

การพัฒนาและทดสอบความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์ ปริมาณ 5,7-dimethoxyflavone ในสารสกัดน้ำ จากเหง้ากระชายดำด้วยวิธีโครมาโทกราฟี ของเหลวสมรรถนะสูง

สุนันtha ศรีโสภณ สมจิตร เนียมสกุล นวรัตน์ จัดเจน ศักดิ์วิชัย อ่อนทอง อธิณิน สุภาไชยกิจ
สมชาย แสนหลวงอินทร์ และ ศิริวรรณ ชัยสมบูรณ์พันธ์
สถาบันวิจัยสมุนไพร กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ ถนนพหลโยธิน 11000

บทคัดย่อ กระชายดำ (*Kaempferia parviflora* Wall. ex Baker) มีสรรพคุณในทางการแพทย์แผนไทย โดยใช้บำรุงกำลัง เพิ่มสมรรถภาพทางเพศ ช่วยให้ระบบไหลเวียนโลหิตดีขึ้น และแก้ปวดกระเพาะอาหาร ซึ่งมีสารสำคัญ คือ 5,7-dimethoxyflavone (5,7-DMF) มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ต้านอักเสบ และต้านมะเร็ง ในปัจจุบันยังไม่มีวิธีการควบคุมคุณภาพของปริมาณสารสำคัญในสารสกัดน้ำจากเหง้ากระชายดำ การศึกษานี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อพัฒนาและทดสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์ปริมาณ 5,7-DMF ในสารสกัดน้ำจากเหง้ากระชายดำด้วยวิธีโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง (UHPLC) ตรวจวัดด้วย photodiode array detector ที่ความยาวคลื่น 264 นาโนเมตร โดยใช้คอลัมน์ ZORBAX Extend-C18 Rapid Resolution HD (2.1×50 mm, 1.8 μ m) และวัฏภาคเคลื่อนที่ของ (A) 0.2% glacial acetic acid ในน้ำ และ (B) methanol แบบ gradient การเตรียมสารละลายตัวอย่างโดยสกัดด้วยวิธี sonicate ใน methanol เป็นเวลา 30 นาที ผลการศึกษาพบว่าวิธีที่พัฒนาขึ้นมีความจำเพาะ มีช่วงความเป็นเส้นตรงที่ความเข้มข้นตั้งแต่ 0.06–0.36 mg/ml โดยค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ (r) มากกว่า 0.999 ร้อยละการคืนกลับ (%recovery) อยู่ในช่วง 98.31–105.12 ความเที่ยงจากการทำซ้ำในวันเดียวกันและระหว่างนักวิเคราะห์มีค่าที่ยอมรับได้ (%RSD < 2, %RSD < 4 และ HORRAT < 2 ตามลำดับ) ขีดจำกัดการวัดเชิงปริมาณ (LOQ) เท่ากับ 0.04 mg/ml วิธีการตรวจวิเคราะห์ที่พัฒนาขึ้นนี้สามารถนำไปใช้ประโยชน์ในการตรวจวิเคราะห์ปริมาณ 5,7-DMF เพื่อควบคุมคุณภาพของสารสกัดน้ำกระชายดำที่มีการจำหน่ายในเชิงพาณิชย์ได้

คำสำคัญ: การพัฒนาวิธีวิเคราะห์, การทดสอบความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์, 5,7-dimethoxyflavone, สารสกัดน้ำ
เหง้ากระชายดำ, UHPLC

Corresponding author E-mail: sununta.s@dmisc.mail.go.th

Received: 8 December 2021

Revised: 23 September 2022

Accepted: 6 October 2022

บทนำ

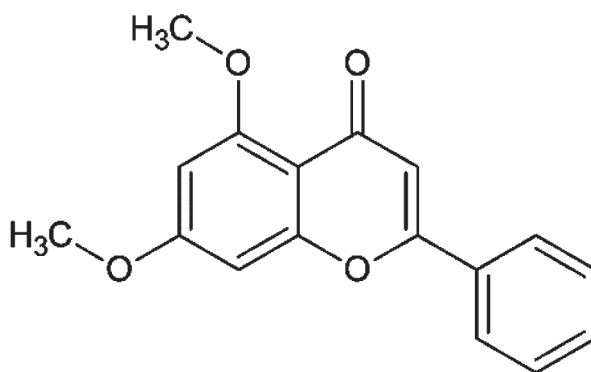
กระชายดำ มีชื่อวิทยาศาสตร์ คือ *Kaempferia parviflora* Wall. ex Baker อยู่ในวงศ์ Zingiberaceae⁽¹⁾ ชื่ออังกฤษ คือ Black ginger⁽²⁾ ส่วนที่นำมาใช้ประโยชน์ทางยา คือ เหง้า ซึ่งมีลักษณะกลม เรียงต่อกัน อวบน้ำ ผิวสีน้ำตาล เนื้อมีสีม่วงอ่อน ม่วงเข้ม จนถึงสีม่วงดำ สรรพคุณในทางการแพทย์แผนไทยใช้บำรุงกำลัง เพิ่มสมรรถภาพทางเพศ เป็นยาอายุวัฒนะ ช่วยให้ระบบไหลเวียนโลหิตดีขึ้น ขับลม แก้อักเสบ แก้ปวดกระเพาะอาหาร เป็นต้น⁽²⁾ ดังแสดงในภาพที่ 1

สารเคมีที่เป็นองค์ประกอบหลักในน้ำมันหอมระเหยจากเหง้ากระชายดำ คือ borneol การสกัดเหง้ากระชายดำด้วยตัวทำละลายที่มีความเป็นขั้วสูง เช่น methanol และ ethanol พบสารกลุ่ม flavonoids⁽³⁾

เช่น 5,7-dimethoxyflavone (5,7-DMF) ซึ่งเป็นองค์ประกอบทางเคมีที่สำคัญ⁽⁴⁾ ดังแสดงในภาพที่ 2 โดยสารนี้มีรายงานว่ามียฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ฤทธิ์ต้านมะเร็ง โดยสามารถยับยั้งการเจริญของ human cervical cancer HeLa cell line และ human gastric adenocarcinoma AGS cell line⁽⁵⁾ ฤทธิ์ต้านอักเสบ โดยยับยั้งการแสดงออกของ iNOS, COX-2 และ Rel A mRNA⁽⁶⁾ ฤทธิ์ขยายหลอดเลือดและต้านอนุมูลอิสระ ซึ่งสามารถป้องกันความเสียหายของ ischaemia-refusion⁽⁷⁾ ต้านการอักเสบและ degranulation ของ basophilic leukemia cell ของหนู⁽⁸⁾ และยับยั้ง human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) ได้⁽⁹⁾ ด้วยฤทธิ์ทางชีวภาพที่สำคัญของกระชายดำ ทำให้กระชายดำได้รับการขนานนามว่า โสมเมืองไทย



ภาพที่ 1 เหง้ากระชายดำสด



ภาพที่ 2 โครงสร้างทางเคมีของ 5,7-dimethoxyflavone

แผนแม่บทแห่งชาติว่าด้วยการพัฒนาสมุนไพร ฉบับที่ 1 พ.ศ. 2560–2564 โดยกระทรวงสาธารณสุข และองค์การภาครัฐ-เอกชน กำหนดสมุนไพรที่มีศักยภาพ เป็น product champion ซึ่งกระชายดำได้รับการคัดเลือกให้เป็นสมุนไพรเป้าหมายเพื่อขับเคลื่อนแผนดังกล่าว^(10–12) ผลิตภัณฑ์เสริมอาหารหลายยี่ห้อ ในท้องตลาดมีส่วนประกอบของสารสกัดกระชายดำ ซึ่งจากข้อมูลโครงการศึกษาโอกาสทางการตลาดสารสกัดสมุนไพรเป้าหมายปี พ.ศ. 2561 พบว่าสารสกัดกระชายดำ มีมูลค่าการตลาดประมาณ 34 ล้านบาท ส่วนใหญ่ประมาณ ร้อยละ 69 เป็นการจำหน่ายไปยังอุตสาหกรรมยาแผนโบราณ และรองลงมาประมาณร้อยละ 24 จำหน่ายไปยังอุตสาหกรรมผลิตภัณฑ์เสริมอาหาร⁽¹³⁾ ดังนั้น การควบคุมคุณภาพสมุนไพรสารสกัดกระชายดำ จึงมีความจำเป็น เพราะจะทำให้ผู้บริโภคได้รับประโยชน์ จากการใช้สมุนไพรและทำให้มั่นใจถึงประสิทธิภาพที่ได้รับด้วย การตรวจวิเคราะห์ปริมาณสารสำคัญในสมุนไพร เป็นวิธีการควบคุมคุณภาพทางเคมีซึ่งการใช้ UHPLC ซึ่งเป็นวิธีการวิเคราะห์ที่มีความไวและความจำเพาะสูง สามารถวิเคราะห์ตัวอย่างได้อย่างรวดเร็วและมีประสิทธิภาพ⁽¹⁴⁾ การศึกษานี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อพัฒนา และทดสอบความใช้ได้ของวิธีตรวจปริมาณ 5,7-DMF ในสารสกัดน้ำกระชายดำ เพื่อให้ได้วิธีที่น่าเชื่อถือเพียงพอ และสามารถนำไปใช้ในการควบคุมคุณภาพของสารสกัดน้ำกระชายดำ

วัสดุและวิธีการ

ตัวอย่างสารสกัดน้ำกระชายดำ

วัตถุดิบกระชายดำ จำนวน 5 ตัวอย่าง ประกอบด้วย เหง้ากระชายดำสด จำนวน 1 ตัวอย่าง จากแหล่งปลูก อำเภอลำดวน จังหวัดเพชรบูรณ์ ได้รับการระบุชื่อ วิทยาศาสตร์ ตามหลักอนุกรมวิธานพืชจากสถาบันวิจัยสมุนไพร กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ โดยมีหมายเลข Herbarium specimen DMSC 5285 วัตถุดิบผงกระชายดำ จำนวน 4 ตัวอย่าง ชื้อจากร้านขายยาสมุนไพร ในเขตกรุงเทพมหานคร

การเตรียมตัวอย่างจากเหง้ากระชายดำสด โดยนำวัตถุดิบเหง้ากระชายดำสดจากแหล่งปลูกมาคัดแยก ล้าง หั่น และตากให้แห้ง นำไปอบแห้งในตู้อบร้อนที่

อุณหภูมิ 45–50 องศาเซลเซียส จากนั้นนำมาบดเป็นผง และผ่านแรงเบอร์ 180 เก็บตัวอย่างที่ได้ในขวดแก้วสีชา ปิดสนิท การเตรียมตัวอย่างจากวัตถุดิบผงกระชายดำ ที่ได้จากร้านขายยาสมุนไพร โดยนำวัตถุดิบผงกระชายดำ มาผ่านแรงเบอร์ 180 และเก็บในขวดแก้วสีชาปิดสนิท ปิดฉลากระบุชื่อ แหล่งที่มา และหมายเลขตัวอย่าง

การเตรียมสารสกัดน้ำกระชายดำ โดยชั่งตัวอย่าง 500 กรัม ใส่ลงในขวดแก้วกันกลขนาด 4 ลิตร เติมน้ำกลั่น 3.5 ลิตร จากนั้นนำไป reflux แล้วกรองด้วย กระดาษกรองเบอร์ 4 สกัดด้วยการ reflux ซ้ำ จำนวน 3 ครั้ง ทำให้อุณหภูมิของสารสกัดน้ำกระชายดำเข้มข้นด้วยเครื่องระเหยสุญญากาศและทำให้แห้งด้วยวิธีระเหิดด้วยความเย็น (freeze drying) เก็บสารสกัดน้ำกระชายดำในขวดสีชาปิดสนิทที่อุณหภูมิ 2–8 องศาเซลเซียส ปิดฉลากระบุชื่อ แหล่งที่มา วิธีเตรียม และหมายเลขตัวอย่าง จากนั้นนำสารสกัดน้ำกระชายดำไปพัฒนาวิธีวิเคราะห์และทดสอบความใช้ได้ของวิธีต่อไป

สารมาตรฐาน

5,7-DMF ความบริสุทธิ์ 99.95% (Chengdu Biopurify Phytochemicals Ltd., China, Lot. PRF20082101)

สารเคมี

methanol (HPLC grade), น้ำ (ultra purified water), glacial acetic acid (AR grade) และ ethanol (AR grade)

เครื่องมือและอุปกรณ์

เครื่อง UHPLC รุ่น 1290 Infinity II (Agilent Technologies®, Germany), guard column ชนิด Eclipse XDB-C18 ขนาด 2.1×5 มิลลิเมตร, ขนาดอนุภาค 1.8 ไมโครเมตร และ Extend-C18 ขนาด 2.1×5 มิลลิเมตร, ขนาดอนุภาค 1.8 ไมโครเมตร, column ชนิด ZORBAX Eclipse C18 Rapid Resolution HT ขนาด 2.1×100 มิลลิเมตร, ขนาดอนุภาค 1.8 ไมโครเมตร และ ZORBAX Extend-C18 Rapid Resolution HD ขนาด 2.1×50 มิลลิเมตร, ขนาดอนุภาค 1.8 ไมโครเมตร (Agilent®, USA), เครื่องชั่งความละเอียด 0.1–0.01 มิลลิกรัม (Mettler Toledo®, Switzerland), เครื่องระเหยสุญญากาศ (Eyela®, USA), ตู้อบร้อน

(Memmert[®], Germany), อ่างน้ำร้อน (Contherm scientific Ltd., New Zealand), sonicator (Ney[®], ULTRA sonik[™], USA), freeze dryer (Labconco[®], USA), PVDF syringe membrane filter ขนาด 0.22 ไมโครเมตร และกระดาดกรองเบอร์ 4

การพัฒนาวิธีวิเคราะห์

การศึกษาระบบการวิเคราะห์ด้วย UHPLC

สารละลายตัวอย่าง เตรียมโดยชั่งสารสกัดน้ำกระชายดำ (จากเหง้ากระชายดำสด) 500 มิลลิกรัม ละลายและปรับปริมาตรด้วย methanol ให้ได้ 25 มิลลิลิตร กรองสารละลายผ่าน PVDF syringe membrane filter ขนาด 0.22 ไมโครเมตร

สารละลายมาตรฐาน เตรียมโดยชั่ง 5,7-DMF 1 มิลลิกรัม ละลายและปรับปริมาตรด้วย methanol ให้ได้ 10 มิลลิลิตร กรองสารละลายผ่าน PVDF syringe membrane filter ขนาด 0.22 ไมโครเมตร

ความยาวคลื่น ศึกษาโดยนำสารละลายมาตรฐานและสารละลายสารสกัดน้ำกระชายดำไปวิเคราะห์ด้วย UHPLC การเลือกความยาวคลื่นพิจารณาจากความยาว

คลื่นสูงสุด (λ_{max}) ในการดูดกลืนแสงของ 5,7-DMF และพื้นที่ใต้พีคของ 5,7-DMF เมื่อเปรียบเทียบกับสารอื่นโดยใช้ความยาวคลื่น 264 และ 308 นาโนเมตร

วัฏภาคเคลื่อนที่ ศึกษาโดยวิเคราะห์สารละลายมาตรฐานด้วย UHPLC ใช้วัฏภาคคงที่ชนิด ZORBAX Eclipse XDB-C18 Rapid Resolution HT ขนาด 2.1×100 มิลลิเมตร ขนาดอนุภาค 1.8 ไมโครเมตร วัฏภาคเคลื่อนที่แบบ gradient ได้แก่ 0.2% glacial acetic acid ในน้ำ และ methanol การตัดสินผลวิเคราะห์พิจารณาจาก tailing factor เมื่อได้ผลการวิเคราะห์เปรียบเทียบระหว่างความเข้มข้นของ glacial acetic acid ที่แตกต่างกัน จากนั้นนำสารละลายมาตรฐานและสารละลายสารสกัดน้ำกระชายดำไปวิเคราะห์ เปรียบเทียบผลการศึกษาระหว่างวัฏภาคเคลื่อนที่แบบ gradient ของ 0.2% glacial acetic acid ในน้ำ และ methanol ระบบที่ 1 ดังแสดงในตารางที่ 1 และระบบที่ 2 ดังแสดงในตารางที่ 2 การตัดสินผลวิเคราะห์พิจารณาจาก resolution

วัฏภาคคงที่ ศึกษาโดยวิเคราะห์สารละลายมาตรฐานและสารละลายตัวอย่างสารสกัดน้ำกระชายดำด้วย UHPLC เปรียบเทียบผลการวิเคราะห์ระหว่าง

ตารางที่ 1 วัฏภาคเคลื่อนที่ระบบที่ 1

Time (minute)	0.2% Glacial acetic acid in water (%)	Methanol (%)
0	45	55
1	45	55
7	15	85
8	15	85
11	45	55
12	45	55

ตารางที่ 2 วัฏภาคเคลื่อนที่ระบบที่ 2

Time (minute)	0.2% Glacial acetic acid in water (%)	Methanol (%)
0	50	50
1	50	50
9	15	85
10	15	85
13	50	50
15	50	50

วัฏภาคคงที่ซึ่งมีลักษณะของอนุภาคภายในแตกต่างกัน ได้แก่ วัฏภาคคงที่ชนิด ZORBAX Eclipse XDB-C18 Rapid Resolution HT ขนาด 2.1×100 มิลลิเมตร ขนาดอนุภาค 1.8 ไมโครเมตร ใช้วัฏภาคเคลื่อนที่ระบบที่ 2 ดังแสดงในตารางที่ 2 กับวัฏภาคคงที่ชนิด ZORBAX Extend-C18 Rapid Resolution HD ขนาด 2.1×50 มิลลิเมตร ขนาดอนุภาค 1.8 ไมโครเมตร ใช้วัฏภาคเคลื่อนที่ระบบที่ 3 ดังแสดงในตารางที่ 3 การตัดสินผลวิเคราะห์พิจารณาจาก resolution และ tailing factor จากนั้นศึกษาเปรียบเทียบผลการปรับสัดส่วนของวัฏภาคเคลื่อนที่ระหว่างระบบที่ 3 ดังแสดงในตารางที่ 3 และระบบที่ 4 ดังแสดงในตารางที่ 4 เพื่อให้มีการแยกที่ดีขึ้น การตัดสินผลวิเคราะห์พิจารณาจาก resolution และ tailing factor

การศึกษาปัจจัยในการเตรียมสารละลายตัวอย่างสารสกัดน้ำกระชายดำสำหรับวิเคราะห์ปริมาณ 5,7-DMF ชนิดของตัวทำละลาย ซึ่งสารสกัดน้ำกระชายดำ 500 มิลลิกรัม เติมตัวทำละลาย ethanol หรือ methanol 20 มิลลิลิตร นำไป reflux นาน 30 นาที กรองผ่านกระดาษกรองเบอร์ 4 แล้วระเหยสารละลายให้แห้งด้วยเครื่องระเหยสุญญากาศ จากนั้นละลายและปรับปริมาตรด้วยตัวทำละลาย methanol ให้ได้ 25 มิลลิลิตร กรองสารละลายผ่าน PVDF syringe membrane filter ขนาด 0.22 ไมโครเมตร แล้วนำไปวิเคราะห์ด้วย UHPLC และเปรียบเทียบผลการวิเคราะห์

ระยะเวลาการสกัด ซึ่งสารสกัดน้ำกระชายดำ 500 มิลลิกรัม เติมตัวทำละลาย methanol 20 มิลลิลิตร นำไป reflux นาน 30 นาที หรือ 60 นาที กรองผ่านกระดาษ

ตารางที่ 3 วัฏภาคเคลื่อนที่ระบบที่ 3

Time (minute)	0.2% Glacial acetic acid in water (%)	Methanol (%)
0	50	50
0.5	50	50
5	25	75
6	25	75
7	50	50
8	50	50

ตารางที่ 4 วัฏภาคเคลื่อนที่ระบบที่ 4

Time (minute)	0.2% Glacial acetic acid in water (%)	Methanol (%)
0	50	50
0.5	50	50
7	25	75
8	25	75
9	50	50
10	50	50

กรองเบอร์ 4 แล้วปรับปริมาตรด้วย methanol ให้ได้ 25 มิลลิลิตร จากนั้นกรองสารละลายที่ได้ผ่าน PVDF membrane filter ขนาด 0.22 ไมโครเมตร นำไปวิเคราะห์ด้วย UHPLC และเปรียบเทียบผลการวิเคราะห์

วิธีการสกัด ชั่งสารสกัดน้ำกระชายดำ 500 มิลลิกรัม เติมน้ำ methanol 20 มิลลิลิตร นำไป reflux นาน 30 นาที กรองผ่านกระดาษกรองเบอร์ 4 และปรับปริมาตรด้วย methanol ให้ได้ 50 มิลลิลิตร จากนั้นกรองสารละลายที่ได้ผ่าน PVDF membrane filter ขนาด 0.22 ไมโครเมตร นำไปวิเคราะห์ด้วย UHPLC เปรียบเทียบกับอีกวิธี คือ ชั่งสารสกัดน้ำกระชายดำ 500 มิลลิกรัม เติมน้ำ methanol 40 มิลลิลิตร นำไป sonicate 30 นาที ทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง ปรับปริมาตรด้วย methanol ให้ได้ 50 มิลลิลิตร จากนั้นกรองสารละลายที่ได้ผ่าน PVDF membrane filter ขนาด 0.22 ไมโครเมตร แล้วนำไปวิเคราะห์ด้วย UHPLC และเปรียบเทียบผลการวิเคราะห์

การทดสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์

ความจำเพาะ (specificity)

วิเคราะห์สารละลายมาตรฐานและสารละลายสารสกัดน้ำกระชายดำด้วย UHPLC แล้วเปรียบเทียบผลของ UV spectrum และการปนเปื้อนของสารอื่น

ความเป็นเส้นตรง (linearity)

ชั่งสารมาตรฐาน 5,7-DMF 60 มิลลิกรัม ละลายและปรับปริมาตรด้วย methanol ให้ได้ 100 มิลลิลิตร ได้ stock standard solution จากนั้นเตรียมสารละลายมาตรฐาน 6 ระดับความเข้มข้นโดยเปิด stock standard solution จำนวน 1, 2, 3, 4, 5 และ 6 มิลลิลิตร ตามลำดับ เจือจางและปรับปริมาตรด้วย methanol ให้ได้ 10 มิลลิลิตร

การวิเคราะห์ sample blank ทำโดยชั่ง sample blank 500 มิลลิกรัม (7 ขั้ว) เติมน้ำ methanol 40 มิลลิลิตร นำไป sonicate 30 นาที ทิ้งไว้ให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง ปรับปริมาตรด้วย methanol จนครบ 50 มิลลิลิตร กรองสารละลายที่ได้ผ่าน PVDF membrane filter ขนาด 0.22 ไมโครเมตร แล้วนำไปวิเคราะห์ด้วย UHPLC ได้สารละลายมาตรฐานความเข้มข้น 0.06, 0.12, 0.18, 0.24, 0.30 และ 0.36 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ

กรองสารละลายที่ได้ผ่าน PVDF membrane filter ขนาด 0.22 ไมโครเมตร แล้วนำไปวิเคราะห์ด้วย UHPLC โดยวิเคราะห์ความเข้มข้นละ 3 ขั้ว สร้างกราฟมาตรฐานระหว่างความเข้มข้น (แกน x) กับ peak area (แกน y) พิจารณาความเป็นเส้นตรงของช่วงที่ทำการทดสอบจากค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ (correlation coefficient, r) ค่าสัมประสิทธิ์การตัดสินใจ (coefficient of determination, R^2) และ residual plot โดยเกณฑ์การยอมรับความเป็นเส้นตรง คือ $r > 0.99^{(15)}$, $R^2 > 0.99$ และ residual plot ที่ได้จากผลต่างของความเข้มข้นสังเกตและค่าความเข้มข้นประมาณ (y-residual) ของทุกระดับความเข้มข้นมีการกระจายตัวรอบ ๆ ค่าศูนย์⁽¹⁶⁾

ความแม่นยำ (accuracy)

การเตรียม sample blank นำสารสกัดน้ำกระชายดำทั้ง 5 ตัวอย่าง มาวิเคราะห์ปริมาณ 5,7-DMF โดยชั่งสารสกัดน้ำกระชายดำ 500 มิลลิกรัม เติมน้ำ methanol 40 มิลลิลิตร นำไป sonicate 30 นาที ทิ้งไว้ให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง ปรับปริมาตรด้วย methanol ให้ได้ 50 มิลลิลิตร กรองสารละลายที่ได้ผ่าน PVDF membrane filter ขนาด 0.22 ไมโครเมตร แล้วนำไปวิเคราะห์ด้วย UHPLC แบบ triplicate และหาค่าเฉลี่ยของผลวิเคราะห์โดยคำนวณความเข้มข้นของ 5,7-DMF ในสารสกัดน้ำกระชายดำจาก calibration curve กำหนดให้ตัวอย่างที่มีปริมาณ 5,7-DMF น้อยที่สุดเป็น sample blank โดยคำนวณปริมาณร้อยละโดยน้ำหนักของ 5,7-DMF จากสูตรดังนี้

$$\%w/w = \frac{\text{ความเข้มข้น (mg/ml)} \times \text{dilution factor} \times 100}{\text{น้ำหนักตัวอย่าง (mg)}}$$

การวิเคราะห์ spiked sample โดยเติมสารละลายมาตรฐานความเข้มข้น 0.04, 0.08 และ 0.12 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ลงใน sample blank ทำซ้ำในแต่ละระดับความเข้มข้น ความเข้มข้นละ 6 ขั้ว แล้วนำไปวิเคราะห์ด้วย UHPLC

การวิเคราะห์ analyte ทำโดยวิเคราะห์สารมาตรฐานทั้ง 3 ระดับความเข้มข้น ด้วย UHPLC คำนวณความเข้มข้นเฉลี่ยของ 5,7-DMF จาก calibration curve ตามสูตรการคำนวณ เกณฑ์การยอมรับความถูกต้อง

ของวิธีวิเคราะห์ คือ ร้อยละของการคืนกลับ (%recovery)

อยู่ในช่วงร้อยละ 95–105⁽¹⁵⁾

$$\%recovery = \frac{(C_1 - C_2)}{C_3} \times 100$$

C_1 คือ ความเข้มข้นที่วัดได้ของสารใน spiked sample

C_2 คือ ความเข้มข้นที่วัดได้ของสารใน unspiked sample

C_3 คือ ความเข้มข้นของสารมาตรฐานที่เติม

ความเที่ยง (precision)

ความเที่ยงของการทวนซ้ำ (repeatability)⁽¹⁶⁾ วิเคราะห์สารสกัดน้ำกระชายดำที่เติมสารมาตรฐานความเข้มข้น 0.04, 0.08 และ 0.12 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ระดับความเข้มข้นละ 7 ซ้ำ โดยวิเคราะห์ภายในวันเดียวกันด้วยนักวิเคราะห์ 1 คน คำนวณร้อยละของค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ (%RSD)

ความเที่ยงของการทำซ้ำ (within laboratory reproducibility)⁽¹⁶⁾ วิเคราะห์สารสกัดน้ำกระชายดำที่เติมสารมาตรฐานความเข้มข้น 0.04, 0.08 และ 0.12 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ระดับความเข้มข้นละ 7 ซ้ำ โดยนักวิเคราะห์ 2 คน วิเคราะห์ระยะเวลา 2 วัน คำนวณร้อยละของค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ (%RSD)

ประเมินค่า Horwitz's equation และ HORRAT เกณฑ์การยอมรับ คือ HORRAT < 2⁽¹⁵⁾

ขีดจำกัดการวัดเชิงปริมาณ (limit of quantitation, LOQ)

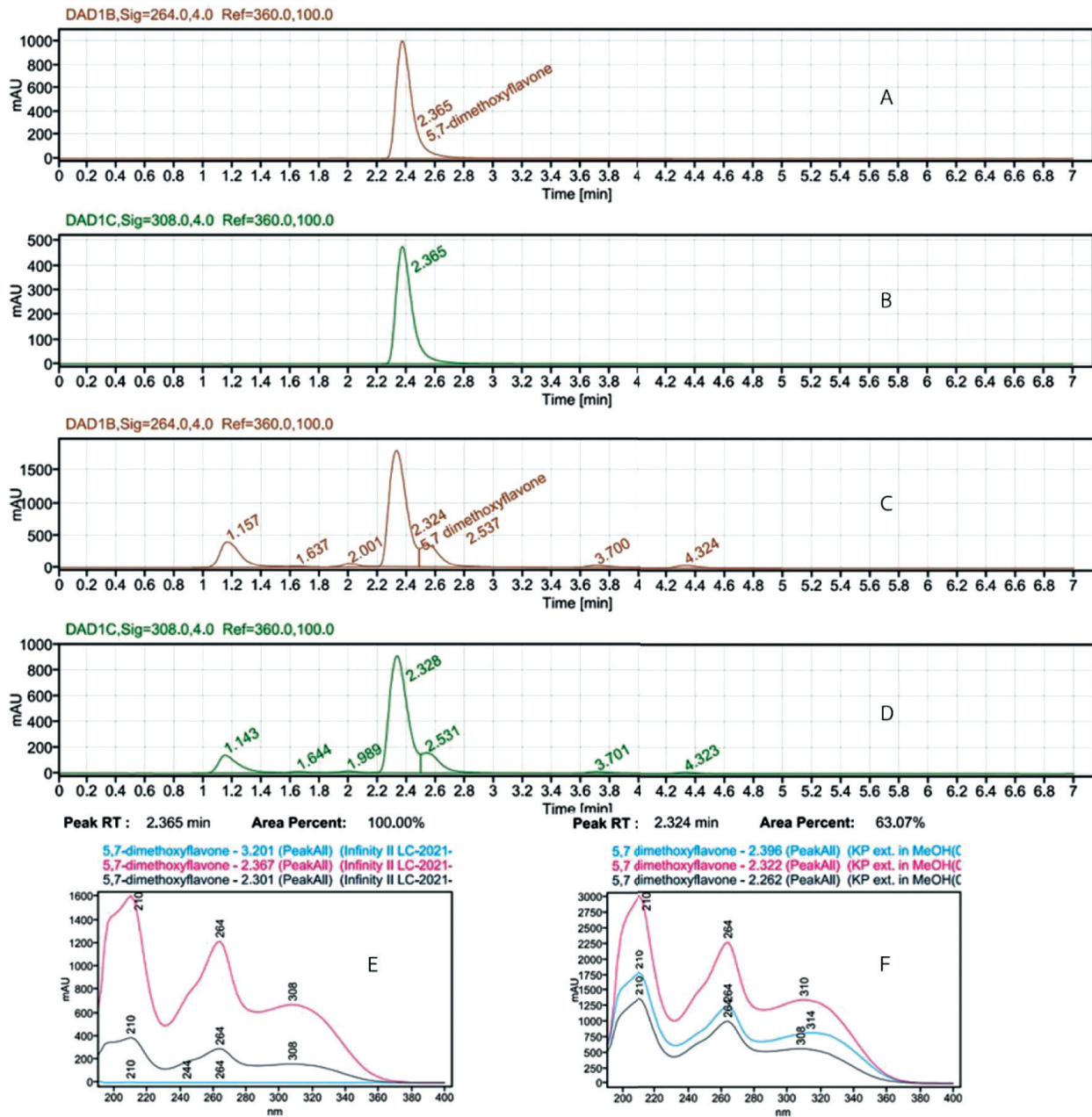
ประมาณค่า LOQ จาก calibration curve วิเคราะห์ sample blank (7 ซ้ำ) จากนั้นเตรียม spiked sample โดยเติมสารละลายมาตรฐานความเข้มข้นเท่ากับค่าประมาณของ LOQ ลงใน sample blank (6 ซ้ำ) วิเคราะห์ความเข้มข้นของสารมาตรฐานที่เติมลงไป ใน sample blank (2 ซ้ำ) คำนวณความเข้มข้นของ 5,7-DMF ในตัวอย่างจาก calibration curve ยืนยัน LOQ โดยประเมินค่าความแม่นยำด้วย %recovery และประเมินค่าความเที่ยงด้วย %RSD

ผล

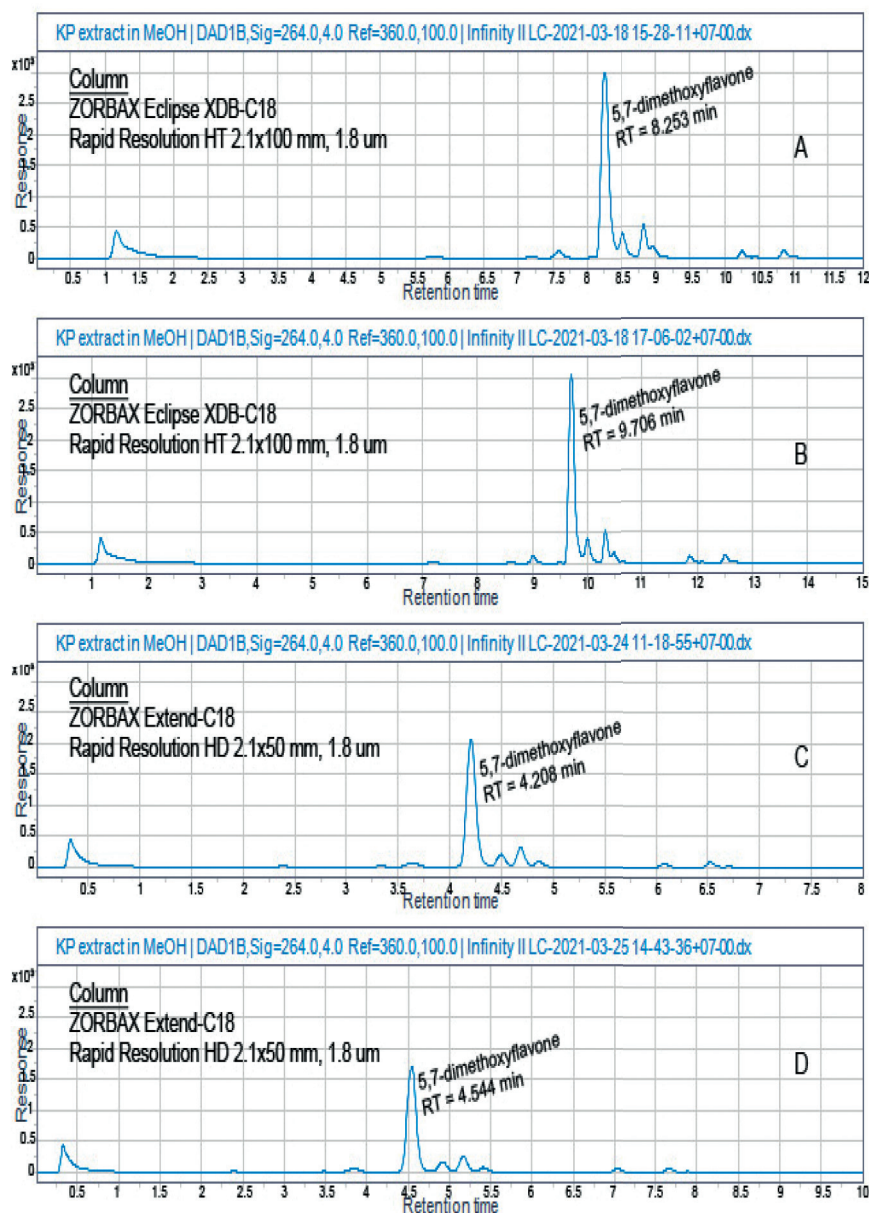
จากผลการศึกษาของการพัฒนาวิธีวิเคราะห์ ปริมาณ 5,7-DMF ในสารสกัดน้ำกระชายดำ พบว่าความยาวคลื่นที่ใช้ในการตรวจวิเคราะห์ 5,7-DMF สามารถดูดกลืนแสงได้สูงสุดที่ความยาวคลื่น 264 และ 308 nm เมื่อวิเคราะห์สารสกัดน้ำกระชายดำและพิจารณา chromatogram พบว่าความยาวคลื่นที่เหมาะสมคือ 264 นาโนเมตร ดังแสดงในภาพที่ 3

เมื่อศึกษาเปรียบเทียบวัฏภาคเคลื่อนที่ โดยวิเคราะห์สารมาตรฐานและสารสกัดน้ำกระชายดำระหว่างระบบที่ 1 กับระบบที่ 2 พบว่า resolution เท่ากับ 1.234 และ 1.347 ตามลำดับ ดังแสดงในตารางที่ 1 และ 2 ศึกษาวัฏภาคคงที่ระหว่าง column 2 ชนิด พบว่าเมื่อใช้ ZORBAX Eclipse XDB-C18 Rapid Resolution HT ขนาด 2.1×100 มิลลิเมตร ขนาดอนุภาค 1.8 ไมโครเมตร วัฏภาคเคลื่อนที่ระบบที่ 2 ได้ resolution และ tailing factor เท่ากับ 1.347 และ 1.362 ตามลำดับ ในขณะที่ใช้ ZORBAX Extend-C18 Rapid Resolution HD ขนาด 2.1×50 มิลลิเมตร ขนาดอนุภาค 1.8 ไมโครเมตร วัฏภาคเคลื่อนที่ระบบที่ 3 ได้ resolution และ tailing factor เท่ากับ 3.054 และ 1.130 ตามลำดับ เมื่อปรับสัดส่วนของวัฏภาคเคลื่อนที่โดยใช้ column ชนิด ZORBAX Extend-C18 Rapid Resolution HD ขนาด 2.1×50 มิลลิเมตร ขนาดอนุภาค 1.8 ไมโครเมตร พบว่า resolution และ tailing factor ที่ได้จากระบบที่ 5 เท่ากับ 3.054 และ 1.130 ตามลำดับ resolution และ tailing factor ที่ได้จากระบบที่ 4 เท่ากับ 3.096 และ 1.070 ตามลำดับ ผลการเปรียบเทียบวัฏภาคเคลื่อนที่และวัฏภาคคงที่ ดังแสดงในภาพที่ 4

จากผลการศึกษากระบวนการวิเคราะห์ด้วย UHPLC พบว่าสภาวะที่เหมาะสมสำหรับการวิเคราะห์ 5,7-DMF ในสารสกัดน้ำกระชายดำ ดังแสดงในตารางที่ 5 การศึกษาชนิดของตัวทำละลาย ระยะเวลาการสกัด และวิธีการสกัด พบว่าใช้ methanol เป็นตัวทำละลายและสกัดตัวอย่างด้วยวิธี sonicate นาน 30 นาที เป็นวิธีที่เหมาะสม ผลการศึกษาเปรียบเทียบปัจจัยสำหรับการเตรียมสารละลายตัวอย่างสารสกัดน้ำกระชายดำ ดังแสดงในตารางที่ 6



ภาพที่ 3 การศึกษาความยาวคลื่นและ UV spectrum สำหรับวิเคราะห์ 5,7-DMF ในสารสกัดน้ำกระชายดำ (A) โครมาโตแกรมของ 5,7-DMF ที่ความยาวคลื่น 264 nm, (B) โครมาโตแกรมของ 5,7-DMF ที่ความยาวคลื่น 308 nm, (C) โครมาโตแกรมของสารสกัดน้ำกระชายดำที่ความยาวคลื่น 264 nm, (D) โครมาโตแกรมของสารสกัดน้ำกระชายดำที่ความยาวคลื่น 308 nm, (E) UV spectrum ของ 5,7-DMF ที่ความยาวคลื่น 264 และ 308 nm และ (F) UV spectrum ของสารสกัดน้ำกระชายดำ ที่ความยาวคลื่น 264 และ 308 nm



ภาพที่ 4 โครมาโตแกรมของสารสกัดน้ำกระชายดำ (A) วัฏภาคเคลื่อนที่ระบบที่ 1, (B) วัฏภาคเคลื่อนที่ระบบที่ 2, (C) วัฏภาคเคลื่อนที่ระบบที่ 3 และ (D) วัฏภาคเคลื่อนที่ระบบที่ 4

ตารางที่ 5 สภาวะที่เหมาะสมสำหรับการวิเคราะห์ 5,7-DMF ในสารสกัดน้ำกระชายดำด้วย UHPLC

วัฏภาคคงที่	ZORBAX Extend-C18 Rapid Resolution HD ขนาด 2.1×50 มิลลิเมตร ขนาดอนุภาค 1.8 ไมโครเมตร
อุณหภูมิคอลัมน์	30 องศาเซลเซียส
อัตราการไหล	0.4 มิลลิลิตรต่อนาที
วัฏภาคเคลื่อนที่	(A) 0.2% glacial acetic acid ในน้ำ และ (B) methanol โดยใช้ระบบ gradient ตามระบบที่ 4 (ตารางที่ 4)
ความยาวคลื่น	264 นาโนเมตร
เวลา	10 นาที
ปริมาตรการฉีด	4 ไมโครลิตร

จากผลการทดสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์ ปริมาณสาร 5,7-DMF ของสารสกัดน้ำกระชายดำ โดย ศึกษาปัจจัยต่างๆ ดังนี้

ความจำเพาะ (specificity)

chromatogram ของการวิเคราะห์ 5,7-DMF ใน สารละลายสารสกัดน้ำกระชายดำ พบว่าวิธีที่พัฒนาขึ้นนี้ มีความจำเพาะโดยไม่พบการปนเปื้อนของสารอื่น ดังแสดงในภาพที่ 5

ความเป็นเส้นตรง (linearity)

กราฟมาตรฐานระหว่างความเข้มข้นกับ peak area พบว่ามีความเป็นเส้นตรงในช่วงความเข้มข้น 0.06–0.36 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร เมื่อทำการวิเคราะห์ความเข้มข้น 3 ซ้ำ โดยค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ (r) เท่ากับ 0.9999 ค่าสัมประสิทธิ์การตัดสินใจ (R^2) เท่ากับ 0.9998 และ residual plot มีการกระจายตัวที่สมมูลของ y-residual ของความเข้มข้นแต่ละระดับรอบๆ ค่าศูนย์ ดังแสดงใน ภาพที่ 6

ความแม่นยำ (accuracy) และความเที่ยง (precision)

จากผลการวิเคราะห์สารสกัดน้ำกระชายดำ จำนวน 5 ตัวอย่าง (3 ซ้ำ) พบว่ามีปริมาณ 5,7-DMF เฉลี่ยเท่ากับ 0.0947, 0.1780, 0.1523, 0.1510 และ 0.1675 มิลลิกรัม

ต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ เมื่อวิเคราะห์สารสกัดน้ำกระชายดำที่มีปริมาณ 5,7-DMF น้อยที่สุด (sample blank) จำนวน 7 ซ้ำ พบว่ามีปริมาณ 5,7-DMF เฉลี่ยเท่ากับ 0.0976 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

ผลการทดสอบความแม่นยำและความเที่ยง ดังแสดง ในตารางที่ 7 ที่ความเข้มข้น 3 ระดับ พบว่าร้อยละของ การคืนกลับที่ความเข้มข้น 3 ระดับ มีค่าเท่ากับร้อยละ 105.12±1.49, 98.31±0.82 และ 99.07±0.52 ตามลำดับ

ความเที่ยงของการทดสอบ repeatability ที่ ความเข้มข้น 3 ระดับ มีค่า %RSD เท่ากับ 1.14, 1.11 และ 1.07 ตามลำดับ และ HORRAT เท่ากับ 0.70, 0.42 และ 0.40 ตามลำดับ

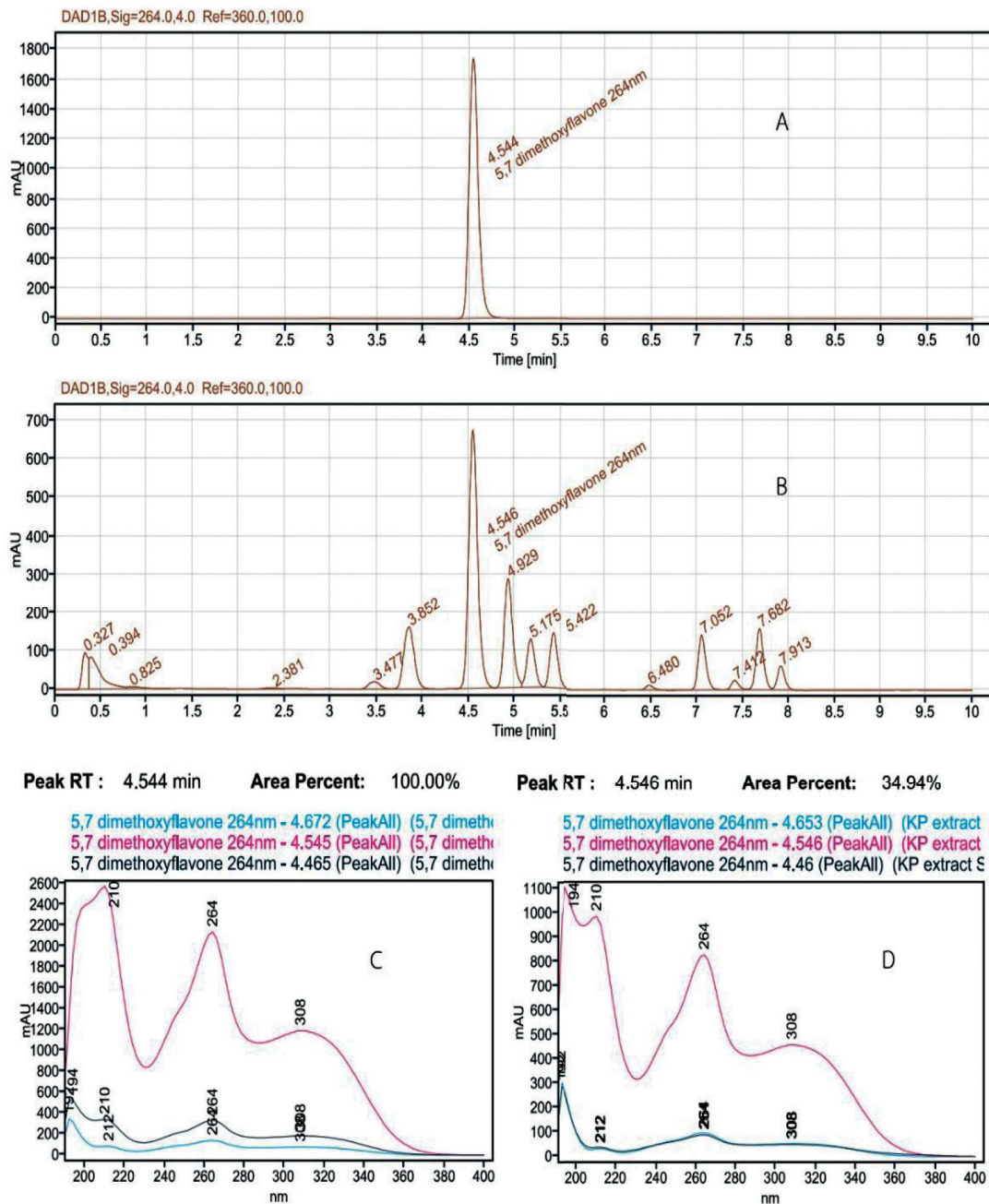
ความเที่ยงของการทดสอบ within laboratory reproducibility ที่ความเข้มข้น 3 ระดับ มีค่า %RSD เท่ากับ 3.80, 3.67 และ 3.55 ตามลำดับ และ HORRAT เท่ากับ 0.18, 0.89 และ 0.78 ตามลำดับ ดังแสดงใน ตารางที่ 7

ขีดจำกัดของการวัดเชิงปริมาณ (limit of quantitation, LOQ)

การทดสอบขีดจำกัดของการวัดเชิงปริมาณ พบว่า LOQ มีค่าเท่ากับ 0.04 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร โดย %recovery เท่ากับ 105.12 และ %RSD เท่ากับ 0.44

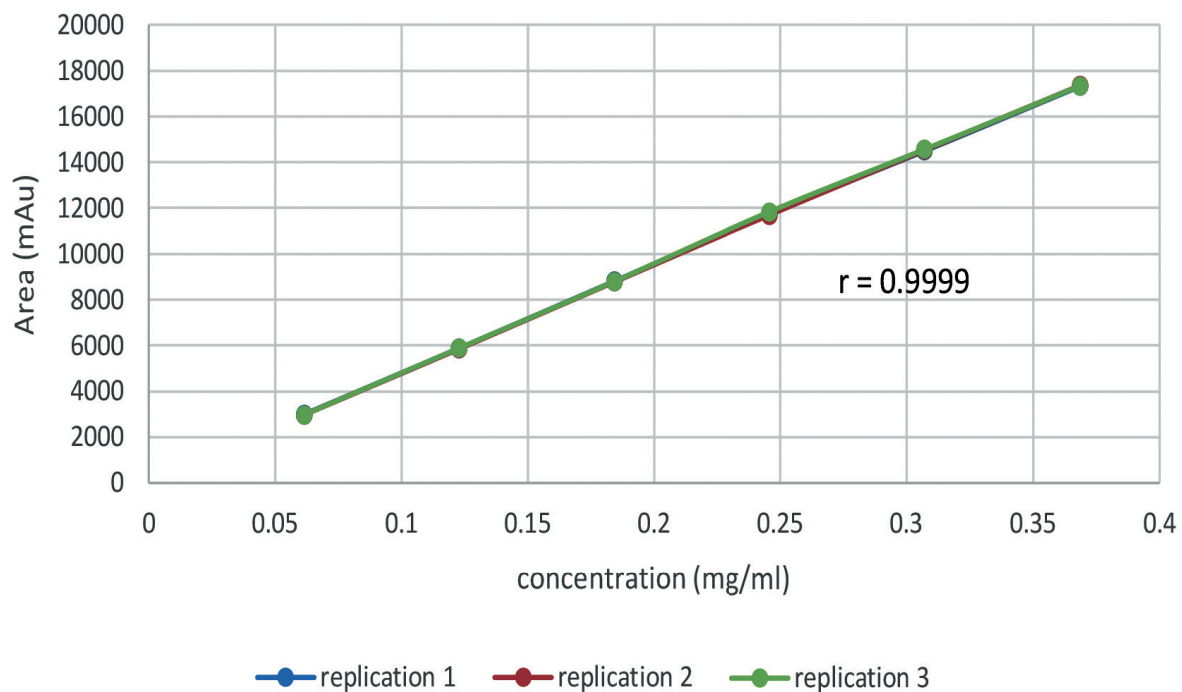
ตารางที่ 6 การศึกษาปัจจัยในการเตรียมสารละลายตัวอย่างสารสกัดน้ำกระชายดำสำหรับวิเคราะห์ปริมาณ 5,7-DMF

ปัจจัยที่ศึกษา	ตัวทำละลาย	ระยะเวลาสกัด (นาที)	วิธีการสกัด	ปริมาณ 5,7-DMF (%w/w)
ชนิดตัวทำละลาย	ethanol	30	reflux	1.3
(n = 1)	methanol	30	reflux	2.1
ระยะเวลา	methanol	30	reflux	2.1
(n = 1)	methanol	60	reflux	2.3
วิธีการสกัด	methanol	30	reflux	1.7
(n = 2)	methanol	30	sonicate	1.3



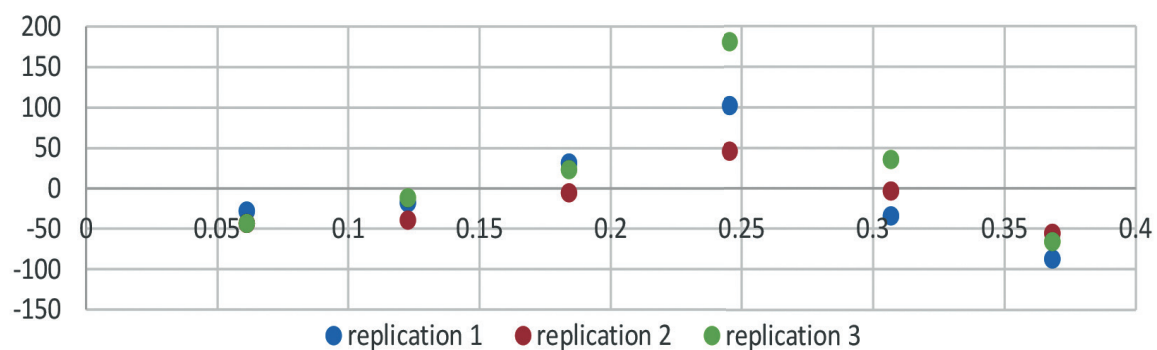
ภาพที่ 5 ผลการทดสอบความจำเพาะของวิธีวิเคราะห์ปริมาณ 5,7-DMF (A) โครมาโตแกรมของ 5,7-DMF, (B) โครมาโตแกรมของสารสกัดน้ำกระชายดำ, (C) UV spectrum ของ 5,7-DMF และ (D) UV spectrum ของสารสกัดน้ำกระชายดำ

Calibration curve of 5,7-dimethoxyflavone



(B)

Residual plot



ภาพที่ 6 กราฟมาตรฐานของ 5,7-DMF และ residual plot (A) calibration curve ของ 5,7-DMF ช่วงความเข้มข้น 0.06–0.36 mg/ml ($n = 3$) โดย $r = 0.9999$ และ (B) residual plot

ตารางที่ 7 ผลการทดสอบความใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์โดยแสดงความแม่นยำ (accuracy) และความเที่ยง (precision)

Sample blank (mg/ml)	Spike sample (mg/ml)	Accuracy (n = 6)	Precision (n = 7)			
		%Recovery ^a (mean±SD)	Repeatability within day ^b		Reproducibility within laboratory ^c	
			%RSD	HORRAT	%RSD	HORRAT
0.0976	0.14	105.12±1.49	1.14	0.70	3.80	0.18
	0.17	98.31±0.82	1.11	0.42	3.67	0.89
	0.21	99.07±0.52	1.07	0.40	3.55	0.78

เกณฑ์การยอมรับตาม AOAC guideline⁽¹⁵⁾^aAccuracy: %recovery = 95–105%^bPrecision: repeatability; %RSD < 2 and HORRAT = 0.5–2^cPrecision: within laboratory reproducibility; %RSD < 4 and HORRAT = 0.5–2

วิจารณ์

การวิเคราะห์ปริมาณสารสำคัญในสารสกัดสมุนไพรเป็นวิธีการที่ใช้ควบคุมคุณภาพของสารสกัดสมุนไพร จากการทบทวนวรรณกรรมพบว่า มีการศึกษาวิจัยด้านฤทธิ์ทางชีวภาพและพิษวิทยาของสารสกัดน้ำจากเหง้ากระชายดำ^(2, 5, 6, 9, 17) แต่ยังไม่มียูวิธีควบคุมคุณภาพทางเคมีด้วยวิธีการวิเคราะห์ปริมาณสารสำคัญ 5,7-DMF ในสารสกัดน้ำกระชายดำ ดังนั้นผู้วิจัยจึงได้พัฒนาวิธีวิเคราะห์ปริมาณ 5,7-DMF ในสารสกัดน้ำกระชายดำด้วย UHPLC และพบว่าการใช้ column ชนิด ZORBAX Extend-C18 Rapid Resolution HD ขนาด 2.1×50 มิลลิเมตร ขนาดอนุภาค 1.8 ไมโครเมตร เป็นวัฏภาคคงที่มีความเหมาะสมมากกว่าการใช้ column ชนิด ZORBAX Eclipse XDB-C18 Rapid Resolution HT ขนาด 2.1×100 มิลลิเมตร ขนาดอนุภาค 1.8 ไมโครเมตร เนื่องจากสามารถวิเคราะห์ได้ resolution ที่ดีกว่า และ การใช้สัดส่วนแบบ gradient ที่เหมาะสมของ 0.2% glacial acetic acid ในน้ำ และ methanol เป็นวัฏภาคเคลื่อนที่ สามารถวิเคราะห์องค์ประกอบของ 5,7-DMF ในกระชายดำได้รวดเร็วกว่าการศึกษาองค์ประกอบของ polymethoxyflavone ในสารสกัดกระชายดำ⁽⁵⁾ การศึกษา 12 methoxyflavones ในเหง้ากระชายดำ⁽¹⁷⁾

และการศึกษา polymethoxyflavone ในผลิตภัณฑ์กระชายดำ⁽¹⁸⁾ การเตรียมสารละลายสารสกัดน้ำกระชายดำสำหรับวิเคราะห์ปริมาณ 5,7-DMF เลือกใช้ methanol เป็นตัวทำละลาย เนื่องจากสามารถละลายสารมาตรฐาน 5,7-DMF ได้ดีกว่าและตรวจพบปริมาณ 5,7-DMF ได้มากกว่าการใช้ตัวทำละลาย ethanol ระยะเวลาการสกัด เพื่อเตรียมตัวอย่างที่ 30 และ 60 นาที ไม่แตกต่างกันอย่างชัดเจน จึงเลือกใช้ระยะเวลาในการสกัดที่ 30 นาที แม้ว่าการเตรียมตัวอย่างด้วยวิธี reflux จะสามารถตรวจพบปริมาณ 5,7-DMF แตกต่างกับวิธี sonicate แต่เลือกใช้วิธี sonicate เนื่องจากเป็นวิธีการที่ง่ายกว่าโดยใช้เวลาเท่ากัน การทดสอบความใช้ได้ของวิธีแสดงให้เห็นว่าวิธีนี้มีความจำเพาะเนื่องจากเมื่อวิเคราะห์ปริมาณ 5,7-DMF ในสารสกัดน้ำกระชายดำแล้วไม่พบการปนเปื้อนของสารอื่น โดยมีความเป็นเส้นตรงในช่วงความเข้มข้นตั้งแต่ 0.06–0.36 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ (r) เท่ากับ 0.9999 ค่าสัมประสิทธิ์การตัดสินใจ (R^2) เท่ากับ 0.9998 ขีดจำกัดการวัดเชิงปริมาณ (LOQ) ของ 5,7-DMF มีค่าเท่ากับ 0.04 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ค่า %recovery อยู่ในช่วง 95–105 โดยค่า precision พบว่า %RSD ของ repeatability มีค่าเท่ากับ 1.07–1.14 และ HORRAT < 2 ในขณะที่ %RSD ของ within

laboratory reproducibility มีค่าเท่ากับ 3.55–3.80 และ HORRAT < 2 ซึ่งผ่านเกณฑ์การยอมรับตาม AOAC guideline⁽¹⁵⁾ ดังนั้นวิธีนี้ จึงเป็นวิธีที่มีความแม่นยำและความเที่ยงที่เป็นไปตามเกณฑ์มาตรฐาน

สรุป

วิธีการตรวจวิเคราะห์ปริมาณ 5,7-DMF ในสารสกัดน้ำกระชายดำด้วย UHPLC ที่พัฒนาขึ้นนี้เป็นวิธีที่มีประสิทธิภาพ รวดเร็ว มีความเป็นเส้นตรง มีความแม่นยำ ความเที่ยง และมีความจำเพาะ สามารถนำไปใช้วิเคราะห์สารสกัดน้ำกระชายดำ ซึ่งเป็นประโยชน์ในการควบคุมคุณภาพของสารสกัดน้ำกระชายดำที่มีการจำหน่ายในเชิงพาณิชย์ต่อไป

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณการสนับสนุนงบประมาณการวิจัยจากสำนักงานคณะกรรมการส่งเสริมวิทยาศาสตร์วิจัยและนวัตกรรม (สกสว.) และกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ที่สนับสนุนครุภัณฑ์สำหรับการวิจัย ตลอดจนเจ้าหน้าที่ศูนย์ตรวจสอบและรับรองคุณภาพสมุนไพร สถาบันวิจัยสมุนไพรทุกท่านที่ให้ความช่วยเหลือในการทำงานวิจัยเป็นอย่างดี

เอกสารอ้างอิง

1. เต็ม สมิตินันท์, ราชนย์ ภูมา, สมราน สุดดี, บรรณาธิการ. ชื่อพรรณไม้แห่งประเทศไทย ฉบับแก้ไขเพิ่มเติม พ.ศ. 2557. กรุงเทพฯ: สำนักงานหอพรรณไม้ สำนักวิจัยการอนุรักษ์ป่าไม้และพันธุ์พืช กรมอุทยานแห่งชาติ สัตว์ป่า และพันธุ์พืช, 2557.
2. สถาบันวิจัยสมุนไพร กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์. สมุนไพรน่ารู้ (4) กระชายดำ. กรุงเทพฯ: โรงพิมพ์สำนักงานพระพุทธศาสนาแห่งชาติ; 2552.
3. Muhamad N, Muhmed SA, Yusoff MM, Gimibun J. Influence of solvent polarity and conditions on extraction of antioxidant, flavonoids and phenolic content from *Averrhoa bilimbi*. J Food Sci Eng 2014; 4: 255–60.
4. Pitakpawasutthi Y, Palanuvej C, Ruangrungsri N. Quality evaluation of *Kaempferia parviflora* rhizome with reference to 5,7-dimethoxyflavone. J Adv Pharm Technol Res 2018; 9(1): 26–31.
5. Wongsrikaew N, Kim H, Vichitphan K, Cho SK, Han J. Antiproliferative activity and polymethoxyflavone composition analysis of *Kaempferia parviflora* extracts. J Korean Soc Appl Biol Chem 2012; 55(6): 813–7.
6. Sae-wong C. Anti-inflammatory activity of *Kaempferia parviflora* Rhizomes [Thesis]. Doctoral dissertation, Philosophy in Pharmaceutical Science. Songkla: Prince of Songkla University; 2011.
7. Malakul W, Ingkaninan K, Sawasdee P, Woodman OL. The ethanolic extract of *Kaempferia parviflora* reduces ischaemic injury in rat isolated hearts. J Ethnopharmacol 2011; 137(1): 184–91.
8. Nemidkanam V, Kato Y, Kubota T, Chai-phanawongsaroj N. Ethyl acetate extract of *Kaempferia parviflora* inhibits Helicobacter pylori-associated mammalian cell inflammation by regulating proinflammatory cytokine expression and leukocyte chemotaxis. BMC Complement Med Ther 2020; 20: 124. (10 pages).
9. Sookkongwaree K, Geitmann M, Roengsumran S, Petsom A, Danielson UH. Inhibition of viral proteases by Zingiberaceae extracts and flavones isolated from *Kaempferia parviflora*. Pharmazie 2006; 61(8): 717–21.
10. กระทรวงสาธารณสุข และองค์การภาครัฐ-เอกชน. แผนแม่บทแห่งชาติ ว่าด้วยการพัฒนาสมุนไพรไทย ฉบับที่ 1 พ.ศ. 2560–2564. นนทบุรี: กรมพัฒนาการแพทย์แผนไทยและการแพทย์ทางเลือก กระทรวงสาธารณสุข; 2559.

11. กรมการแพทย์แผนไทยและการแพทย์ทางเลือก, องค์การภาครัฐ-เอกชน. การประชุมวิชาการสมุนไพรแห่งชาติ ครั้งที่ 2. กรุงเทพฯ: พุ่มทอง; 2562.
12. กรมส่งเสริมการค้าระหว่างประเทศ. Factsheet สมุนไพรประจำเดือนพฤษภาคม 2564. [ออนไลน์]. 2564; [สืบค้น 8 มี.ค. 2565]; [2 หน้า]. เข้าถึงได้ที่: URL: https://www.ditp.go.th/ditp_web61/article_sub_view.php?filename=contents_attach/739096/739096.pdf&title=739096&cate=1143&d=0.
13. งานแผนกลยุทธ์การตลาด ฝ่ายธุรกิจนวัตกรรมและถ่ายทอดเทคโนโลยี ศูนย์นาโนเทคโนโลยีแห่งชาติ. โครงการศึกษาโอกาสทางการตลาดสมุนไพรไทยเป้าหมาย. ปทุมธานี: สำนักงานพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งชาติ; 2561.
14. Behnouth B, Sheikhezadi A, Bazmi E, Fattahi A, Sheikhezadi E, Saberi Anary SH. Comparison of UHPLC and HPLC in benzo-diazepines analysis of postmortem samples: a case-control study. *Medicine* 2015; 94(14): 1-7.
15. AOAC guidelines for single laboratory validation of chemical methods for dietary supplements and botanicals. [online]. 2002; [cited 2020 Nov 30]; [38 screens]. Available from: URL: <https://www.farmaciaci.ufmg.br/wp-content/uploads/2015/06/AOAC-Guidelines-for-Single-Laboratory.pdf>.
16. ทิพวรรณ นิงน้อย. แนวปฏิบัติการทดสอบความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์ทางเคมีโดยห้องปฏิบัติการเดียว. นนทบุรี: กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข; 2549.
17. Ninomiya K, Matsumoto T, Chaipetch S, Miyake S, Katsuyama Y, Tsuboyama A, et al. Simultaneous quantitative analysis of 12 methoxyflavones with melanogenesis inhibitory activity from the rhizomes of *Kaempferia parviflora*. *J Nat Med* 2016; 70: 179-89.
18. Burapan S, Kim M, Han J. PMFs analysis Krachaidum products by HPLC and GC. *J Appl Biol Chem* 2014; 57(3): 211-8.

Method Development and Validation of 5,7-Dimethoxyflavone Content of Black Ginger Rhizome Aqueous Extract Using Ultra High Performance Liquid Chromatography

Sununta Srisopon, Somchit Niumsukul, Nawarat Chadchen, Sakwichai Ontong, Tissanin Supachaiyakit, Somchai Sanlaung-in, and Siriwan Chaisomboonpan

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

ABSTRACT Black ginger rhizomes (*Kaempferia parviflora* Wall. ex Baker) are used for tonic, erectile dysfunction aid, blood circulation system improvement, and antispasmodic in Thai traditional medicine. The major constituent, 5,7-dimethoxyflavone (5,7-DMF), was reported as antioxidant, anti-inflammation and anti-cancer. Until now, the quantitative determination of black ginger rhizomes aqueous extract has not been specified. The objective of this study was to develop and validate method to analyze the content of 5,7-DMF in the extract using ultra high performance liquid chromatography (UHPLC), detected at 264 nm. The stationary phase was ZORBAX Extend-C18 Rapid Resolution HD (2.1×50 mm, 1.8 μm). The mobile phase was the mixture of 0.2% glacial acetic acid in water and methanol as a gradient system. The sample was prepared by sonication with methanol for 30 minutes. As a result, this method was specific. The linearity was shown between 0.06–0.36 mg/ml with $r > 0.999$. The %recovery was 98.31–105.12. The precision repeatability within day and reproducibility within laboratory, were acceptable with %RSD < 2 and %RSD < 4 (HORRAT < 2), respectively. The limit of quantitation (LOQ) was equal to 0.04 mg/ml. Therefore, the method can be used for determination of 5,7-DMF content for the quality control of black ginger rhizomes aqueous extracts which are commercially available.

Keywords: Method development, Method validation, 5,7-dimethoxyflavone, Black ginger rhizomes aqueous extract, UHPLC