. ผลการศึกษาหาวิธีการสกัดที่เหมาะสมเพื่อหาร้อยละการคืนกลับของสารสำคัญ curcumin ในตัวอย่างเข้มข้นผง

ตารางที่ 7 ผลการศึกษาหาวิธีการสกัดที่เหมาะสมโดยใช้ร้อยละการคืนกลับ (%recovery)

sample	75 µg/mL			100 µg/mL			125 µg/mL		
	area	Conc. (µg/mL)	%recovery	area	Conc. (µg/mL)	%recovery	area	Conc. (µg/mL)	%recovery
1	4160.90	79.68	99.04	5064.00	105.04	100.21	5895.20	128.37	97.91
2	4165.20	79.80	99.53	5032.10	104.14	98.37	5879.60	127.94	97.32
3	4166.40	79.83	99.41	5054.50	104.77	99.55	5893.80	128.33	97.77
4	4157.70	79.42	97.98	5043.80	104.31	98.75	5878.00	127.74	97.07
5	4156.00	79.37	97.80	5058.90	104.73	99.55	5881.10	127.83	97.18
6	4178.60	80.00	100.09	5060.30	104.77	99.56	5893.20	128.17	97.55
Average	4164.13	79.68	98.98	5052.27	104.63	99.33	5886.82	128.06	97.47
SD	8.17	0.25	0.91	12.08	0.33	0.66	8.03	0.27	0.34
% RSD	0.20	0.31	0.92	0.24	0.32	0.66	0.14	0.21	0.34



รูปที่ 14 HPTLC band ของการทดสอบ curcumin ในตัวอย่างไขมันชั้นผง ในการหาร้อยละการคืนกลับ ที่ 366 nm

จากการศึกษาพบว่า % recovery ของการทดสอบ curcumin ในตัวอย่างไขมันชั้นผง ทั้ง 3 ระดับความเข้มข้น (75, 100, และ 125%) มีค่าอยู่ในช่วง 97.47 – 99.33 % ซึ่งอยู่ในเกณฑ์การยอมรับของ AOAC, (2019) ที่ปริมาณสารสำคัญ 1% ระบุให้ % recovery อยู่ในช่วง 97.0-103 % ซึ่งจะนำวิธีการสกัดนี้ไปทดสอบความใช้ได้ของวิธีต่อไป

5.2. ผลการทดสอบความใช้ได้ของวิธี

5.2.1.Range and linearity

5.2.1.1. ผลการทดสอบ range

ตารางที่ 8 ทดสอบความเป็นเส้นตรงของสารละลายมาตรฐาน curcumin

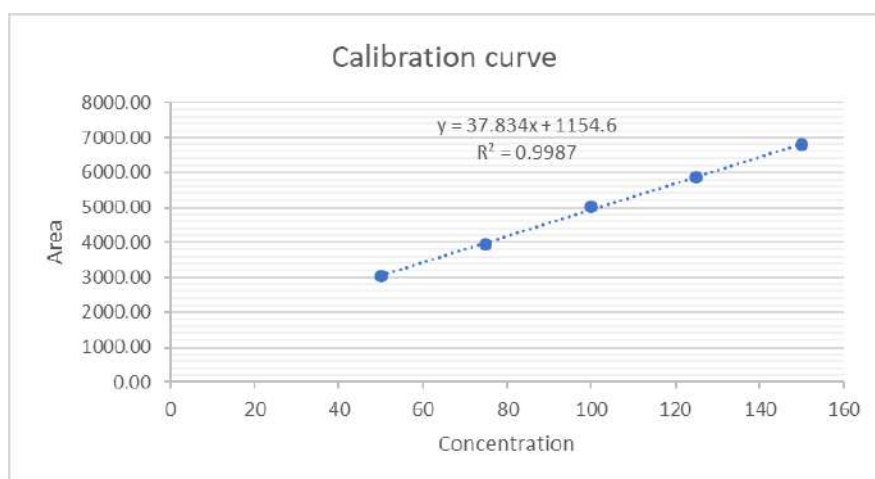
standard solution ($\mu\text{g/mL}$)	Average area	Average concentration ($\mu\text{g/mL}$)
10	1414.87	5.980
25	2073.03	24.482
50	3109.13	53.605
75	3877.37	75.199
100	4872.53	103.173
125	5764.17	128.237
150	6414.90	146.529
200	8232.33	197.615
250	10039.33	248.407
300	11937.80	301.773
slope		35.57342
intercept		1202.406
r^2		0.9991
r		0.9995

พบว่าค่า r มีค่า = 0.9995 ตามเกณฑ์ AOAC, (2019) หากค่า $r > 0.99$ แสดงว่าการทดสอบมีความเป็นเส้นตรง (linearity) ตลอดช่วงการทดสอบ

5.2.1.2. ผลการทดสอบ linearity

ตารางที่ 9 ทดสอบความเป็นเส้นตรงของสารละลายมาตรฐาน curcumin

Conc. (µg/mL)	Day 1		Day 2		Day 3	
	Average area	concentration (µg/mL)	Average area	concentration (µg/mL)	Average area	concentration (µg/mL)
50	3073.60	49.32	3025.80	48.31	3043.43	48.58
75	4033.63	75.06	4049.03	75.75	4083.73	75.69
100	5027.57	101.70	5069.77	102.84	4982.83	101.87
125	5863.93	124.12	5872.30	123.84	5855.00	124.87
150	6821.40	149.79	6856.57	149.26	6762.30	148.99
slope	37.834					
intercept	1154.6					
r^2	0.9987					
r	0.9993					



รูปที่ 15 กราฟแสดงความเป็นเส้นตรงของสารมาตรฐาน Curcumin

จากการพิจารณาค่า r มีค่า > 0.99 ดังนั้นจึงสรุปได้ว่าการทดสอบ linearity ของสารมาตรฐาน curcumin มีความเป็นเส้นตรงในช่วงความเข้มข้น 50 – 150 µg/mL

5.2.2.ผลการทดสอบความแม่นยำ (accuracy) ของวิธีการทดสอบปริมาณ curcumin ในตัวอย่างไขมันชั้นผง เป็นเวลา 3 วัน

ตารางที่ 10 ผลการทดสอบความแม่นยำ (accuracy)

sample	Day 1			Day 2			Day 3		
	75 (µg/mL)	100 (µg/mL)	125 (µg/mL)	75 (µg/mL)	100 (µg/mL)	125 (µg/mL)	75 (µg/mL)	100 (µg/mL)	125 (µg/mL)
1	4420.80	5327.70	6243.80	4377.00	5299.50	6273.70	4356.30	5268.70	6226.10
2	4423.10	5340.60	6227.20	4364.00	5279.70	6224.30	4354.30	5291.90	6232.40
3	4411.20	5350.80	6241.70	4368.40	5289.00	6261.30	4347.70	5272.00	6222.80
4	4407.80	5353.00	6257.50	4362.90	5295.30	6264.70	4377.60	5286.40	6231.80
5	4393.30	5336.50	6227.20	4387.20	5274.40	6238.20	4375.70	5289.40	6239.10
6	4400.80	5334.80	6232.40	4374.10	5262.90	6265.40	4363.30	5297.40	6250.10
7	4420.90	5319.00	6243.80	4346.40	5290.00	6215.60	4395.10	5299.80	6230.10
8	4419.00	5364.50	6210.40	4370.50	5285.30	6218.20	4382.20	5286.30	6225.20
9	4414.00	5378.40	6250.80	4344.00	5306.10	6290.40	4387.00	5307.70	6289.20
Average	4412.32	5345.03	6237.20	4366.06	5286.91	6250.20	4371.02	5288.84	6238.53
SD	10.16	18.59	14.34	13.89	13.22	26.85	16.30	12.55	20.72
% RSD	0.23	0.35	0.23	0.32	0.25	0.43	0.37	0.24	0.33
%Recovery	101.74	100.83	99.10	99.65	98.24	99.41	99.17	99.50	100.70

ผลการทดสอบ พบว่า % recovery ของการทดสอบ Curcumin ในตัวอย่างไขมันชั้นผง ทั้ง 3 ระดับความเข้มข้น (75, 100, และ 125%) มีค่าอยู่ในช่วง 99.10 – 101.47 ซึ่งอยู่ในเกณฑ์การยอมรับของ AOAC, (2019) ที่ปริมาณสารสำคัญ 1% ระบุให้ % recovery อยู่ในช่วง 97.0-103 %

5.2.3. การทดสอบความเที่ยงของวิธี (precision) ของวิธีการตรวจหาปริมาณสารสำคัญ curcumin ในตัวอย่างไขมันชั้น ซึ่งดูจากผลการทดสอบ repeatability โดยจะต้องได้ค่า %RSD <2.7% ตามเกณฑ์การยอมรับที่ปริมาณสารสำคัญ 1% ตามAOAC, (2019)

ตารางที่ 11 ผลทดสอบความเที่ยง (repeatability และ intermediate precision) วันที่ 1-3

Flask No.	Day 1		Day 2		Day 3	
	Average area	concentration (µg/mL)	Average area	concentration (µg/mL)	Average area	concentration (µg/mL)
1	5297.95	108.77	5257.00	107.76	5304.25	108.64
2	5294.25	108.61	5267.35	107.52	5308.05	108.80
3	5280.45	108.35	5252.15	108.52	5257.05	106.06
4	5291.55	108.67	5263.00	108.06	5304.75	108.77
5	5301.80	108.80	5275.10	107.91	5250.50	108.34
6	5280.05	108.65	5277.50	108.22	5251.05	108.48
7	5299.10	108.74	5263.65	107.45	5305.75	108.63
8	5277.30	108.46	5300.00	108.74	5254.75	106.12
9	5300.55	108.75	5259.70	107.63	5300.40	108.58
10	5291.35	108.66	5290.20	108.60	5302.00	108.54
Average	5291.44	108.65	5270.57	108.04	5283.86	108.10
SD	9.13	0.14	15.19	0.46	26.40	1.07
% RSD _r	0.17	0.13	0.29	0.43	0.50	0.99
% RSD _R	0.48					

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

ผลการทดสอบความเที่ยงพบว่า ค่าความเที่ยง (repeatability และ intermediate precision) ของการฉีดตัวอย่างสารสกัดจากผงขมิ้นชันที่ 400 mg จำนวน 10 ตัวอย่าง ได้ค่า repeatability %RSD เท่ากับ 0.17, 0.29 และ 0.59 ตามลำดับ และ intermediate precision %RSD เท่ากับ 0.48 แสดงว่าวิธีทดสอบนี้อยู่ในเกณฑ์ที่กำหนด % RSD < 2.7 % ตามเกณฑ์การยอมรับที่ปริมาณสารสำคัญ 1% ตาม AOAC, (2019)

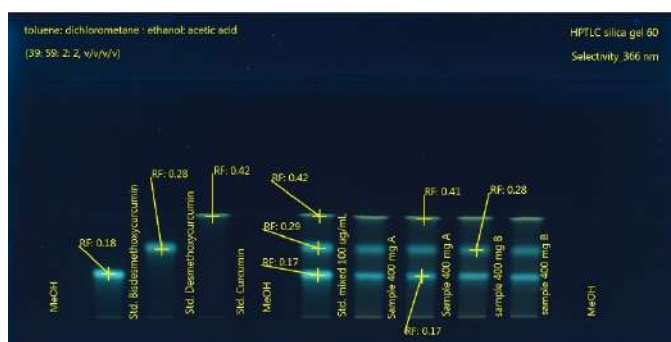
5.2.4. ผลการทดสอบ limit of quantitation

ตารางที่ 12 ผลทดสอบ limit of quantitation (LOQ)

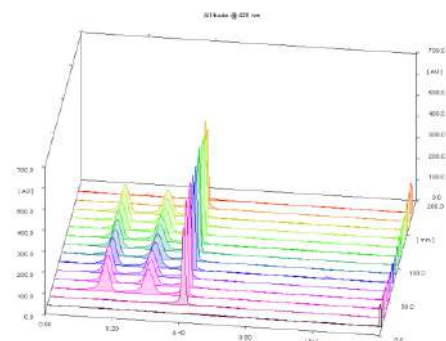
Flask No.	Average area	concentration ($\mu\text{g/mL}$)	S/N
1	3473.25	60.03	110.72
2	3478.10	60.17	82.44
3	3479.35	60.20	87.09
4	3464.60	59.80	48.39
5	3472.70	60.02	52.88
6	3471.15	59.98	90.97
7	3469.60	59.93	46.96
8	3469.70	59.94	124.33
9	3463.10	59.76	112.65
10	3473.30	60.03	148.84
Average	3471.49	59.99	90.53
SD	5.14	0.14	-
% RSD	0.15	0.23	-

จากการทดสอบพบว่า limit of quantitation ของการฉีดตัวอย่างขมิ้นชันจำนวน 10 ตัวอย่าง ได้ค่า S/N เท่ากับ 90.3 ซึ่งเป็นไปตามเกณฑ์ $S/N \geq 10$ แสดงว่าการทดสอบ limit of quantitation ของการฉีดตัวอย่างขมิ้นชัน มีความเที่ยง (precision) สามารถทดสอบได้ที่ความเข้มข้น 50 $\mu\text{g/mL}$

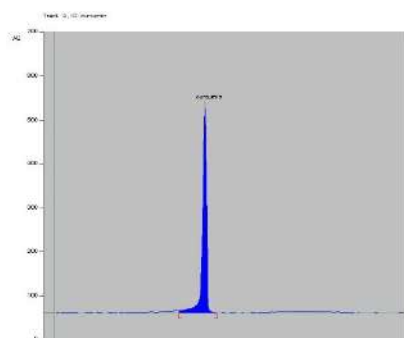
5.3. ผลการทดสอบ selectivity



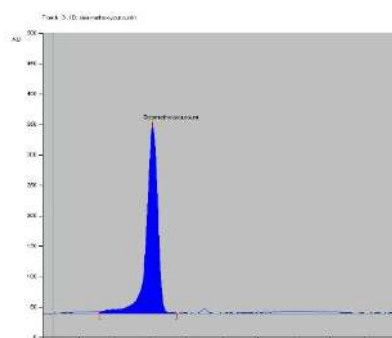
รูปที่ 16 HPTLC band ของ curcuminoids จากการทดสอบ selectivity ที่ 366 nm



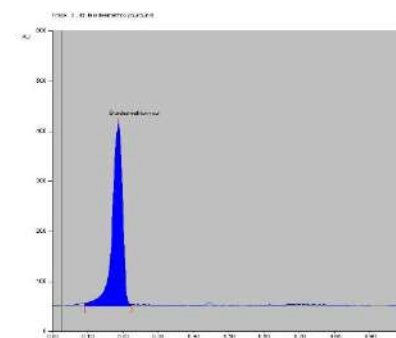
รูปที่ 17 Chromatogram ของ curcuminoids จากการทดสอบ selectivity



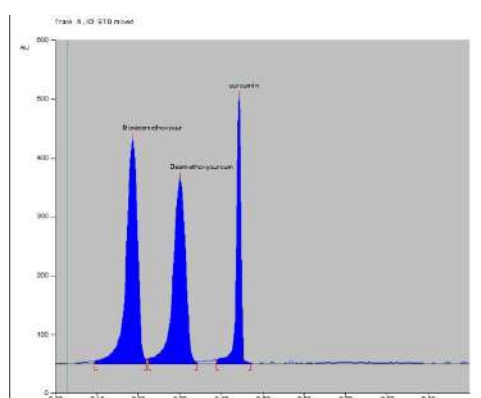
รูปที่ 18 Peak ของ standard curcumin



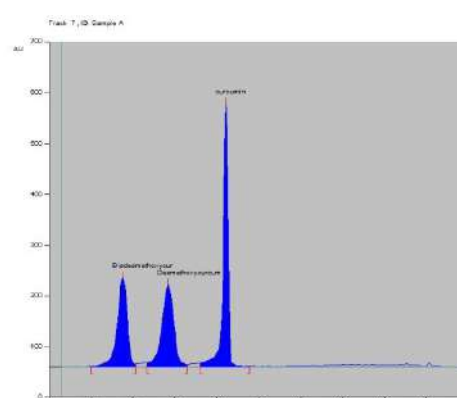
รูปที่ 19 Peak ของ standard demethoxycurcumin



รูปที่ 20 Peak ของ standard bisdemethoxycurcumin



รูปที่ 21 Peak ของ standard mixture curcumin, demethoxycurcumin และ bisdemethoxycurcumin



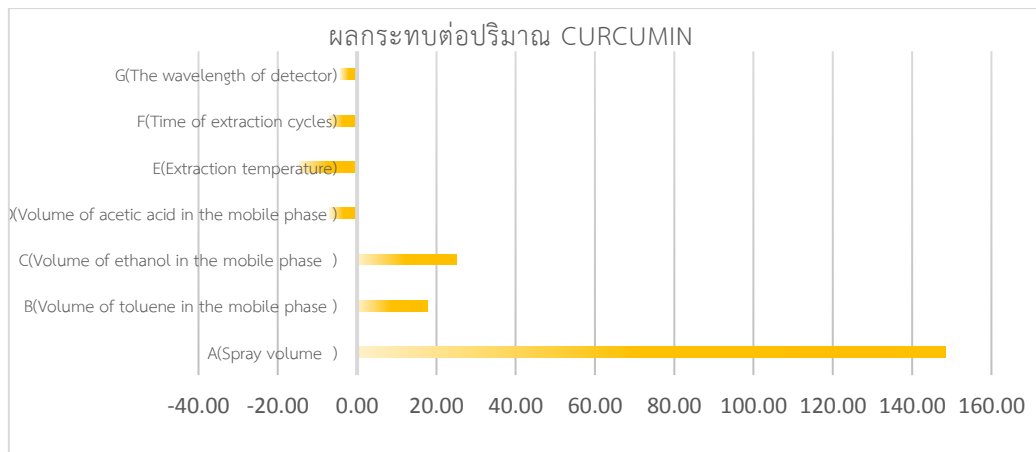
รูปที่ 22 Peak ของ curcumin, demethoxycurcumin และ bisdemethoxycurcumin ในตัวอย่าง

พบว่า การทดสอบ selectivity สามารถแยกสารระหว่าง curcumin, bisdemethoxycurcumin และ demethoxycurcumin โดยค่า Rf อยู่ที่ 0.42, 0.18 และ 0.29 ตามลำดับ ไม่มีการซ้อนทับของค่า Rf ที่ตำแหน่งเดียวกัน

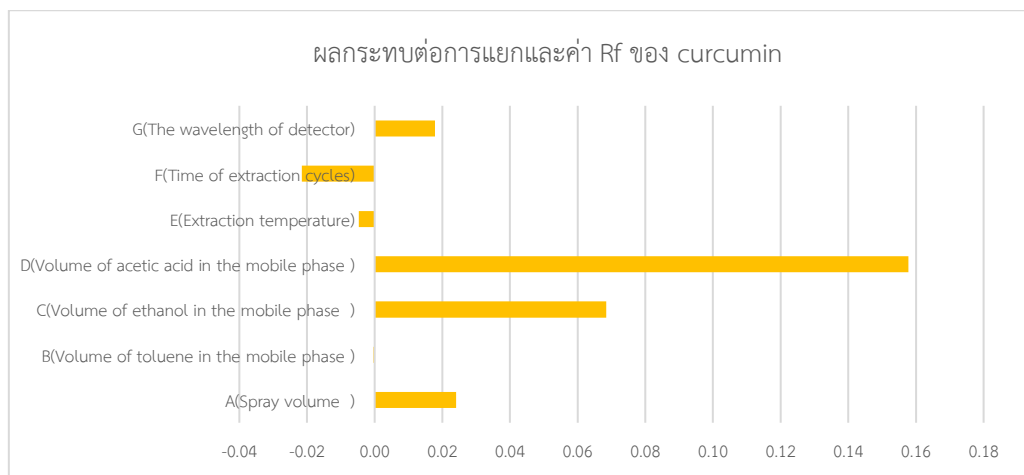
5.4. ผลการทดสอบ robustness

ตารางที่ 13 ผลการทดสอบ robustness

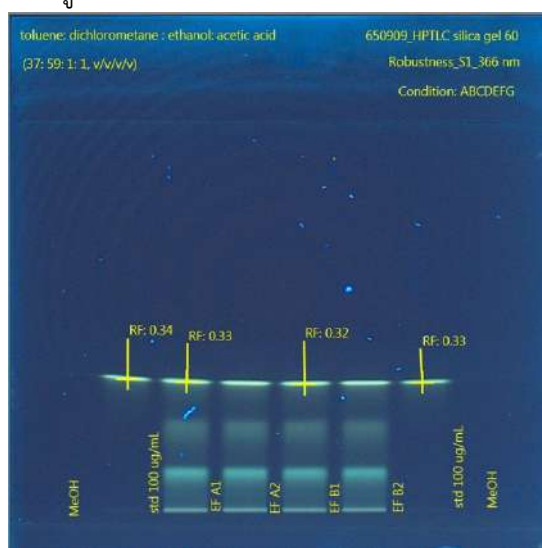
Effect	Concentration	Rf
Spray volume (μL) (A=1; a=3)	-148.35	-0.02
Volume of toluene in the mobile phase (mL) (B=37; b=41)	-17.78	0.00
Volume of ethanol in the mobile phase (mL) (C=1; c=3)	-25.12	-0.07
Volume of acetic acid in the mobile phase (mL) (D=1; d=3)	6.84	-0.16
Temperature of TurboVap ($^{\circ}\text{C}$) (E=35; e=45)	14.44	0.00
Time of extraction (min) (F=10; f=20)	7.01	0.02
The wavelength of detector (nm) (G=415; g=420)	4.25	-0.02



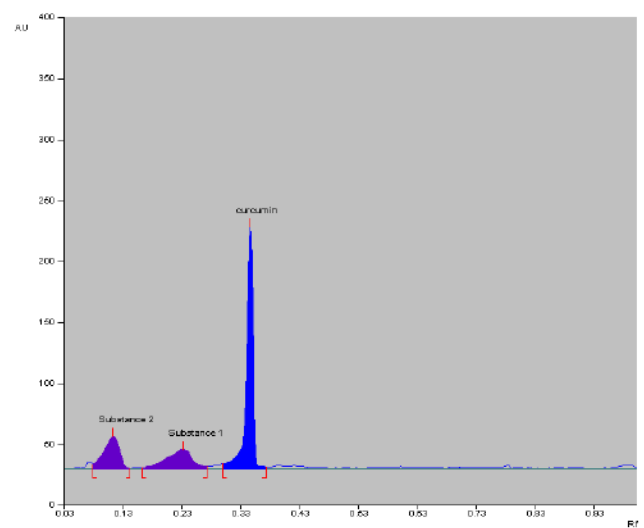
รูปที่ 23 ผลกระทบต่อปริมาณ curcumin



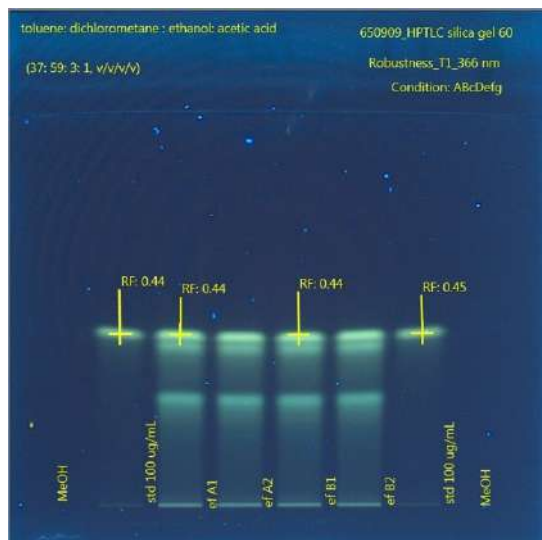
รูปที่ 24 ผลกระทบต่อการแยกและค่า Rf ของ curcumin



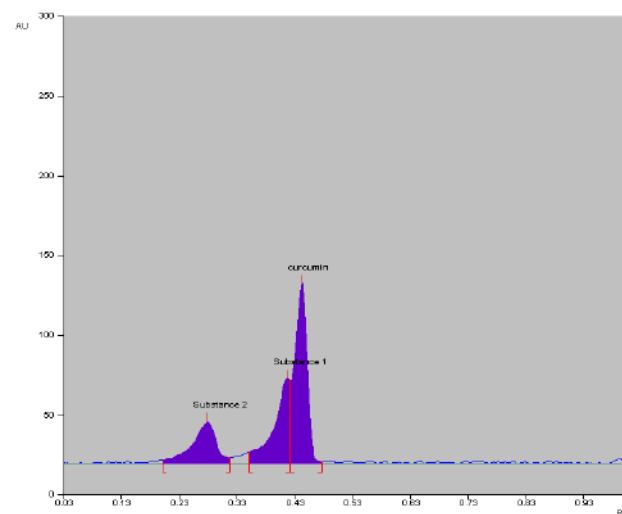
รูปที่ 25 HPTLC band การแยกของสารตาม Condition S ที่ 366 nm



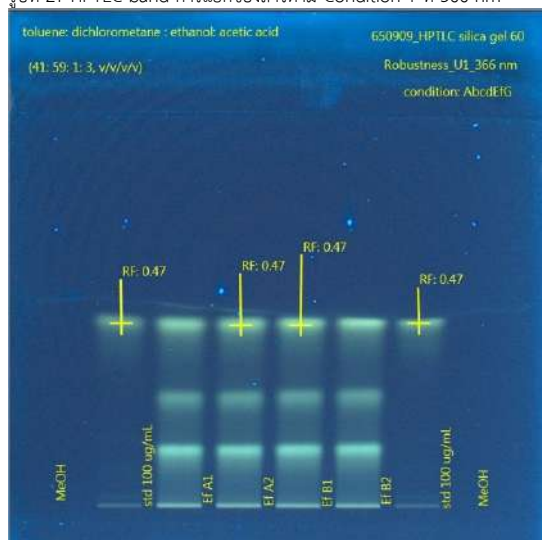
รูปที่ 26 Pear การแยกของสารตาม Condition S



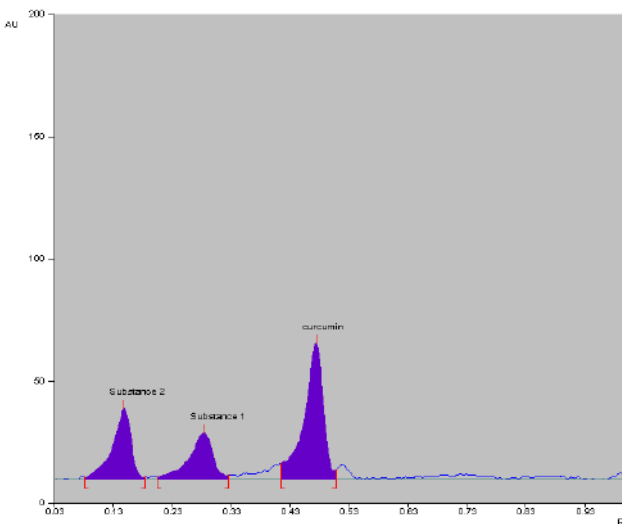
รูปที่ 27 HPTLC band การแยกของสารตาม Condition T ที่ 366 nm



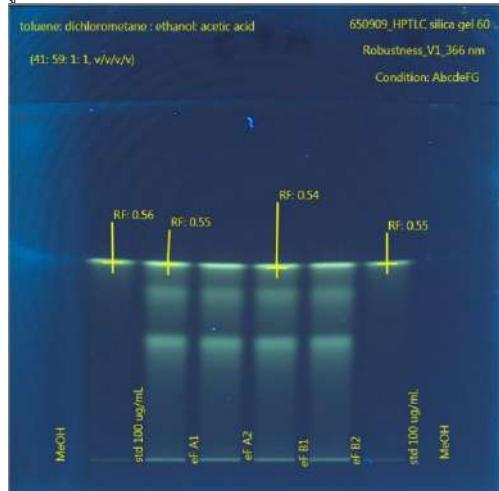
รูปที่ 28 Pear การแยกของสารตาม Condition T



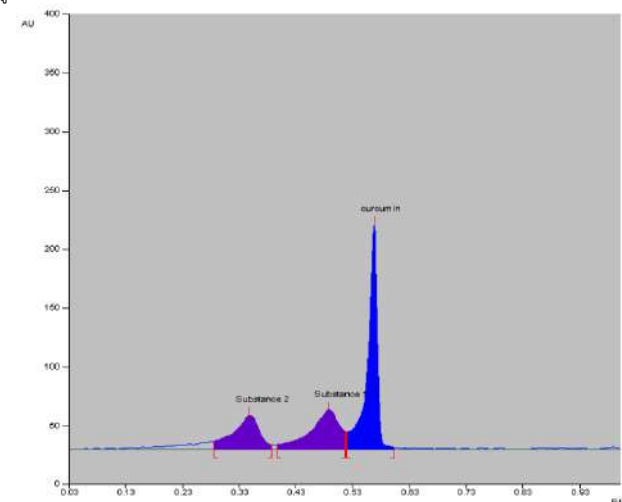
รูปที่ 29 HPTLC band การแยกของสารตาม Condition U ที่ 366 nm



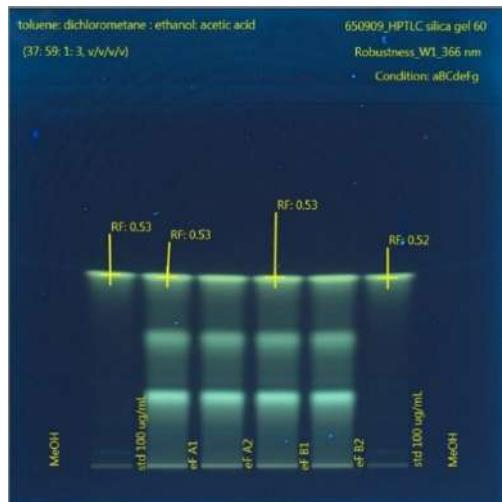
รูปที่ 30 Pear การแยกของสารตาม Condition U



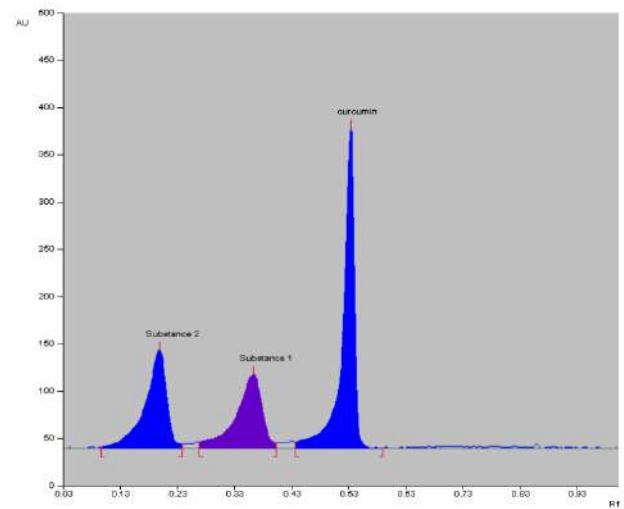
รูปที่ 31 HPTLC band การแยกของสารตาม Condition V ที่ 366 nm



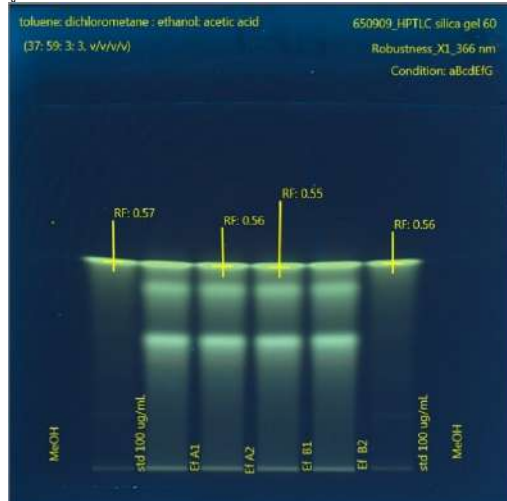
รูปที่ 32 Pear การแยกของสารตาม Condition V



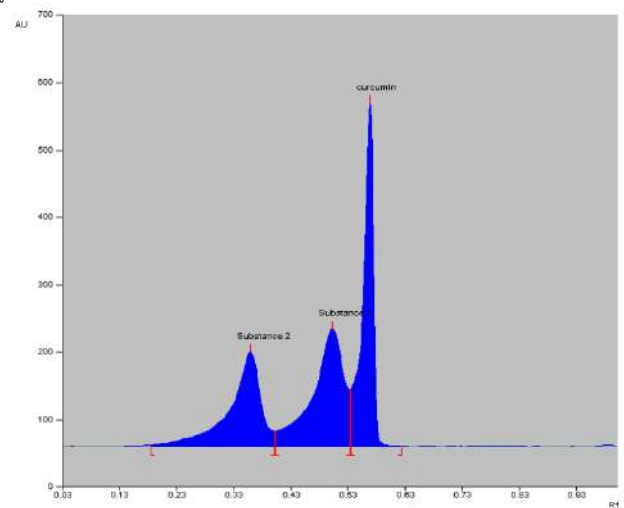
รูปที่ 33 HPTLC band การแยกของสารตาม Condition W ที่ 366 nm



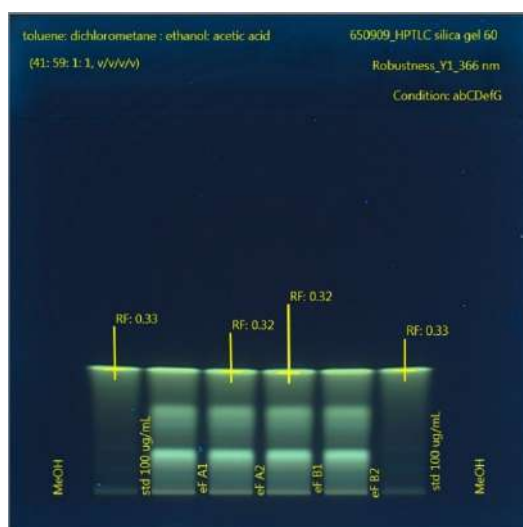
รูปที่ 34 Pear การแยกของสารตาม Condition W



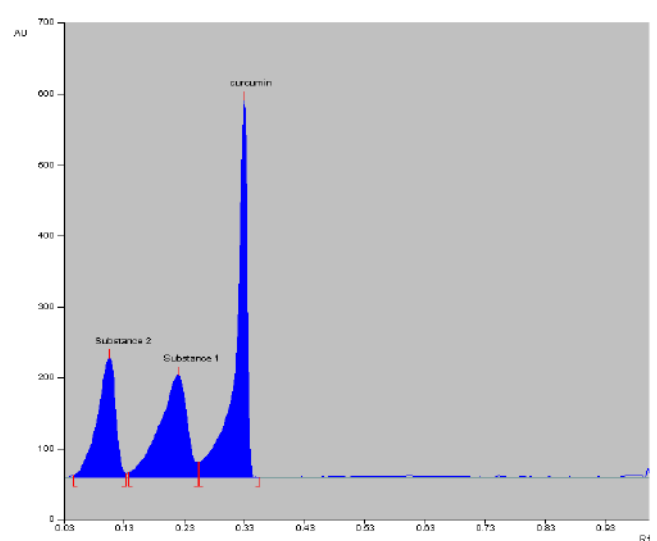
รูปที่ 35 HPTLC band การแยกของสารตาม Condition X ที่ 366 nm



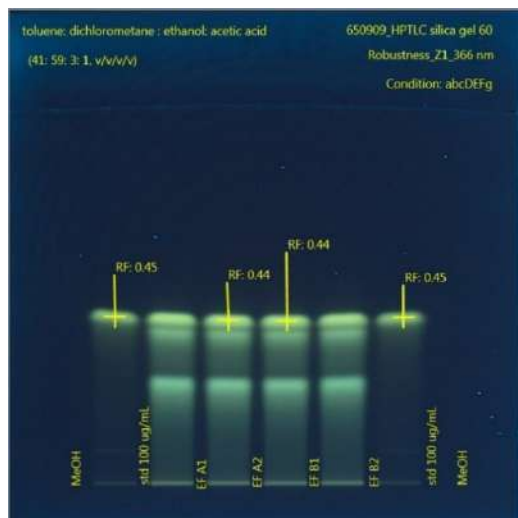
รูปที่ 36 Pear การแยกของสารตาม Condition X



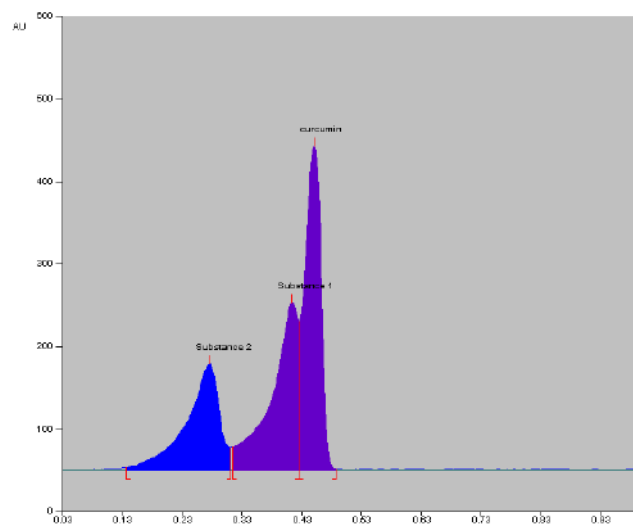
รูปที่ 37 HPTLC band การแยกของสารตาม Condition Y ที่ 366 nm



รูปที่ 38 Pear การแยกของสารตาม Condition Y



รูปที่ 39 HPTLC band การแยกของสารตาม Condition Z ที่ 366 nm



รูปที่ 40 Peak การแยกของสารตาม Condition Z

ผลการทดสอบ robustness ของวิธีเมื่อมีการเปลี่ยนแปลงปัจจัยในการทดสอบ พบว่า การเปลี่ยนแปลงโดยเพิ่ม spray volume มีผลต่อปริมาณของสาร curcumin มากที่สุด สำหรับการเปลี่ยนแปลงอัตราส่วนใน mobile phase พบว่าการเปลี่ยนแปลงอัตราส่วน Toluene ซึ่งเป็นสารที่มีขั้วน้อย ส่งผลต่อค่า Rf ของสารในกลุ่ม curcuminoids น้อยมาก การเปลี่ยนแปลงอัตราส่วนของ mobile phase โดยเพิ่ม acetic acid และ ethanol มีผลต่อการแยกสารในกลุ่ม curcuminoids โดยให้ค่า Rf ที่สูงขึ้น ทั้งนี้การเพิ่มอัตราส่วน acetic acid ทำให้อนาฬิกาทุกตัวแยกออกจาก curcumin ได้ดี ส่วน ethanol อาจทำให้ฟีดของนาฬิกาซ้อนทับฟีด curcumin ได้

ตารางที่ 14 สรุปผลการทดสอบความใช้ได้ของวิธี

หัวข้อการทดสอบ	ข้อกำหนด	ผลที่ได้	สรุปผล
1. ความเป็นเส้นตรง (Linearity)	correlation coefficient > 0.995	0.9993	✓
2. ช่วงของการวิเคราะห์	0.05 – 0.150 mg/mL	-	✓
3. ทดสอบความแม่นยำของวิธี (Accuracy)	%Recovery อยู่ในช่วง 97.0 – 103.0 %	Day 1 = 99.10 – 101.74% Day 2 = 98.24 – 99.65 % Day 3 = 99.71 – 100.70 %	✓
4. การทดสอบความเที่ยงของวิธี (Precision)	%RSD < 2.7%-		
- repeatability		0.17 – 0.59 %	✓
- intermediate precision		0.48 %	
5. Limit of quantitation; LOQ	S/N ≥ 10	90.53	✓
6. Selectivity	สามารถแยกสารระหว่าง curcumin, bisdemethoxycurcumin และ demethoxycurcumin ได้	ค่า Rf อยู่ที่ 0.42, 0.18 และ 0.29	✓

6. สรุปผลการทดลอง

การทดสอบความใช้ได้ของวิธีทดสอบหาปริมาณสารสำคัญ curcumin ในตัวอย่างขมิ้นชันผง ด้วยเทคนิค HPTLC ทำการทดสอบ range, linearity, accuracy, precision, LOQ และ selectivity ทุกพารามิเตอร์อยู่ในเกณฑ์การยอมรับ (ICH Guideline, 2019) (AOAC, 2019) สามารถนำไปทดสอบหาปริมาณ curcumin ในตัวอย่างขมิ้นชันผงได้อย่างถูกต้อง

7. ข้อเสนอแนะ

การทดสอบในครั้งนี้ใช้ตัวอย่างขมิ้นชันผงเท่านั้น กรณีต้องการตรวจตัวอย่างในรูปแบบอื่น ควรทำการทวนสอบวิธีเพิ่มเติม

8. กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณผู้อำนวยการสำนักตรวจสอบคุณภาพสินค้าปศุสัตว์ ที่พิจารณาให้ดำเนินการในปีงบประมาณ 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.

ICH Harmonised Guideline. 2019. Bioanalytical Method Validation international council for harmonization of technical requirements for pharmaceuticals for human use, p.1 - 14

Paramasiva M., R. Poi, H. Benerjee and A. Bandyopadhyay (2009) High-performance thin-layer chromatographic method for quantitative determination of curcuminoids in curcuma longa germplasm. Food Chemistry, 113 (2009) 640-644

Kharat S., A. Namdeo and P. Mehta (2016) Development and validation of HPTLC method for simultaneous estimation of curcumin and galangin in polyherbal capsule dosage form. Journal of Taibah University for Science 11 (2017) 775-781

กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ Thai Herbal pharmacopoeia (2016) ขมิ้นชัน (KHAMIN CHAN) 145-151