นิพนธ์ต้นฉบับ

การวิเคราะห์เชิงคุณภาพและเชิงปริมาณของขิงด้วยวิธี Ultra Performance Liquid Chromatography

อภิรักษ์ ศักดิ์เพ็ชร*, พีรธรรม เทียมเทียบรัตน์, ดวงเพ็ญ ปัทมดิลก

สถาบันวิจัยสมุนไพร กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข จังหวัดนนทบุรี 11000

***ผู้รับผิดชอบบทความ:** *apirak.s@dmsc.mail.go.th*

บทคัดย่อ

การศึกษานี้มีวัตถุประสงค์เพื่อพัฒนาวิธีวิเคราะห์เชิงคุณภาพและเชิงปริมาณของขิงโดยตรวจหาสารสำคัญในกลุ่มที่ให้รสเผ็ดร้อน ซึ่งได้แก่ สารกลุ่ม gingerols และ shogaols ด้วยวิธี Ultra Performance Liquid Chromatography (UPLC) การวิเคราะห์เชิงคุณภาพของขิง ทำโดยนำตัวอย่างขิง 300 มิลลิกรัม มาแช่สกัดใน methanol ปริมาตร 20.0 มิลลิลิตร เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ดูดสารละลายใสส่วนบนมากรองผ่าน nylon syringe filter ฉีดสารละลายตัวอย่างที่ได้ปริมาตร 3 ไมโครลิตร เข้าสู่ระบบโครมาโทกราฟซึ่งประกอบด้วย คอลัมน์ Acquity™ BEH C18 2.1×50 มิลลิเมตร, 1.7 ไมโครเมตร วัฏภาคเคลื่อนที่คือส่วนผสมของอะซิโทไนไตรล์ในน้ำ ร้อยละ 40-65 ชะแบบเกรเดียน ด้วยอัตราการไหล 0.6 มิลลิลิตรต่อนาที อุณหภูมิของตัวอย่างและอุณหภูมิคอลัมน์เท่ากับ 35 และ 40 ºC ตามลำดับ ตรวจวัดสารด้วยอัลตราไวโอเลตที่ความยาวคลื่น 226 นาโนเมตร จะตรวจพบสารที่เป็นองค์ประกอบทางเคมีที่สำคัญในขิงทั้ง 6 ชนิด ได้แก่ 6-gingerol, 8-gingerol, 10-gingerol, 6-shogaol, 8-shogaol และ 10-shogaol ที่ retention time เท่ากับ 1.71, 2.39, 2.77, 2.45, 2.91 และ 3.65 นาที ตามลำดับ ระบบดังกล่าวสามารถใช้ในการวิเคราะห์ปริมาณสาร 6-gingerol ได้ด้วย และเมื่อทำการทดสอบความใช้ได้ของวิธี พบว่า กราฟมาตรฐานของ 6-gingerol มีความเป็นเส้นตรงในช่วง 0.0474-0.2758 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร มีค่าสัมประสิทธิ์การตัดสินใจ (R^2) เท่ากับ 0.9998 ค่าความแม่นอยู่ในช่วงร้อยละ 100.68-101.19 ค่าความเที่ยงอยู่ในช่วงร้อยละ 0.43-0.51 มีค่าขีดจำกัดของการตรวจพบและขีดจำกัดของการหาปริมาณ เท่ากับ 0.0038 และ 0.0127 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ เมื่อศึกษาปริมาณสาร 6-gingerol ในขิง จำนวน 8 ตัวอย่าง พบว่า มีปริมาณสารดังกล่าวอยู่ในช่วงร้อยละ 0.50-1.49 โดยน้ำหนัก

คำสำคัญ: ขิง, *Zingiber officinale* Roscoe, gingerols, shogaols, UPLC

Received date 23/01/19; Revised date 13/08/19; Accepted date 24/09/19

Qualitative and Quantitative Analysis of Ginger Rhizome Using Ultra Performance Liquid Chromatographic Technique

Apirak Sakpetch*, **Peradhama Thiemthieprat, Duangpen Pattamadilok**

Medicinal Plant Research Institute, Department of Medical Sciences, Ministry of Public Health, Nonthaburi 11000, Thailand

***Corresponding author**: apirak.s@dmsc.mail.go.th*

Abstract

The objective of this study is to develop the qualitative and quantitative analytical method of ginger rhizome by monitoring the pungent ingredients including gingerols and shogaols by using Ultra Performance Liquid Chromatographic (UPLC) technique. For qualitative analysis of ginger, 300 mg of powdered ginger was macerated in 20.0 ml of methanol for 24 h. Supernatant solution was pipetted and filtered through the nylon syringe filter. 3 μl of sample solution was injected into the chromatographic system consisting of Acquity™ BEH C18 2.1×50 mm, 1.7 μm column and 40-65% of acetonitrile solution in water as mobile phase. Gradient elution was performed. Flow rate was set at 0.6 ml/min. Chamber temperature of sample chamber and column were 35 and 40°C, respectively. Detection was performed at the UV wavelength of 226 nm. 6 active compounds including 6-gingerol, 8-gingerol, 10-gingerol, 6-shogaol, 8-shogaol and 10-shogaol were detected at the retention times at 1.71, 2.39, 2.77, 2.45, 2.91 and 3.65 min, respectively. This system could be also used for determination of 6-gingerol content. The validation result of the developed method exhibited the linearity of calibration curve of 6-gingerol was in the range of 0.0474-0.2758 mg/ml with coefficient of determination (R^2) 0.9998. Accuracy and precision were in the range of 100.68-101.19% and 0.43-0.51%, respectively. Limit of detection and limit of quantitation were 0.0038 and 0.0127 mg/ml, respectively. When 8 samples of ginger were analysed, the content of 6-gingerol was obtained in the range of 0.50-1.49% w/w.

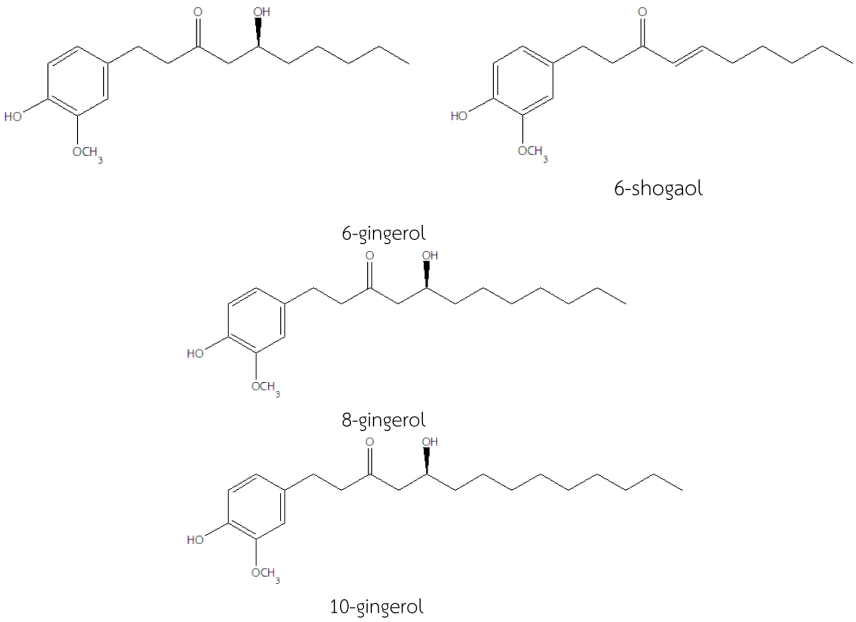
Key words: Ginger, *Zingiber officinale* Roscoe, gingerols, shogaols, UPLC

บทนำ

ขิง มีชื่อวิทยาศาสตร์ว่า *Zingiber officinale* Roscoe เป็นพืชในวงศ์ Zingiberaceae ชื่อสามัญว่า ginger ชื่ออื่น ๆ ได้แก่ ขิงแกลง ขิงแดง (จันทบุรี) ขิงเผือก (เชียงใหม่) สะเอ (กะเหรี่ยง-แม่ฮ่องสอน)[1] เป็นพืชล้มลุก มีเหง้าใต้ดินขึ้นเป็นกอ เหง้ามีลักษณะเป็นข้อ เนื้อในสีขาวหรือสีเหลืองอ่อน มีลำต้นเทียมมีกาบหรือโคนใบหุ้ม ใบเป็นใบเดี่ยวรูปหอก ปลายใบสอบเรียวแหลม ออกเรียงสลับเป็นสองแถว ดอกสีขาว ออกเป็นช่อ ดอกมีกาบสีเขียวปนแดงห่อรองรับกลีบดอกและกลีบเลี้ยงอย่างละ 3 กลีบ เกสรตัวผู้ 6 อัน ผลกลมแข็ง[2] ส่วนที่นำมาใช้ประโยชน์ทางยา คือ เหง้าขิง (rhizome) ประโยชน์ทางยาในบัญชียาหลักแห่งชาติมีทั้งในรูปยาเดี่ยวในการขับลมบรรเทาอาการท้องอืดท้องเฟ้อ และเป็นส่วนประกอบในตำรับยาหลายตำรับ เช่น ยาหอมอินทจักร์ ยาเบญจกูล ยาตรีพิกัด ยาธรณีสันฑะฆาต เป็นต้น[3] สารสำคัญในเหง้าขิง คือ น้ำมันหอมระเหยซึ่งมีองค์ประกอบทางเคมีหลักเป็นสารกลุ่ม sesquiterpene hydrocarbons ได้แก่ (-)-zingiberine, (+)-ar-curcumene, (-)-*b*-

sesquiphellandrene, *b*-bisabolene, camphene, phellandrene, zingiberol, eucalyptol, citral, borneol, linalool เป็นต้น ส่วนสารที่ให้รสเผ็ดร้อน เป็นสารในกลุ่ม phenylalkanones ซึ่งชนิดหลัก ได้แก่ gingerols และ shogaols สารกลุ่ม diarylheptanoids ได้แก่ gingerenones A-C, isogingerenone B และ gingerdione[4]

การควบคุมคุณภาพของขิงมีเกณฑ์มาตรฐานของปริมาณสารสำคัญในหลายเภสัชตำรับ มีเพียงเภสัชตำรับ United State Pharmacopoeia Dietary Supplements Compendium (USP DSC) เท่านั้นที่มีข้อกำหนดคุณภาพของสารที่ให้รสเผ็ดร้อน โดยกำหนดปริมาณ gingerols และ gingerdiones ซึ่งรวมกันไม่น้อยกว่าร้อยละ 0.8 โดยน้ำหนัก กำหนดปริมาณ shogaols ไม่เกินร้อยละ 0.2 โดยน้ำหนัก USP DSC ยังกำหนดปริมาณน้ำมันหอมระเหย ไม่น้อยกว่าร้อยละ 1.8 โดยปริมาตรต่อน้ำหนัก[5] เภสัชตำรับของจีน ออสเตรีย และข้อกำหนดขององค์การอนามัยโลก ข้อกำหนดปริมาณน้ำมันหอมระเหย โดยไม่น้อยกว่าร้อยละ 0.8, 1.5 และ 2.0 โดยปริมาตรต่อน้ำหนัก ตามลำดับ เภสัชตำรับของอินเดีย ญี่ปุ่น และอังกฤษ ไม่มีข้อกำหนดมาตรฐานของปริมาณสารสำคัญทั้ง 2 กลุ่ม มีเพียงการควบคุมปริมาณเถ้า ปริมาณสารสกัดด้วยตัวทำละลาย[4] ส่วนตำรามาตรฐานยาสมุนไพรไทย ฉบับปี พ.ศ. 2561 (Thai Herbal Pharmacopoeia 2018) มีข้อกำหนดปริมาณสารสำคัญเฉพาะน้ำมันหอมระเหยเท่านั้น และการตรวจเชิงคุณภาพหรือการตรวจเอกลักษณ์ทางเคมีก็จะตรวจหาองค์ประกอบทางเคมีในน้ำมันหอมระเหย โดยไม่มีข้อกำหนดคุณภาพของสารสำคัญกลุ่ม gingerols หรือ shogaols แต่อย่างใด[6] การศึกษานี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อพัฒนาวิธีวิเคราะห์เชิงคุณภาพโดยตรวจหาสารกลุ่ม gingerols และ shogaols และพัฒนาวิธีวิเคราะห์เชิงปริมาณโดยการหาปริมาณสาร 6-gingerol ซึ่งผลที่ได้จากการศึกษานี้จะสามารถนำไปใช้ควบคุมคุณภาพของขิงต่อไป



ภาพที่ 1 โครงสร้างทางเคมีของสารสำคัญบางชนิดที่พบในขิง

ระเบียบวิธีศึกษา

วัสดุ

1. สมุนไพรขิง

รวบรวมตัวอย่างเหง้าขิงจากแหล่งต่าง ๆ ทั้งแหล่งธรรมชาติและร้านขายสมุนไพร จำนวน 8 ตัวอย่าง ในช่วงระหว่างเดือนธันวาคม 2558 ถึงเมษายน 2559 ตัวอย่างขิงสดนำมาล้างให้สะอาด ย่อยขนาด อบแห้งที่อุณหภูมิ 45°C นำไปบดเป็นผงละเอียด ผ่านแร่งเบอร์ 180 แล้วเก็บในภาชนะแก้วสีชาปิดฝาสนิท

2. สารมาตรฐาน

6-gingerol ความบริสุทธิ์ ≥ 98% (Chengdu Biopurify Phytochemicals, China)

8-gingerol ความบริสุทธิ์ ≥ 95% (Sigma-Aldrich, Switzerland)

10-gingerol ความบริสุทธิ์ ≥ 95% (Sigma, USA)

6-shogaol ความบริสุทธิ์ ≥ 98% (Chengdu Biopurify Phytochemicals, China)

8-shogaol ความบริสุทธิ์ ≥ 98% (Chengdu Biopurify Phytochemicals, China)

10-shogaol ความบริสุทธิ์ ≥ 98% (Chengdu Biopurify Phytochemicals, China)

3. สารเคมีและตัวทำละลาย

อะซิโทไนไตรล์ ชนิด HPLC (Merck, Germany) และ น้ำ (deionized water)

4. เครื่องมือ

Acquity™ Ultra Performance Liquid Chromatograph-PDA detector (Waters, USA) และ Empower 2 software, เครื่องชั่งไฟฟ้า ความละเอียด 0.01 มิลลิกรัม (Mettler-Toledo, Switzerland)

5. วัสดุวิทยาศาสตร์และเครื่องแก้ว

Acquity™ UPLC BEH C18, 2.1×50 มิลลิเมตร, 1.7 ไมโครเมตร (Waters, USA), nylon syringe filter สำหรับกรองสารละลายตัวอย่าง, PVDF membrane filter 0.2 ไมโครเมตร สำหรับกรองตัวทำละลาย, nylon membrane filter 0.2 ไมโครเมตร สำหรับกรอง DI water, tuberculin syringe สำหรับดูดสารละลายตัวอย่างในขั้นตอนการเตรียมตัวอย่าง, volumetric flask ชนิด light protect ขนาด 10 และ 100 มิลลิลิตร, glass stoppered-flask, pipette

วิธีการศึกษา

1. วิธีวิเคราะห์เชิงคุณภาพของขิง

ทำการพัฒนาวิธีตรวจเอกลักษณ์ทางเคมีของขิงโดยใช้ UPLC fingerprint และตรวจหาสารกลุ่ม gingerols และ shogaols โดยสารกลุ่ม gingerols ที่ตรวจหา ได้แก่ 6-gingerol, 8-gingerol และ 10-gingerol และสารกลุ่ม shogaols ที่ตรวจหา ได้แก่ 6-shogaol, 8-shogaol และ 10-shogaol

2. วิธีวิเคราะห์เชิงปริมาณของขิง

2.1 การพัฒนาวิธีวิเคราะห์ปริมาณ 6-gingerol ในขิง ด้วยวิธี UPLC[7]

2.1.1 การเลือกชนิดของตัวทำละลายในการสกัด

จากรายงานการวิจัยในอดีต พบว่า ตัวทำละลายที่สามารถสกัดสาร 6-gingerol ได้ดีมีหลายชนิด เช่น methanol, ethyl acetate เป็นต้น ส่วนผสมของแอลกอฮอล์และน้ำจะทำให้ความสามารถในการสกัดสาร 6-gingerol ลดลง โดยเมื่ออัตราส่วนของ

น้ำเพิ่มขึ้น ปริมาณสาร 6-gingerol จะถูกสกัดออกมาได้น้อยลง[8] จึงทำการศึกษาเปรียบเทียบความสามารถของตัวทำละลายในการสกัดสาร 6-gingerol จากขิง โดยตัวทำละลายที่เลือกใช้ จำนวน 2 ชนิด ได้แก่ methanol และ ethanol ในเบื้องต้นจะสกัดด้วยวิธีการแช่สกัด (maceration) เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ตามวิธีของ USP DSC 2015[5]

2.1.2 การศึกษาวิธีการสกัดและระยะเวลาสกัดที่เหมาะสม

ภายหลังจากการคัดเลือกตัวทำละลายที่เหมาะสมในการสกัดสาร 6-gingerol ในขิง จาก ข้อ 2.1.1 แล้ว จึงมาศึกษาเพื่อหาวิธีสกัดใหม่โดยมุ่งหวังลดระยะเวลาการสกัดให้สั้นลงกว่าเดิม เนื่องจากวิธีการสกัดสาร 6-gingerol ในขิงตาม USP DSC ต้องใช้ระยะเวลา 24 ชั่วโมง

ทำการศึกษาเปรียบเทียบวิธีการสกัดสาร 6-gingerol ด้วยตัวทำละลายที่เหมาะสมจากข้อ 2.1.1 วิธีต่าง ๆ ได้แก่ วิธีการแช่สกัดเป็นเวลา 1, 2, 3, 4, 6 และ 24 ชั่วโมง และวิธีรีฟลักซ์ เป็นเวลา 30 และ 60 นาที

2.1.3 ความยาวคลื่นในการตรวจวัด

วัดการดูดกลืนแสงอัลตราไวโอเลตของสาร 6-gingerol เพื่อดูความยาวคลื่นที่สารชนิดนี้สามารถดูดกลืนแสงสูงสุด และวิเคราะห์สารละลายตัวอย่างขิงโดยใช้ PDA เพื่อเลือกความยาวคลื่นที่เหมาะสมที่สุดที่มีความจำเพาะ (specificity) สำหรับการตรวจวัดสาร 6-gingerol โดยไม่มีสารรบกวนอื่น (interference)

2.1.4 วัฏภาคคงที่และวัฏภาคเคลื่อนที่

วัฏภาคคงที่ ศึกษาเปรียบเทียบคอลัมน์ชนิดต่าง ๆ ที่มีความแตกต่างกัน เช่น ชนิดของอนุภาคภายในคอลัมน์ (BEH C18, BEH C8 และ BEH phenyl) ความยาวของคอลัมน์ (50 และ 100 มิลลิเมตร) โดยพิจารณาผลการแยกสาร 6-gingerol ลักษณะของพีคสาร 6-gingerol (รูปร่างและความสมมาตรของพีค) และ retention time ของสาร 6-gingerol

วัฏภาคเคลื่อนที่ ศึกษาชนิดและอัตราส่วนของตัวทำละลายที่จะใช้เป็นวัฏภาคเคลื่อนที่ โดยพิจารณาจากรูปร่างของพีคสาร 6-gingerol และ retention time ของสารดังกล่าว และความสามารถในการแยกพีคของสาร 6-gingerol ออกจากสารอื่น ๆ ในสารละลายตัวอย่างขิง

นอกจากนี้ยังได้ศึกษาถึงอุณหภูมิ ปริมาตรของสารที่ฉีดที่เหมาะสมวิธีวิเคราะห์ปริมาณสาร 6-gingerol ในขิงด้วยวิธี UPLC

โดยสรุปวิธีจากการศึกษาในข้อ 2.1.1-2.1.4

2.2 การทดสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์

ทำการทดสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์สาร 6-gingerol ในขิง ที่ได้พัฒนาขึ้นตามแนวปฏิบัติการทดสอบความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์ทางเคมีโดยห้องปฏิบัติการเดียว กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข[9]

2.3 การวิเคราะห์ปริมาณสาร 6-gingerol ในขิง

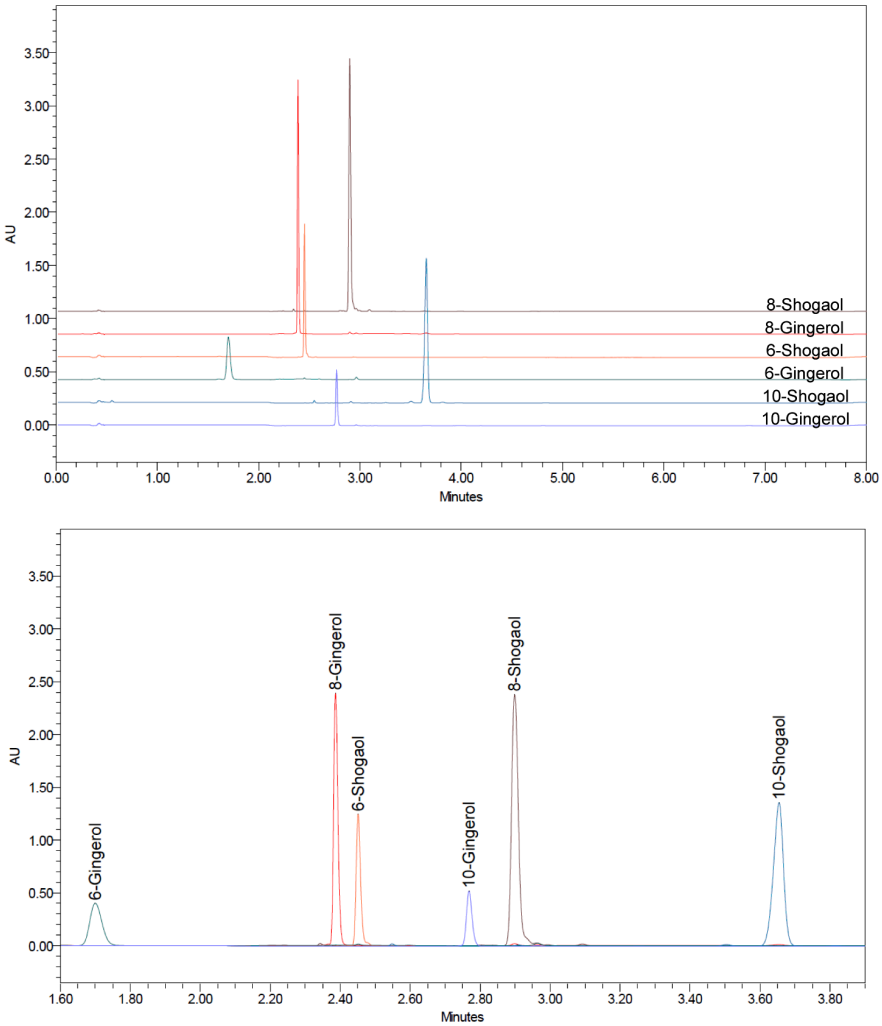
ศึกษาคุณภาพของขิงโดยวิเคราะห์ปริมาณสาร 6-gingerol ในขิง จำนวน 8 ตัวอย่าง ที่รวบรวมจากแหล่งต่าง ๆ ทั้งแหล่งธรรมชาติและร้านขายสมุนไพร โดยใช้วิธีวิเคราะห์ที่ได้พัฒนาขึ้น

ผลการศึกษา

1. วิธีวิเคราะห์เชิงคุณภาพของขิง[7]

การเตรียมสารละลายตัวอย่าง

นำตัวอย่างขิง น้ำหนัก 300 มิลลิกรัม มาสกัด



ภาพที่ 2 โครมาโทแกรมของสารกลุ่ม gingerols และ shogaols

โดยวิธีแช่สกัดใน methanol ปริมาตร 20.0 มิลลิลิตร เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ดูดสารละลายส่วนใสมากรองผ่าน nylon syringe filter ได้สารละลายตัวอย่างเพื่อนำไปวิเคราะห์

ระบบโครมาโทกราฟ

ระบบโครมาโทกราฟที่ได้จากการศึกษาวิธีตรวจเอกลักษณ์ทางเคมีของขิงโดยใช้ UPLC fingerprint ดังตารางที่ 1 ซึ่งระบบดังกล่าวถูกนำไปใช้ในการวิเคราะห์ปริมาณสาร 6-gingerol ด้วย

ผลการตรวจเอกลักษณ์ทางเคมีของขิง จำนวน 8 ตัวอย่าง ด้วยวิธี UPLC ดังภาพที่ 3

UPLC โครมาโทแกรมของตัวอย่างขิงทุกตัวอย่างที่นำมาศึกษา จะพบสารที่เป็นองค์ประกอบทางเคมีที่สำคัญในขิงทั้ง 6 ชนิด ได้แก่ 6-gingerol, 8-gingerol, 10-gingerol, 6-shogaol, 8-shogaol และ 10-shogaol ที่ retention time เท่ากับ 1.71, 2.39, 2.77, 2.45, 2.91 และ 3.65 นาที ตามลำดับ โดยสารที่พบมากที่สุด ได้แก่ 6-gingerol และ

ตารางที่ 1 ระบบโครมาโทกราฟที่ใช้สำหรับการวิเคราะห์เชิงคุณภาพและเชิงปริมาณของขิง

วัฏภาคคงที่	คอลัมน์ Acquity™ UPLC BEH C18, 2.1×50 มิลลิเมตร, 1.7 ไมโครเมตร					
วัฏภาคเคลื่อนที่	A. อะซิโทไนไตรล์ B. น้ำกำจัดอิออน					
การชะ	แบบเกรเดียน (gradient)					
		เวลา (นาที)	**อัตราการไหล (มิลลิลิตรต่อนาที)**	**ร้อยละ ของ A**	**ร้อยละ ของ B**	**curve**
	1	0.00	0.60	40.0	60.0	
	2	1.60	0.60	40.0	60.0	6
	3	2.00	0.60	65.0	35.0	3
	4	5.00	0.60	65.0	35.0	6
	5	7.00	0.60	65.0	35.0	6
	6	7.40	0.60	40.0	60.0	8
ปริมาตรการฉีดสาร	3 ไมโครลิตร					
อุณหภูมิช่องตัวอย่าง	35°C					
อุณหภูมิคอลัมน์	40°C					
การตรวจวัดสาร	UV 226 นาโนเมตร					

6-shogaol (ภาพที่ 4)

2. วิธีวิเคราะห์เชิงปริมาณของขิง[7]

2.1 การพัฒนาวิธีวิเคราะห์ปริมาณสาร 6-gingerol ในขิง ด้วยวิธี UPLC

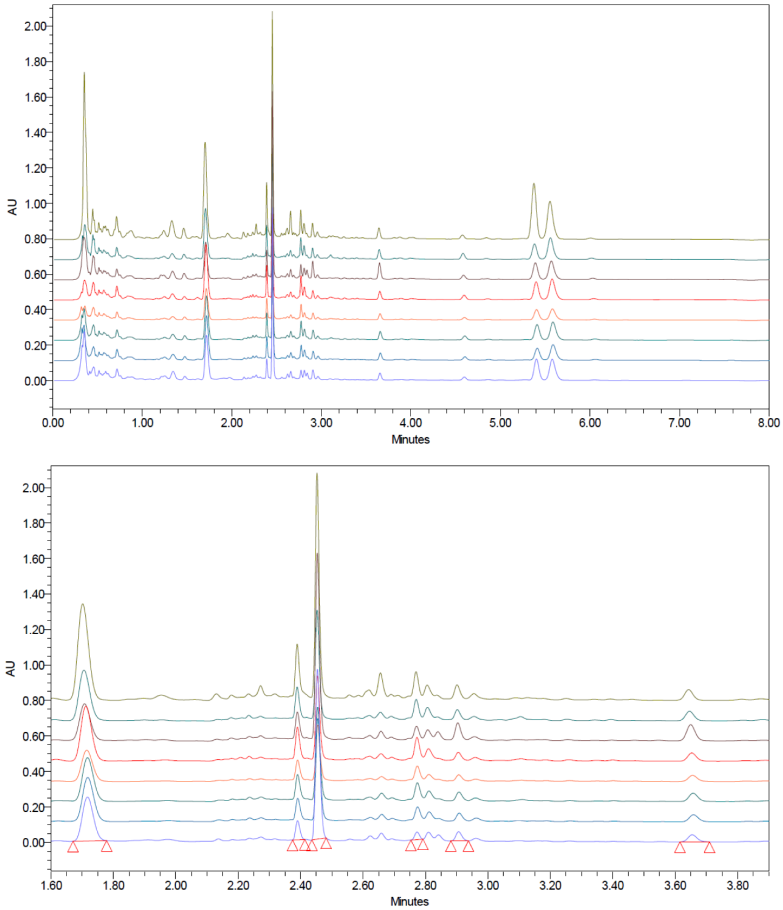
2.1.1 การเลือกชนิดของตัวทำละลายในการสกัด

ผลการศึกษาเปรียบเทียบความสามารถของตัวทำละลายในการสกัดสาร 6-gingerol จากขิง โดยตัวทำละลายที่เลือกใช้ จำนวน 2 ชนิด ได้แก่ methanol และ ethanol สกัดด้วยวิธีแช่สกัด เป็นเวลา 24 ชั่วโมง พบว่า methanol สามารถสกัดสาร 6-gingerol ได้มากที่สุด และสารละลายตัวอย่างที่ได้มีความคงตัวเป็นเวลาไม่น้อยกว่า 5 วัน

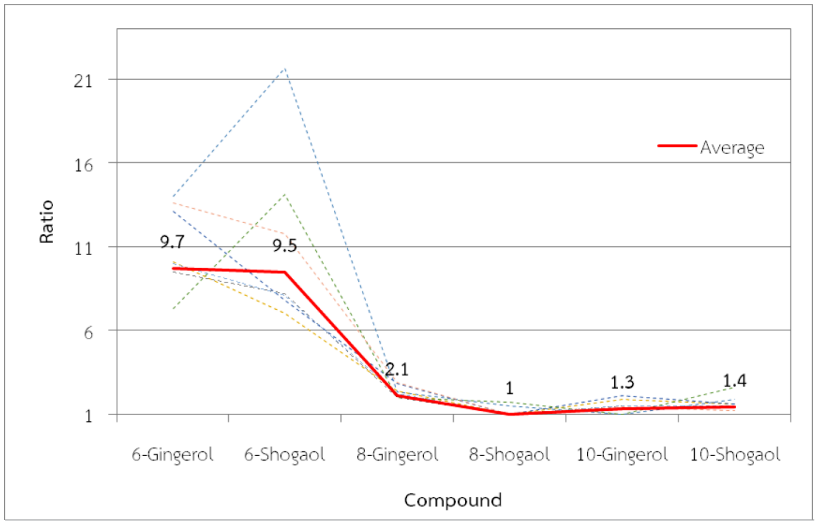
2.1.2 การศึกษาวิธีการสกัดและระยะเวลาสกัดที่เหมาะสม

จากการศึกษาเปรียบเทียบวิธีการสกัดสาร 6-gingerol ด้วย methanol โดยแช่สกัดเป็นเวลา 1, 2, 3, 4, 6 และ 24 ชั่วโมง และรีฟลักซ์เป็นเวลา 30 และ 60 นาที พบว่า การรีฟลักซ์เป็นเวลา 30 และ 60 นาที สกัดสาร 6-gingerol ได้น้อยกว่าการแช่สกัด 60 นาที และปริมาณสาร 6-gingerol ที่สกัดได้จากการแช่สกัดเรียงตามลำดับ คือ ระยะเวลาแช่สกัด 1-4 ชั่วโมง < 6 ชั่วโมง < 24 ชั่วโมง เมื่อพิจารณาความคงตัวของสารละลายตัวอย่างที่สกัดได้ พบว่า เมื่อสกัดด้วยวิธีรีฟลักซ์ซึ่งเป็นการใช้ความร้อน สารละลายตัวอย่างจะมีลักษณะขุ่นเมื่อตั้งทิ้งไว้ข้ามคืน

นอกจากนี้ในขั้นตอนการเตรียมสารละลาย



ภาพที่ 3 โครมาโทแกรมของสารสกัด methanol ของขิง ตัวอย่างที่ 1-8



ภาพที่ 4 อัตราส่วนของปริมาณสารกลุ่ม gingerols และ shogaols ในตัวอย่างขิง

ตัวอย่างก่อนฉีดเข้าสู่ระบบโครมาโทกราฟ จะต้องมีการกรองสารละลายตัวอย่างผ่าน syringe filter จึงได้ศึกษาผลของตัวกรองชนิดต่าง ๆ ต่อปริมาณสาร 6-gingerol ซึ่งพบว่า ในสารละลายตัวอย่างขิงตัวอย่างเดียวกัน เมื่อกรองผ่านตัวกรองชนิด PVDF จะได้สาร 6-gingerol ออกมาน้อยกว่าตัวกรองชนิด nylon และ PTFE โดยที่ตัวกรอง 2 ชนิดหลัง ได้สาร 6-gingerol ออกมาในปริมาณเท่ากัน แต่เมื่อพิจารณาต้นทุนการวิเคราะห์ ตัวกรองชนิด nylon จะมีราคาต่ำกว่า

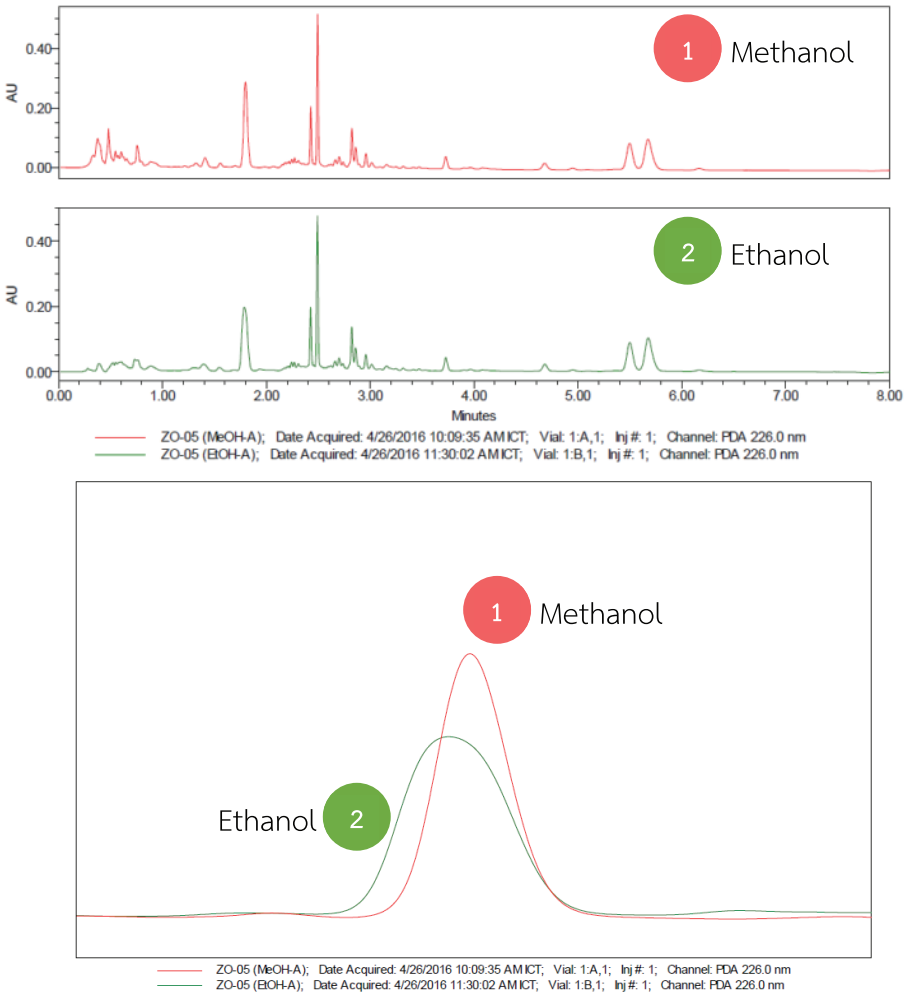
2.1.3 ความยาวคลื่นในการตรวจวัด

ที่ความยาวคลื่น 226 นาโนเมตร สามารถตรวจวัดสาร 6-gingerol ได้ดีที่สุดโดยที่ไม่พบสารอื่นรบกวน (interfere) ดังนั้น ในการพัฒนาวิธีวิเคราะห์นี้ จึงเลือกใช้ตัวตรวจวัด (detector) ชนิด PDA และทำการตรวจวัดที่ UV ความยาวคลื่น 226 นาโนเมตร

2.1.4 วัฏภาคคงที่และวัฏภาคเคลื่อนที่

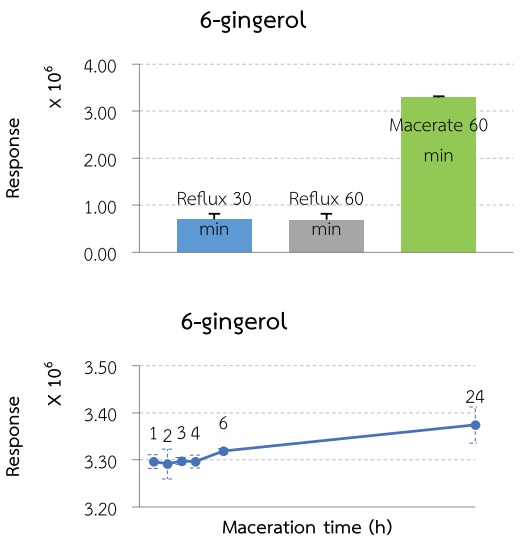
วัฏภาคคงที่ พบว่า Acquity™ UPLC BEH C18 2.1×50 มิลลิเมตร, 1.7 มิลลิเมตร ให้ผลการแยกสาร 6-gingerol ได้ดีที่สุด ดังภาพที่ 3

วัฏภาคเคลื่อนที่ ได้ทำการศึกษาเลือก

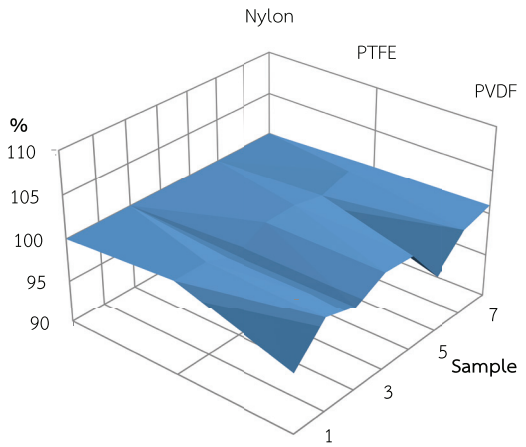


ภาพที่ 5 เปรียบเทียบโครมาโทแกรมของสารสกัดขิงที่ได้จากตัวทำละลาย methanol และ ethanol

ชนิดและอัตราส่วนของตัวทำละลายที่ใช้เป็นวัฏภาคเคลื่อนที่โดยพิจารณาจากรูปร่างพีคและ retention time ของสาร 6-gingerol ความสามารถในการแยกสารรบกวนอื่นออกจากสาร 6-gingerol ในขิง และความดันของระบบโครมาโทกราฟ ดังนั้น ในการพัฒนาวิธีวิเคราะห์นี้ จึงเลือกใช้ส่วนผสมของอะซิโทไนไตรล์ในน้ำ ร้อยละ 40-65 ชะแบบเกรเดียน ที่อัตราการไหล 0.6 มิลลิลิตรต่อนาที พบว่าสาร 6-gingerol มีค่า retention time ประมาณ 1.7 นาที



ภาพที่ 6 เปรียบเทียบผลการศึกษาวิธีการสกัดและระยะเวลาสกัด



ภาพที่ 7 เปรียบเทียบผลของตัวกรองชนิดต่าง ๆ

2.1.5 วิธีวิเคราะห์ปริมาณสาร 6-gingerol ในขิง ด้วยวิธี UPLC

จากผลการศึกษาในข้อ 2.1.1-2.1.4 นำมาสรุปเป็นวิธีวิเคราะห์ปริมาณสาร 6-gingerol ในขิงได้ดังนี้

การเตรียมสารละลายตัวอย่าง

นำตัวอย่างขิง น้ำหนัก 300 มิลลิกรัม (ชั่งอย่างละเอียด) มาสกัดโดยวิธีแช่สกัดใน methanol ปริมาตร 20.0 มิลลิลิตร เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ดูดสารละลายส่วนใสมากรองผ่าน nylon syringe filter จะได้สารละลายตัวอย่างเพื่อนำไปวิเคราะห์ต่อไป

การเตรียมสารละลายมาตรฐาน

6-gingerol น้ำหนัก 45 มิลลิกรัม (ชั่งอย่างละเอียด) นำมาละลายใน methanol และปรับปริมาตรจนครบ 100.0 มิลลิลิตร ได้ stock standard solution จากนั้นนำมาเจือจางโดยปิเปต stock standard solution ปริมาตร 1, 2, 3, 4, 5 และ 6 มิลลิลิตร ใส่ลงในขวดแก้วปรับปริมาตร แล้วปรับปริมาตรด้วย methanol จนครบ 10.0 มิลลิลิตร

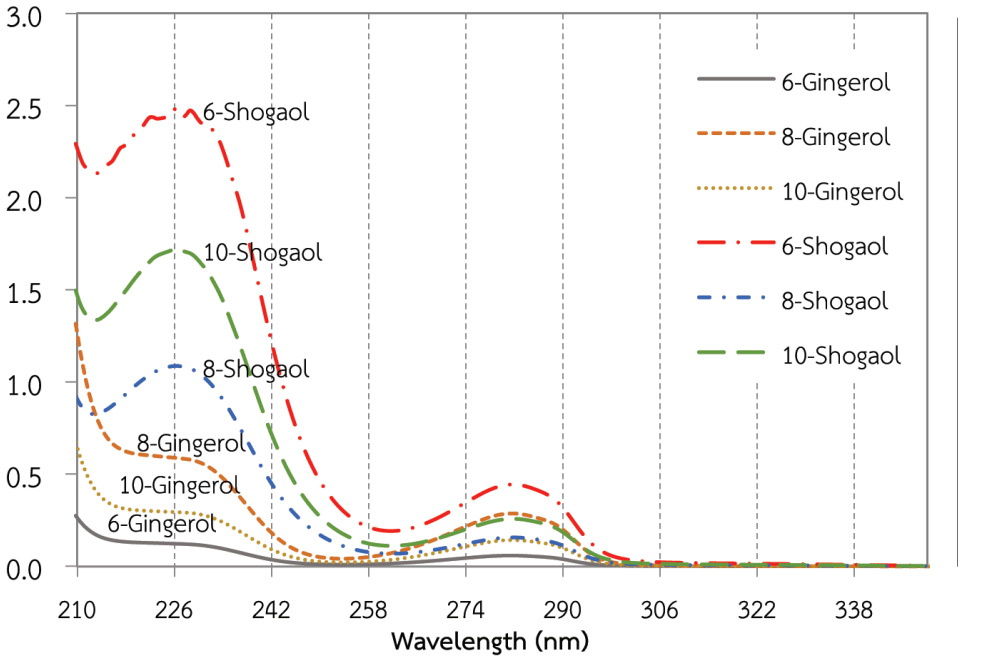
ระบบโครมาโทกราฟ

ดังตารางที่ 1

2.2 การทดสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์

2.2.1 ช่วง (range) และความเป็นเส้นตรง (linearity)

เมื่อฉีดสารละลายมาตรฐาน 6-gingerol ที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ ความเข้มข้นละ 3 ซ้ำ และทำการวิเคราะห์ซ้ำ 3 ครั้ง ตามวิธีที่พัฒนาขึ้น พบว่า กราฟมาตรฐาน (calibration curve) มีความเป็นเส้นตรงในช่วง 0.0474-0.2758 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ด้วยค่า coefficient of determination (R^2) เท่ากับ 0.9998



ภาพที่ 8 UV spectrum ของสารกลุ่ม gingerols และ shogaols

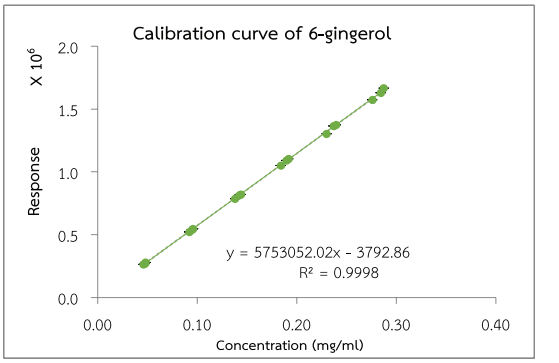
ดังภาพที่ 9

2.2.2 ความแม่น (accuracy) และความเที่ยง (precision)

เติมสารมาตรฐาน 6-gingerol ที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ จำนวน 3 ช่วงระดับการใช้งาน ลงใน sample blank (เตรียม spiked sample) จากนั้นทำการวิเคราะห์ด้วยวิธีที่พัฒนาขึ้น โดยวิเคราะห์ sample blank (unspiked sample) และ spiked sample ทำการวิเคราะห์ 6 ซ้ำ แล้วคำนวณค่า %recovery และ %RSD ผลดังตารางที่ 2 ซึ่งรายงานเป็นค่าเฉลี่ยของแต่ละระดับ

2.2.3 ขีดจำกัดของการตรวจพบ (limit of detection; LOD) และขีดจำกัดของการหาปริมาณ (limit of quantitation; LOQ)

จากกราฟมาตรฐาน สามารถหาค่าขีดจำกัดของการตรวจพบและขีดจำกัดของการหาปริมาณ โดย



ภาพที่ 9 มาตรฐานของสาร 6-gingerol

คำนวณจากค่า $3S_{y/x}$ และ $10S_{y/x}$ ได้เท่ากับ 0.0038 และ 0.0127 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ

2.3 การวิเคราะห์ปริมาณสาร 6-gingerol ในขิง

เมื่อทำการวิเคราะห์ตัวอย่างขิง จำนวน 8 ตัวอย่าง ด้วยวิธีที่พัฒนาขึ้น โดยวิเคราะห์ตัวอย่างละ 2 ซ้ำ ผลการวิเคราะห์ดังตารางที่ 3

ตารางที่ 2 ผลการทดสอบความแม่นและความเที่ยงของวิธีวิเคราะห์ปริมาณสาร 6-gingerol ในขิงที่พัฒนาขึ้น

spiked sample	%recovery	%RSD	เกณฑ์การยอมรับ*
low level (70% target)	100.68	0.43	
medium level (100% target)	101.19	0.51	95-105%
high level (150% target)	100.88	0.45	

ตารางที่ 3 ผลการวิเคราะห์ปริมาณสาร 6-gingerol ในขิง

ตัวอย่างที่	ปริมาณสาร 6-gingerol ในขิง (ร้อยละโดยน้ำหนัก)			%RPD
	1	2	ค่าเฉลี่ย	
1	0.71	0.72	0.71	1.58
2	0.71	0.72	0.71	1.08
3	0.69	0.69	0.69	0.27
4	0.50	0.50	0.50	0.25
5	0.86	0.88	0.86	1.60
6	0.57	0.58	0.58	0.30
7	0.79	0.81	0.80	2.72
8	1.49	1.48	1.49	0.51
	ค่าเฉลี่ย		0.79	
	sd		0.29	

*อ้างอิงตาม The AOAC manual for the peer verified methods program (1993)

อภิปรายผล

งานวิจัยนี้ได้พยายามพัฒนาวิธีให้สามารถตรวจวิเคราะห์ได้ทั้งเชิงคุณภาพและเชิงปริมาณ กล่าวคือ สามารถใช้เป็นวิธีตรวจเอกลักษณ์ทางเคมีของขิง สามารถแยกให้เห็นถึงสารกลุ่ม gingerols และ shogaols รวม 6 ชนิด แต่ในที่นี้จะวิเคราะห์ปริมาณสาร 6-gingerol เท่านั้น หากต้องการหาปริมาณสารกลุ่ม gingerols และ shogaols ชนิดอื่น ๆ ก็สามารถใช้ระบบวิเคราะห์นี้ได้ เพียงแต่ต้องหาสารมาตรฐานชนิดอื่นมาเพิ่มเติมในการสร้าง calibration curve ตลอดจนการทดสอบความใช้ได้ของวิธี

เมื่อทดสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์ปริมาณสาร 6-gingerol ในขิงที่พัฒนาขึ้น พบว่า วิธีดังกล่าวมีความเหมาะสม แม่นยำ และรวดเร็ว สามารถนำวิธีนี้ไปใช้ในการควบคุมคุณภาพของขิงต่อไปได้

ในการศึกษาปริมาณสาร 6-gingerol ในขิงจำนวน 8 ตัวอย่าง พบว่า ปริมาณสารดังกล่าวมีค่าต่ำสุดและสูงสุด คิดเป็น ร้อยละ 0.50 และ 1.49 โดยน้ำหนัก ตามลำดับ ซึ่งแตกต่างกันถึงเกือบ 3 เท่า นอกจากนี้ยังพบอีกว่าปริมาณสาร 6-gin-

gerol และ 6-shogaol ในตัวอย่างดังกล่าว คิดเป็นอัตราส่วนโดยเฉลี่ยเท่ากับ 1:1 ซึ่งมีความแตกต่างกับข้อกำหนดของ USP DSC ที่กำหนดให้ปริมาณ gingerols และ gingerdiones รวมกันไม่น้อยกว่าร้อยละ 0.8 โดยน้ำหนัก และปริมาณ shogaols ไม่เกินร้อยละ 0.2 โดยน้ำหนัก คิดเป็นอัตราส่วน 4:1 ซึ่งข้อกำหนดของ shogaols เป็น limit test เนื่องจากปริมาณสารกลุ่มดังกล่าวเป็นตัวบ่งชี้คุณภาพขิง โดยปริมาณสารกลุ่ม gingerols จะลดลงตามระยะเวลาและอุณหภูมิของการเก็บรักษา และถูกเปลี่ยนเป็นสารกลุ่ม shogaols โดยกระบวนการ dehydration[10] แต่เนื่องจากปริมาณสารกลุ่ม gingerols และ shogaols ที่ได้จากแต่ละภูมิประเทศจะมีอัตราส่วนที่แตกต่างกัน ดังนั้น การจัดทำข้อกำหนดปริมาณสารสำคัญในขิงไทย สำหรับใช้ในการคัดเลือกขิงที่มีคุณภาพเพื่อเข้าสู่กระบวนการผลิตยาหรือผลิตภัณฑ์สุขภาพ จึงเป็นสิ่งสำคัญ

สำหรับในประเทศไทย ยังไม่มีข้อกำหนดหรือเกณฑ์มาตรฐานของสารกลุ่ม gingerols และ shogaols ในขิง ดังนั้น ผลงานวิจัยนี้สามารถนำไปต่อยอดโดยการนำไปศึกษาปริมาณสาร 6-gingerol และสารกลุ่ม shogaols ในตัวอย่างขิงจำนวนมากขึ้น เพื่อให้สามารถกำหนดเป็นเกณฑ์มาตรฐานของปริมาณสารสำคัญในขิงได้

ข้อสรุป

การวิเคราะห์เชิงคุณภาพของขิงด้วยวิธี Ultra Performance Liquid Chromatography (UPLC) ที่พัฒนาขึ้น สามารถตรวจพบสารที่เป็นองค์ประกอบทางเคมีที่สำคัญในขิงทั้ง 6 ชนิด ได้แก่ 6-gingerol, 8-gingerol, 10-gingerol, 6-shogaol, 8-shogaol และ 10-shogaol ที่ retention time เท่ากับ 1.71, 2.39, 2.77, 2.45, 2.91 และ 3.65 นาที ตามลำดับ และสามารถนำวิธีดังกล่าวมาใช้ในการวิเคราะห์เชิงปริมาณของขิงได้ โดยการวิเคราะห์ปริมาณสาร 6-gingerol ผลการทดสอบความใช้ได้ของวิธี พบว่า กราฟมาตรฐานของ 6-gingerol มีความเป็นเส้นตรงในช่วง 0.0474-0.2758 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร มีค่า coefficient of determination (R^2) เท่ากับ 0.9998 มีค่าความแม่นและความเที่ยงของวิธีวิเคราะห์อยู่ในเกณฑ์การยอมรับ (%recovery อยู่ในช่วงร้อยละ 100.68-101.19, %RSD อยู่ในช่วงร้อยละ 0.43-0.51) ค่าขีดจำกัดของการตรวจพบและขีดจำกัดของการหาปริมาณที่คำนวณได้ เท่ากับ 0.0038 และ 0.0127 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ จากการวิเคราะห์เชิงปริมาณในตัวอย่างขิง จำนวน 8 ตัวอย่าง พบว่า มีปริมาณสาร 6-gingerol อยู่ในช่วงร้อยละ 0.50-1.49 โดยน้ำหนัก (%RPD อยู่ในช่วงร้อยละ 0.30-2.72)

References

1. Office of Forest Herbarium, Forest and Plant Conservation Research Office, Department of National Parks, Wildlife and Plant Conservation. Thai plant names Tem Smitinand. Bangkok: National Office of Buddhism Printing House; 2014. 828 p. (in Thai)
2. Boonyaprapat N, Chokechaicharernporn O. Samunprai maipeunban (1). Bangkok: Prachachon Co. Ltd; 1996. 895 p. (in Thai)
3. National List of Essential Medicines A.E. 2018. Published in Government Gazette on 19 January B.E. 2561 (2018). (in Thai)
4. Soonthorncharoennon N, Ruengwisate N. Analysis, research quality of Thai crude drug. Bangkok: Concept medicus Co. Ltd; 2008. 583 p. (in Thai)
5. The United State Phamacopoeial Convention. USP Dietary Supplements Compendium. Vol. 1. 2015:1146-50.
6. Department of Medical Sciences. Thai Herbal Pharmacopoeia 2018. Bangkok: Keawjawjom Printing & Publishing Suan Sunandha Rajabhat University; 2018. 172-9.
7. Pattamadilok D, Sakpetch A, Thiemthieprat P. Final

report: Development and validation of analytical method for determination of gingerols in ginger using Ultra Performance Liquid Chromatography. Nonthaburi: Medicinal Plant Research Institute, Department of Medical Sciences; 2016. 24 p. (in Thai)

8. Shao X, Lv L, Park T, Wu H, Ho C.-T, Sang S. Quantitative analysis of ginger components in commercial products using liquid chromatography with electrochemical array detection. J. Agric. Food Chem. 2010;58:12608-14.
9. Department of Medical Sciences. A practical guide for single laboratory method validation of chemical methods. Nonthaburi: Department of Medical Sciences, Ministry of Public Health; 2006. 124 p. (in Thai)
10. Jung MY, Lee MK, Park HJ, Oh EB, Shin JY, Park JS, Jung SY, Oh JH, Choi DS. Heat-induced conversion of gingerols to shogaols in ginger as affected by heat type (dry or moist heat), sample type (fresh or dried), temperature and time. Food Sci Biotechnol. 2017;27(3):687-93.