ชุดโครงการวิจัย : การพัฒนาระบบการตรวจวิเคราะห์พืชและปัจจัยการผลิตทางการเกษตร

โครงการวิจัย : การพัฒนาระบบการตรวจวิเคราะห์พืชและปัจจัยการผลิตทางการเกษตร

กิจกรรมที่ 1 : พัฒนาระบบการตรวจวิเคราะห์ปุ๋ย พืช ดิน น้ำ สารอินทรีย์ สาร ควบคุมการเจริญเติบโตพืช สารสกัด และวัตถุอันตรายทางการเกษตร

กิจกรรมย่อยที่ 1.4 : การพัฒนาวิธีวิเคราะห์สารออกฤทธิ์ในสารสกัดจากพืชที่ใช้ป้องกันกำจัดศัตรูพืช

ชื่อการทดลอง (ภาษาไทย) : ตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์เคอร์คูมินในสารสกัดขมิ้นชันและผลิตภัณฑ์

ชื่อการทดลอง (ภาษาอังกฤษ) : Method Varidation of Curcumin from Tumeric Extract and Biopesticide Products

คณะผู้ดำเนินงาน

หัวหน้าการทดลอง : นางธิติยาภรณ์ อุดมศิลป์ กองวิจัยพัฒนาปัจจัยการผลิตทางการเกษตร

ผู้ร่วมงาน : สิบเอกอิสริยะ สืบพันธุ์ดี กองวิจัยพัฒนาปัจจัยการผลิตทางการเกษตร

นางธนิตา ค่ำอำนวย กองวิจัยพัฒนาปัจจัยการผลิตทางการเกษตร

บทคัดย่อ

การพัฒนาวิธีวิเคราะห์และตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์สารสำคัญเคอร์คูมินในผลิตภัณฑ์สารสกัดขมิ้นชันด้วยเทคนิคโครมาโตกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง (High performance liquid chromatography, HPLC) โดยใช้คอลัมน์ RP-C_{18} ใช้วัฏภาคเคลื่อนที่ประกอบด้วยอะซิโตรไนไทรล์และกรดฟอร์มิค ตรวจวัดที่ความยาวคลื่น 425 นาโนเมตร พบว่าวิธีนี้มีความเป็นเส้นตรงอยู่ระหว่าง 5-20 mg/L (R^2=0.9944) ค่า LOD เท่ากับ 0.15 mg/L และ ค่า LOQ เท่ากับ 0.51 mg/L มีค่าเปอร์เซ็นต์ของสารที่วิเคราะห์กลับคืน (% recovery) เท่ากับ 99.4, 100.09 และ 100.53 เปอร์เซ็นต์ ค่า precision ให้ค่า HORRAT ไม่เกิน 2 และ % RSD น้อยกว่า 20 ซึ่งอยู่ในเกณฑ์มาตรฐานที่ยอมรับได้ วิธีนี้จึงเป็นวิธีหนึ่งที่สามารถนำมาใช้วิเคราะห์ปริมาณเคอร์คูมินในสารสกัดขมิ้นชันและผลิตภัณฑ์ได้

คำสำคัญ : สารสกัดขมิ้นชัน เคอร์คูมิน การตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์

Abstract

Reverse phase high performance liquid chromatographic method using RP-C_{18} column was developed for determination of curcumin from turmeric extract and biopesticide products. Mobile phase consisted of acetronitile : formic acid and elution was measured at a wavelength of 425 nm. Linear range was found to be in the range of 5-20 mg/L (R^2=0.9944). The limits of detection and limits of quantitation for curcumin were found to be 0.15 mg/L and 0.51 mg/L, respectively. The percentage recovery of curcumin were 99.4, 100.09 and 100.53 %. Method varidation in term of accuracy and precision (HORRAT≤ 2 and % RSD ‹ 20). This method was successfully used for determination of curcumin from turmeric extract biopesticide products.

Keyword turmeric extract, curcumin, method validation

คำนำ

เนื่องจากความจำเป็นในการเพิ่มผลผลิตทางการเกษตร ทำให้มีการนำเข้าสารเคมีที่ใช้ป้องกันกำจัดศัตรูพืชเป็นจำนวนมาก และต่อมาได้พบว่า สารเคมีสังเคราะห์เหล่านี้ก่อให้เกิดปัญหาต่าง ๆ อย่างมาก เช่น การตกค้างในผลิตผลทางการเกษตร การปนเปื้อนในอากาศและแหล่งน้ำ ปัจจุบันมีการใช้สารสกัดจากพืชเพื่อใช้ควบคุมศัตรูพืชทดแทนสารเคมี (Jacobson, 1989) เพิ่มขึ้น และผลิตเป็นผลิตภัณฑ์สำเร็จรูป

การใช้สารสกัดจากพืชป้องกันและกำจัดศัตรูพืชให้ได้อย่างเต็มประสิทธิภาพ จำเป็นต้องทราบความเข้มข้นสารออกฤทธิ์ที่เหมาะสม อัตราการใช้ และวิธีการใช้ที่ถูกต้อง ตลอดจนการเก็บรักษาและอายุการใช้งานของสารสกัด ผลิตภัณฑ์สารสกัดจากพืชสำเร็จรูปต้องมีฉลากระบุชนิดของสารออกฤทธิ์ซึ่งเป็นตัวบ่งชี้คุณภาพของสารสกัด การตรวจสอบปริมาณสารออกฤทธิ์เป็นประโยชน์ต่อเกษตรกรผู้ใช้ให้มีความเชื่อมั่นในคุณภาพของผลิตภัณฑ์ และใช้เป็นแนวทางในการกำหนดค่าความเข้มข้นมาตรฐานของสารที่สกัดได้จากธรรมชาติ ในปี 2543 พรรณีกาและรัตนาภรณ์ ได้สำรวจผลิตภัณฑ์สะเดาที่มีจำหน่ายในประเทศ พบว่าบางผลิตภัณฑ์มีความเข้มข้นของสารออกฤทธิ์ต่ำมากไม่ตรงตามฉลาก

สารสำคัญหรือสารออกฤทธิ์ในพืชสะเดาคือ azadirachtin (Klaus,1995) หางไหลคือ rotenone (Trease and Evan, 1985) ในว่านน้ำได้แก่ อาซาโรน (Oprean *et al.,* 1998) ในขมิ้นชันได้แก่ เคอร์คูมินอยด์ (Govindarajan, 1980) ผลิตภัณฑ์จากพืชดังกล่าวจึงมีสารออกฤทธิ์นั้นๆเป็นองค์ประกอบ ในการขอขึ้นทะเบียน

ขมิ้นชันมีชื่อทางวิทยศาสตร์ว่า *Curcuma longa Linn* อยู่ในวงศ์ Zingiberaceae ส่วนที่นำมาใช้คือเหง้าที่แก่จัดทั้งแห้งและสด เหง้าแห้งนิยมบดเป็นผง เหง้าขมิ้นชันประกอบด้วยสารสำคัญคือ

เคอร์คูมิน (curcumin) เป็น สารสีเหลืองและน้ำมันหอมระเหยมีสีเหลืองอ่อน ขมิ้นชันมีคุณสมบัติไล่แมลงและกำจดแมลงได้หลายชนิดเช่น ด้วงงวง ด้วงถั่วเขียว มอดข้าวเปลือก หนอนใยผัก หนอนหลอดหอม หนอนกระทู้ผัก สารสกัดจากขมิ้นชันมีฤทธิ์ในการฆ่า แบคทีเรีย ฆ่าและยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อรา

การวิเคราะห์สารประกอบเคอร์คูมินอยในผงขมิ้นชันโดยวิธี High performance liquid chromatography (HPLC) พบว่าวิธีนี้สามารถวิเคราะห์สารประกอบเคอร์คูมินอยซึ่งประกอบด้วยสาร curcumin, dimeththoxycurcumin และ bisdemethoxycurcumin โดยมีปริมาณของสาร curcumin มากกว่าสารชนิดอื่น (Guddadarangavvanahally, 2002)

การวิเคราะห์ปริมาณสารออกฤทธิ์เคอร์คูมิน ยังไม่มีวิธีวิเคราะห์ที่ใช้ในการตรวจสอบที่มีมาตรฐาน เพื่อให้ผลวิเคราะห์ที่ได้เป็นที่ยอมรับ โดยดำเนินการตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีทดสอบ (Method Validation) ที่สามารถให้ผลการวิเคราะห์ที่น่าเชื่อถือ ถูกต้อง แม่นยำ เพื่อเป็นมาตรฐานของห้องปฏิบัติการ

วิธีดำเนินการ

อุปกรณ์และสารเคมี

1. เครื่องชั่งละเอียด 4 ตำแหน่ง ที่ผ่านการสอบเทียบ
2. Volumetric flask และ pipette ที่ผ่านการสอบเทียบ
3. ขวดใส่ตัวอย่างขนาด 2 มิลลิลิตร สำหรับเครื่องฉีดตัวอย่างอัตโนมัติ
4. เครื่อง High performance liquid chromatography (HPLC) Agilent Technology 1200 series
5. สารมาตรฐานเคอร์คูมิน (Curcumin)
6. Acitonitrile ชนิด High performance liquid chromatography (HPLC grade)
7. Formic acid ชนิด High performance liquid chromatography (HPLC grade)
8. ตัวอย่างผลิตภัณฑ์สารสกัดขมิ้นชัน

วิธีการ

ตัวอย่างและการเตรียมตัวอย่าง

สำรวจเก็บตัวอย่างผลิตภัณฑ์สารสกัดขมิ้นชัน และนำมาสกัดโดยสกัดด้วยเฮกเซน 30 นาที ทิ้งไว้ให้แยกชั้นหลังจากนั้นนำชั้นเฮกเซนทิ้ง และนำส่วนที่เหลือมาสกัดด้วยเมทานอล 50 มล. เป็นเวลา 2 ชม. นำสารสกัดที่ได้มา 1 มล.ปรับปริมาตรด้วยเมทานอลให้ได้ 10 มล. รอการวิเคราะห์ต่อไป

การเตรียมสารละลายตัวอย่างที่เติมสารมาตรฐาน (spike sample)

เติมสารมาตรฐานเคอร์คูมินลงในตัวอย่างผลิตภัณฑ์สารสกัดขมิ้นชันที่ไม่พบสารเคอร์คูมิน (matrix blank) ให้มีความเข้มข้น 3 ระดับ คือ 5, 10 และ 15 mg/L

การตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์

ชั่งสารมาตรฐานเคอร์คูมินให้มีน้ำหนักที่แน่นอน 10 mg ละลายด้วยเมทานอล 10 mL จะได้สารละลายเคอร์คูมินที่มีความเข้มข้น 1000 mg/L และเจือจางสารละลายมาตรฐานเคอร์คูมินที่ความเข้มข้นต่างๆ ตั้งแต่ 1-50 mg/L แล้วปรับปริมาตรด้วยเมทนอล กรองสารละลายมาตรฐานแต่ละความเข้มข้นด้วยกระดาษกรองไนลอน ขนาด 0.45 µm เพื่อใช้ตรวจหาช่วงความเข้มข้นที่ให้กราฟมาตรฐานเป็นเส้นตรง (linearity and range) ทำการทดลอง 3 ซ้ำ

การหาค่าขีดจำกัดของการตรวจวัด (LOD) และขีดจำกัดของการวิเคราะห์ปริมาณ (LOQ) คำนวณได้จากการ plot กราฟระหว่างความเข้มข้นกับค่า Standard devation (SD) หาค่า So จากกราฟ ค่า LOD = 3So และ LOQ = 10So

การหาค่าความแม่น (accuracy) และการหาค่าความเที่ยง (precision) โดยใช้ spike sample นำไปฉีดเข้าเครื่อง HPLC หาปริมาณเคอร์คูมินเปรียบเทียบกับ calibration curve ทำการทดลอง 10 ซ้ำ แล้วนำผลที่ได้ไปคำนวณหาค่าร้อยละของการกลับคืน (% recovery) และความเที่ยงตรง (%RSD) ทำการประเมิน precision โดยใช้ HORRAT

การวิเคราะห์ปริมาณเคอร์คูมินโดยใช้ HPLC มีสภาวะเครื่องดังนี้

Column Waters Spherisorb® C18 5um ODS2, 4.6x250 mm

Mobile phase Methanol : Formic acid (65:35)

Column oven 40°C

Flow 1 mL/min

Detector Diode array λ 425 nm

Injection volume 20 uL

ระยะเวลา ตุลาคม 2555-กันยายน 2557

สถานที่ดำเนินงาน ห้องปฏิบัติการเคมี สำนักวิจัยพัฒนาปัจจัยการผลิตทางการเกษตร กรมวิชาการเกษตร เขตจตุจักร กรุงเทพฯ

ผลการทดลองและวิจารณ์

ผลการตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์สารสำคัญเคอร์คูมินในผลิตภัณฑ์สารสกัดขมิ้นชัน

วิเคราะห์ปริมาณสารสำคัญเคอร์คูมินด้วยเครื่อง เครื่อง High performance liquid chromatography (HPLC) Agilent Technology 1200 series ที่มีสภาวะของเครื่องดังนี้

Column Waters Spherisorb® C18 5um ODS2, 4.6x250 mm

Mobile phase Methanol : Formic acid (65:35)

Column oven 40°C

Flow 1 mL/min

Detector Diode array λ 425 nm

Injection volume 20 uL

ผลการศึกษาขีดจำกัดต่ำสุดของการตรวจวัด (LOD) พบว่ามีค่าขีดจำกัดต่ำสุดที่สามารถตรวจวัดได้ที่ความเข้มข้นเท่ากับ 0.15 mg/L และการศึกษาขีดจำกัดของการวิเคราะห์ปริมาณ (LOQ) พบว่ามีขีดต่ำสุดที่สามารถวิเคราะห์ได้ที่ความเข้มข้นเท่ากับ 0.51 mg/L

ผลการศึกษาช่วงความเป็นเส้นตรง พบว่ากราฟที่ให้ค่าความเป็นเส้นตรงของสารละลายมาตรฐานเคอร์คูมินอยู่ในช่วง 5-20 mg/L และมีค่า correlation coefficients (r^2) เท่ากับ 0.9944

ผลการศึกษาค่าความแม่น (precision) และค่าความเที่ยง (accuracy) ได้ค่า %RSD คือ 1.634, 1.244 และ 1.011 ซึ่งผ่านเกณฑ์การยอมรับคือมีค่า HORRAT ไม่เกิน 2 (Horwitz, 2000) และการทดสอบค่า accuracy ได้เปอร์เซ็นต์ของสารที่วิเคราะห์กลับคืน (% recovery) ที่ความเข้มข้น 3 ระดับ คือ 5, 10 และ 15 mg/L ดังนี้ 99.4%, 100.09% และ 100.53% ตามลำดับ (ตารางที่ 1)

ตารางที่ 1 ผลการวิเคราะห์ความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์สารสำคัญเคอร์คูมินในผลิตภัณฑ์สารสกัดขมิ้นชัน

ผลการวิเคราะห์	ปริมาณสารมาตรฐานที่เติม (spike sample, mg/L)		
	5	10	15
Mean	4.967	10.009	15.079
SD	0.081	0.125	0.152
%RSD	1.634	1.244	1.011
% recovery	99.4	100.09	100.53
% recovery (AOAC)	80-110	80-110	80-110
HORRAT	0.197	0.167	0.144

มีรายงานการศึกษาการวิเคราะห์องค์ประกอบของสารสำคัญ *Curcuma longa Linn* โดยใช้เทคนิค HPLC และ GC ซึ่งสามารถวิเคราะห์แยกสารองค์ประกอบหลักได้เพื่อทำ fringerprint ของ *Curcuma longa Linn* ได้ (Zhang *et. al*., 2008, Jadhav *et. al*., 2007 และ Rui L. *et. al*., 2011)

สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ

ผลการทดสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์สารสำคัญเคอร์คุมินในผลิตภัณฑ์สารสกัดขมิ้นชัน ให้ผลการทดลองดังนี้ Linearity และ range ของวิธีวิเคราะห์มีค่า Correlation Coefficient (R^2) 0.9944 และมีค่า range อยู่ในช่วง 5-20 mg/L

Accuracy และ Precision ที่ 3 ระดับความเข้มข้นผ่านเกณฑ์มาตรฐานที่กำหนด คือมีค่า % recovery อยู่ในช่วง 80-110 เปอร์เซ็นต์ ค่า %RSD น้อยกว่า 20 และมีค่า HORRAT ไม่เกิน 2 สำหรับ LOD และ LOQ มีค่า 0.15 mg/L และ 0.51 mg/L ตามลำดับ

การนำผลงานวิจัยไปใช้ประโยชน์

จากผลการตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์เคอร์คูมินในสารสกัดขมิ้นชันและผลิตภัณฑ์ ด้วยเครื่อง High performance liquid chromatography (HPLC) ที่ 425 นาโนเมตร สามารถนำไปใช้เป็นวิธีมาตรฐานสำหรับห้องปฏิบัติการ เป็นฐานข้อมูลให้กับนักวิจัย นักศึกษาและผู้ที่สนใจต่อไป

เอกสารอ้างอิง

Govindarajan, V.S. 1980. Turmeric-Chemistry: Technology and Quality. *CRC Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 12: 199-301.

Guddadarangavvanahally, K., Jayaprakasha., L.J. Mohan Rao. and K.K. Sakariah. 2002. Improved HPLC Method for the Determination of curcumin, Demethoxycurcumin, and Bisdemethoxycurcumin. *J. Agric. Food Chem*. 50: 3668-3672.

Jadhav, B.K., Mahadik, K.R., and Paradkar, A.R., 2007. Development and validation of improved reversed phase-HPLC method for simultaneous determination of curcumin, demethoxycurcumin, and bisdemethoxycurcumin, Chromatographia 65, 483–488.

Jacobson, M. 1989. Botanical Pesticides: Past, Present, and Future *In* Insecticides of Plant Origin. ACS Symposium Series 387, American Chemical Sociaty, Washington,DC., 1989: pp. 1-10.

Klaus,W. 1995. Biologically Active Ingredents *In* The Neem Tree Source of Unique Natural Productsfor Integrated Pest Management, Medicine, industry and Other Purposes: Schmutterer, H.,Ed., VCH Verlaggesellschaft mbH, Weinheim, Germany pp. 372-373.

Oprean, R., M. Tamas. and L. Roman. 1998. Comparison of GC-MS and TLC techniques for asarone isomers determination. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 18(1998): 227-234.

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.

Zhang, J.S., Guan, J., Yang, F.Q., Liu, H.G., Cheng, X.J. and Li, S.P. 2008 Qualitative and quantitative analysis of four species of *Curcuma* rhizomes using twice development thin layer chromatography, Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis 48, 1024–1028.