

XÂY DỰNG PHƯƠNG PHÁP XÁC ĐỊNH HÀM LƯỢNG CURCUMIN TRONG THỰC PHẨM BẢO VỆ SỨC KHỎE BẰNG SẮC KÝ LỎNG HIỆU NĂNG CAO

Nguyễn Văn Sỹ¹, Lê Hồng Dũng², Lê Danh Tuyên³

Mục tiêu: Phát triển phương pháp xác định hàm lượng curcumin trong thực phẩm bảo vệ sức khỏe bằng sắc ký lỏng hiệu năng cao với detector màng diod. **Phương pháp:** Curcumin được chiết ra khỏi nền mẫu bằng cách siêu âm trong methanol trong 30 phút và được tách bằng cách sử dụng cột sắc ký pha đảo C18 với pha động gồm đệm, methanol và acetonitril. Tốc độ dòng là 1mL/phút, bước sóng của detector được cài đặt 426 nm. **Kết quả:** Khoảng tuyến tính của phương pháp từ 0,02 đến 5,0 µg/ml với hệ số tương quan ($R^2 = 0,9999$). Giới hạn phát hiện và giới hạn định lượng tương ứng trong khoảng từ 0,26-0,37µg/g hoặc µg/ml và 0,88-1,22 µg/g hoặc µg/ml. Phương pháp có độ đúng nằm trong khoảng từ 75-95,0%, với hệ số biến thiên (RSD%) từ 0,4 – 8,4%. **Kết luận:** Các thông số thẩm định của phương pháp đạt yêu cầu theo AOAC. Đây là phương pháp đơn giản, đáng tin cậy và có thể sử dụng để nghiên cứu và kiểm soát hàm lượng curcumin trong thực phẩm bảo vệ sức khỏe.

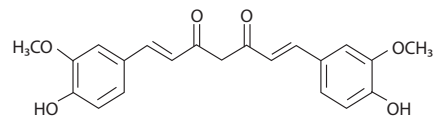
Từ khóa: Curcumin, thực phẩm bảo vệ sức khỏe, sắc ký lỏng hiệu năng cao.

I. ĐẶT VẤN ĐỀ

Curcumin là hợp chất chính của nhóm curcuminoid được chiết xuất từ củ Nghệ (*Curcuma longa*) [1]. Hàm lượng curcuminoid trong củ nghệ từ 2 - 6% trong đó 80% là curcumin [2]. Curcumin có khả năng hòa tan tốt trong các dung môi như methanol, aceton, ethanol nhưng gần như không tan trong nước ở môi trường axit và trung tính. Công thức cấu tạo của curcumin thể hiện ở hình 1 [3].

Trên thế giới và Việt Nam đã có một số công bố về phương pháp phân tích curcumin thực hiện chủ yếu trên nền mẫu thực phẩm và dược phẩm. Các phương pháp được sử dụng phổ biến như phương

pháp quang phổ hấp thụ phân tử (UV-VIS) [4], phương pháp sắc ký lớp mỏng (TLC) [5], và sắc ký lỏng hiệu năng cao (HPLC) [6, 7], trong đó HPLC là kỹ thuật được sử dụng nhiều nhất để phân tích curcumin nhờ độ đặc hiệu và độ chính xác cao.



Hình 1: Công thức cấu tạo của curcumin

Thực phẩm bảo vệ sức khỏe (TP BVSK) được sản xuất từ nghệ ngày càng đa dạng và phong phú dưới nhiều dạng

¹TS – Viện Dinh dưỡng

Email: nguyenvansy@dinhduong.org.vn

²Th.S – Viện Dinh dưỡng

³GS.TS – Viện Dinh dưỡng

Ngày gửi bài: 01/06/2021

Ngày phản biện đánh giá: 15/06/2021

Ngày đăng bài: 15/07/2021

khác nhau như dạng bột, viên nang cứng, dạng lỏng và curcumin là hợp chất có tính sinh học chính quyết định đến chất lượng và giá cả của các sản phẩm này. Nhiều nghiên cứu lâm sàng đã chứng minh có hiệu quả khi sử dụng curcumin trong việc hỗ trợ và điều trị một số bệnh liên quan đến dạ dày, đại tràng, vàng da, gan, ung thư... [8, 9]. Do vậy việc phát triển kỹ thuật xác định curcumin trong các loại TP BVSK là rất cần thiết, không những hỗ trợ doanh nghiệp trong việc nghiên cứu và công bố chất lượng của sản phẩm mà còn là công cụ giúp cho các nhà quản lý kiểm soát tốt chất lượng của các sản phẩm này nhằm bảo vệ sức khỏe người tiêu dùng.

II. ĐỐI TƯỢNG VÀ PHƯƠNG PHÁP

2.1. Đối tượng nghiên cứu

Nguyên liệu là các loại thực phẩm bảo vệ sức khỏe dạng rắn, dạng lỏng và dạng dầu.

2.2. Hóa chất và thiết bị

2.2.1. Hóa chất

- Chất chuẩn: Chuẩn curcumin có độ tinh khiết 99,56% được mua tại Viện Kiểm nghiệm thuốc Trung ương.

- Các hóa chất methanol, acetonitril, kali hydro photphat sử dụng loại tinh khiết phân tích.

- Pha dung dịch chuẩn gốc có nồng độ 1000 µg/mL: cân chính xác khoảng 10 mg chuẩn curcumin trên cân phân tích có độ chính xác 0,0001g vào bình định mức 10 mL, hòa tan và định mức vừa đủ tới vạch bằng methanol. Bảo quản ở nhiệt độ -20°C trong vòng 6 tháng.

- Dung dịch chuẩn trung gian có nồng độ 100 µg/mL: hút 1ml dung dịch chuẩn

gốc vào bình định mức 10 ml và định mức tới vạch bằng methanol.

- Dung dịch chuẩn làm việc có nồng độ 0,01; 0,02; 0,5; 0,1; 0,2; 0,5; 1; 2; 5 µg/mL được pha loãng từ dung dịch chuẩn trung gian trong methanol.

2.2.2. Thiết bị, dụng cụ

- Máy HPLC Alliance 2960 với detector PDA của hãng Waters, Mỹ.

- Cân phân tích ME 204T/00 của hãng Mettler Toledo, máy siêu âm S120H của hãng Elma, máy lắc vortex VM-10 của hãng Daihan, máy siêu âm 3R của hãng Hettich.

- Các loại dụng cụ thông thường khác của phòng thí nghiệm như: bình định mức, pipet tự động, ống ly tâm 50 ml...

2.3. Phương pháp nghiên cứu

2.3.1. Quy trình xử lý mẫu

Quy trình xử lý mẫu được tham khảo theo AOAC 2016.16 [10] như sau: Mẫu được đồng nhất kỹ trước khi phân tích. Cân chính xác khoảng 0,1 – 0,5 g mẫu (dạng rắn, dạng dầu) hoặc hút 0,5 ml mẫu (dạng lỏng) vào ống ly tâm 50 ml. Sau đó thêm khoảng 30 ml methanol, tiến hành lắc xoáy 1 phút, siêu âm 30 phút. Sau đó ly tâm với tốc độ 5000 vòng/phút trong 10 phút. Chuyển toàn bộ dịch chiết vào bình định mức 50 ml và định mức tới vạch bằng methanol. Dịch chiết được lắc đều và lọc qua màng 0,45 µm vào lọ đựng mẫu rồi bơm vào hệ thống HPLC.

2.3.2. Điều kiện sắc ký

- Cột HC C18 (4,6 x 100 mm, 5 µm) và tiền cột. Nhiệt độ buồng cột: 35°C.

- **Pha động:** K₂HPO₄ 0,014M_pH 6.7/MeOH/MeCN với tỉ lệ tương ứng là 50/5/45.

- Detector: PDA ở bước sóng 426 nm.
- Tốc độ dòng: 1 ml/phút.
- Thể tích tiêm: 10 μ l.

2.4. Thẩm định phương pháp

Các thông số thẩm định thực hiện theo hướng dẫn của AOAC 2016 [11] bao gồm:

- **Độ đặc hiệu:** Nghiên cứu của chúng tôi sử dụng detector PDA do vậy độ đặc hiệu được xác định bằng cách so sánh phổ và thời gian lưu của dung dịch chuẩn với mẫu thử có chứa curcumin.

- **Khoảng tuyến tính:** Chuẩn bị 8 nồng độ chuẩn khác nhau từ 0,02 đến 5 μ g/mL. Tiến hành bơm vào hệ thống HPLC để xác định tín hiệu đo của chất phân tích. Xây dựng mối quan hệ phụ thuộc giữa tín hiệu đo và nồng độ của chất phân.

- **Giới hạn phát hiện (LOD) và giới hạn định lượng (LOQ):** Chuẩn bị 7 mẫu trắng đã xác định không có curcumin và thêm chuẩn ở nồng độ thấp. Mẫu được xử lý theo quy trình và bơm vào hệ thống HPLC. LOD và LOQ

được xác định theo công thức: $LOD = 3 \times SD$ và $LOQ = 10 \times SD$ trong đó SD là độ lệch chuẩn của 7 mẫu trắng.

- **Độ chụm:** Thể hiện qua việc đánh giá độ lặp lại và độ tái lập nội bộ thực hiện ở 3 mức nồng độ thấp, trung bình và cao (mỗi mức thực hiện lặp lại 7 lần). Tính độ lặp lại RSD% của phép đo với các khoảng nồng độ trên.

- **Độ đúng:** Thể hiện qua việc đánh giá độ thu hồi và được thực hiện ở 3 mức nồng độ thấp, trung bình và cao (mỗi mức thực hiện lặp lại 7 lần). Xác định % giữa hàm lượng curcumin trong mẫu thêm chuẩn theo thực nghiệm và nồng độ chuẩn thêm vào theo lý thuyết.

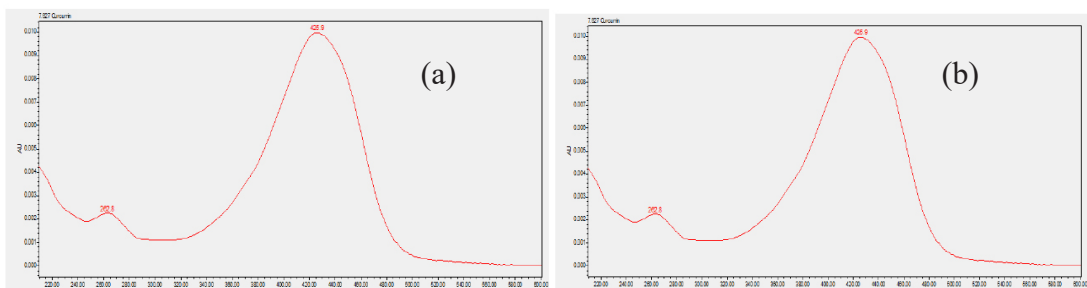
2.6. Xử lý và đánh giá số liệu

Sử dụng phần mềm đi kèm theo thiết bị HPLC để thu được các sắc ký đồ, diện tích pic, thời gian lưu. Sử dụng phần mềm Excel để xây dựng khoảng tuyến tính, tính tỉ lệ thu hồi, độ lệch chuẩn. Kết quả các thông số thẩm định phương pháp được đánh giá dựa theo tiêu chuẩn AOAC 2016 [11].

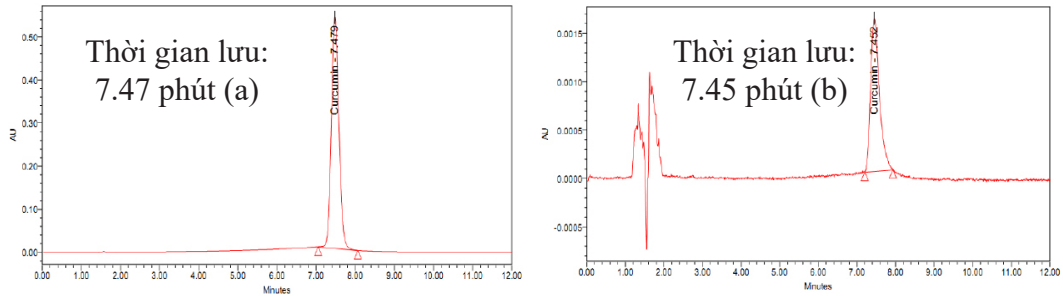
III. KẾT QUẢ VÀ BÀN LUẬN

3.1. Độ đặc hiệu

Kết quả phân tích ở Hình 2 cho thấy dung dịch chuẩn curcumin và mẫu TP BVSK có chứa curcumin đều có đỉnh 245.9 và hình thái phổ tương tự nhau. Bên cạnh đó thời gian lưu của dung dịch chuẩn và mẫu thử tương tự nhau (Hình 3) do vậy phương pháp có độ đặc hiệu tốt.



Hình 2: Phổ PDA của dung dịch chuẩn curcumin (a) và TP BVSK có chứa curcumin (b)

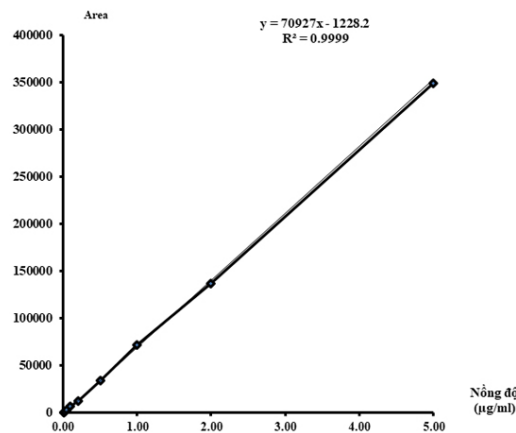


Hình 3: Sắc ký đồ của dung dịch chuẩn curcumin 20 µg/ml (a) và TP BSK có chứa curcumin (b)

3.2. Khoảng tuyến tính.

Khoảng tuyến tính của curcumin từ 0,02 - 5,0 µg/mL với hệ số tương quan $R^2 = 0,9999$ chứng tỏ rằng tín hiệu đo có tỉ lệ tốt với nồng độ của chất phân tích

(Hình 4). Bên cạnh đó độ chệch tại các điểm nồng độ của đường chuẩn đều nhỏ hơn 15%, đạt yêu cầu của AOAC [11]. Kết quả của nghiên cứu này cũng tương tự như nghiên cứu của Reolon (2018) [7].



Hình 4: Đồ thị khoảng tuyến tính của curcumin (0,02 – 5,0 µg/ml)

3.3. Giới hạn phát hiện (LOD) và giới hạn định lượng (LOQ) của phương pháp.

Kết quả ở Bảng 1 cho thấy, đối với nền mẫu dạng rắn, lỏng, dầu giá trị LOD tương ứng là 0,37µg/g; 0,34 µg/ml và 0,26 µg/g và LOQ là 1,22 µg/g; 1,13 µg/ml và 0,88 µg/g. Một số nghiên cứu trước xác định LOD, LOQ dựa vào tỷ lệ tín hiệu pic của chất phân tích so với

hiều đường nền (S/N) [6] [7], cách này chỉ được áp dụng đối với các quy trình phân tích sử dụng các công cụ có nhiều đường nền và không xác định được giá trị R để đánh giá độ tin cậy của LOD. Nghiên cứu của chúng tôi sử dụng cách tính LOD, LOQ dựa vào độ lệch chuẩn của 7 mẫu trắng có thêm chuẩn và giá trị R nằm trong khoảng từ 4 đến 10 chứng tỏ nồng độ dung dịch trong mẫu thử là phù hợp và LOD được tính là đáng tin cậy [11].

Bảng 1. Giới hạn phát hiện (LOD), giới hạn định lượng (LOQ) của phương pháp

Nền mẫu	Hàm lượng curcumin (n=7) ($\mu\text{g/g}$, $\mu\text{g/ml}$)	SD	R	LOD ($\mu\text{g/g}$, $\mu\text{g/ml}$)	LOQ ($\mu\text{g/g}$, $\mu\text{g/ml}$)
TP BVSK dạng rắn	2,08	0,12	5,7	0,37	1,22
TP BVSK dạng lỏng	1,87	0,11	5,5	0,34	1,13
TP BVSK dạng dầu	1,91	0,09	7,2	0,26	0,88

3.4. Độ chụm của phương pháp

Kết quả ở Bảng 2 cho thấy, độ lặp lại của các nền mẫu ở 3 mức nồng độ 5; 50; 500 $\mu\text{g/g}$ có giá trị RSD nằm trong khoảng từ 0,4 đến 5,3%, trong khi đó giá

trị RSD của độ tái lập nội bộ nằm trong khoảng từ 1,0-8,4%. Đối chiếu với quy định của AOAC thì kết quả nghiên cứu của chúng tôi nằm trong giới hạn cho phép [11].

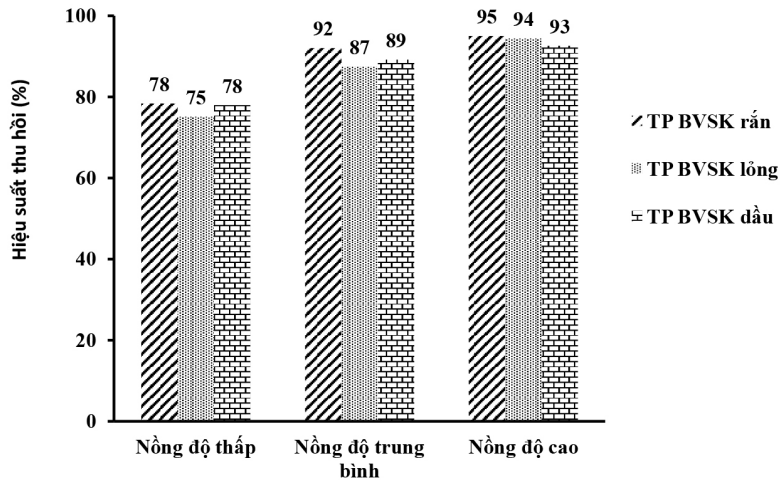
Bảng 2. Độ chụm của phương pháp

Nền mẫu	Độ chụm	
	Độ lặp lại RSD_r (%)	Độ tái lập RSD_R (%)
TP BVSK dạng rắn (n=7)		
Tại nồng độ thấp (5 $\mu\text{g/g}$)	5,3	5,3
Tại nồng độ trung bình (50 $\mu\text{g/g}$)	1,8	1,0
Tại nồng độ cao (500 $\mu\text{g/g}$)	1,1	1,6
TP BVSK dạng lỏng (n=7)		
Tại nồng độ thấp (5 $\mu\text{g/ml}$)	4,5	8,4
Tại nồng độ trung bình (50 $\mu\text{g/ml}$)	1,2	1,6
Tại nồng độ cao (500 $\mu\text{g/ml}$)	0,4	1,4
TP BVSK dạng dầu (n=7)		
Tại nồng độ thấp (5 $\mu\text{g/g}$)	3,8	4,2
Tại nồng độ trung bình (50 $\mu\text{g/g}$)	1,5	2,1
Tại nồng độ cao (500 $\mu\text{g/g}$)	1,3	1,6

RSD_r: thực hiện cùng 1 kiểm nghiệm viên; *RSD_R*: thực hiện bởi 2 kiểm nghiệm viên khác nhau trong cùng điều kiện thí nghiệm

3.5. Độ đúng của phương pháp

Kết quả ở Hình 5 cho thấy, độ đúng của phương pháp thể hiện bằng độ thu hồi ở 3 mức nồng độ khác nhau nằm trong khoảng từ 75 đến 95%. Đối chiếu với quy định của AOAC thì kết quả nghiên cứu của chúng tôi nằm trong giới hạn cho phép [11].



Hình 5. Độ đúng của phương pháp ở 3 mức nồng độ khác nhau

IV. KẾT LUẬN

Phương pháp xác định curcumin trong TP BVSK bằng sắc ký lỏng cao áp với detector PDA đã được thẩm định đầy đủ các thông số gồm độ đặc hiệu, giới hạn phát hiện, giới hạn định lượng, độ chụm, độ đúng. Kết quả thẩm định cho thấy phương pháp có độ nhạy tốt và đạt yêu cầu theo quy định của AOAC. Phương pháp đơn giản, dễ thực hiện có thể triển khai rộng rãi tại các phòng thí nghiệm ở Việt Nam có thiết bị HPLC.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Chattopadhyay I, Biswas K, Bandyopadhyay U, Banerjee RK (2004). *Turmeric and curcumin. Biological actions and medicinal applications.* Current science 87(1) 44.
2. Sasaki J, Kichida M (2012). *Curcumin: Biosynthesis, Medicinal uses and health benefits.* Nova Science.
3. Dulbecco P, Savarino V (2013). *Therapeutic potential of curcumin in digestive diseases.* World journal of gastroenterology 19(48) 9256.
4. Kalyan Hazra, Ravi Kumar, Biresh Kumar Sarkar, Y. Ankamma Chowdary, Manish Devgan and Maddi Ramaiah (2015). *UV-VISIBLE spectrophotometric estimation of curcumin in nanoformulation.* International Journal of Pharmacognosy 2(3) 127-130.
5. Dewi Setyaningsih, Yosi Bayu Murti, Achmad Fudholi, Woute L.J. Hinrich, Rochmat Mudjahi, Sudibyo Martono, Triana Hertiani (2016). *Validated TLC Method for Determination of Curcumin Concentrations in Dissolution*

- Samples Containing Curcuma longa Extract.* Journal Ilmu Kefarmasian Indonesia 14(2) 147-157.
6. Radha A, P. Ragavendran, Alex Thomas, D. Suresh Kumar. (2016). *A Cost Effective HPLC Method For The Aanalysis of Curcuminoids.* Hygeia Journal for Drugs and Medicines 8(1) 1-15 (2016).
 7. Jéssica Brandão Reolon, Maicon Brustolin, Sandra Elisa Haas, Eduardo André Bender, Marcelo Donadel Malesuik, Leticia Marques Colomé (2018). *Development and validation of high-performance liquid chromatography method for simultaneous determination of acyclovir and curcumin in polymeric microparticles.* Journal of Applied Pharmaceutical Science 8(01) 136-141
 8. Maheshwari RK, Singh AK, Gaddipati J, Srimal RC (2006). *Multiple biological activities of curcumin.* A short review. Life sciences 78(18) 2081.
 9. Subash C. Gupta, Sridevi Patchva, and Bharat B. Aggarwal (2013). *Therapeutic Roles of Curcumin: Lessons Learned from Clinical Trials.* Review article. The Americal Association of Pharmaceutical Scientists 15(1) 195-218.
 10. AOAC Official Method (2016). *Determination of Curcuminoids Turmeric Liquid Chromatography with UV-Vis Detection.* First Action 2016.
 11. AOAC Official Method Analysis (2016). *Appendix F. Guidelines for Standard Method Performance Requirements.* Appendix F, p.2.

Summary

DEVELOPMENT OF METHOD FOR DETERMINATION OF CURCUMIN IN HEALTH SUPPLEMENT BY HIGH PERFORMANCE LIQUID CHROMATOGRAPHY

Objective: To develop a method to detect curcumin concentration in health supplement by high performance liquid chromatography with a photodiode array detector. **Method:** Curcumin was extracted by sonication in methanol for 30 min and separated by a reversed phase C18 column using a mobile phase including buffer, methanol and acetonitrile. The flow rate was set to 1.0 ml.min⁻¹ and the PDA detector was performed at 426 nm. **Result:** The validated method proved to be linear in the range of 0.02 to 5.0 µg.ml⁻¹ with R² was 0.9999. Detection and quantification limits were 0.26-0.37 µg.g⁻¹ or µg.ml⁻¹ and 0.88-1.22 µg.g⁻¹ or µg.ml⁻¹, respectively. The accuracy of curcumin was within the range of 75-95%, with the relative standard deviation (RSD%) of 0.4-8.4%. **Conclusion:** The validated parameters have met the requirement of Association of Official Agricultural Chemists (AOAC). This reliable method would be useful for the study and quality control of curcumin in health supplement.

Keywords: *Curcumin, health supplement, high performance liquid chromatography.*