

SIMULTANEOUS DETERMINATION OF THREE CURCUMINOIDS IN TURMERIC RESIDUE

PHUNG CHAT^{1,✉}, NGUYEN THI NGOC HIEN¹, HO VUONG THI THANH XUAN¹

¹Faculty of Pharmacy, Dong A University

✉Corresponding author: chatp@donga.edu.vn

Received August 09th, 2023

Accepted October 05th, 2023

Abstract: The bisdemethoxycurcumin (BDMC), demethoxycurcumin (DMC) and curcumin are main components of curcuminoid, already well known for their biological activities. In Vietnam, turmeric residues, side product in manufacturing turmeric starch and turmeric oil, still contain important amounts of curcuminoids but rarely exploited to fully making use of their usefulness. In this study, an HPLC method was developed for simultaneously assay of these three compounds in turmeric residue in order to evaluate remaining amount of curcuminoids for further employment. The analytes were completely separated on a column C18 (250 x 4.6 mm, 5 μ m) using a mixture of 0.1% solution of phosphoric acid and acetonitril (55 : 45, v/v) as mobile phase with the flow rate maintained at 1.5 ml/min, and UV detection at 425 nm. The method met the requirements of AOAC international guideline for performance of analytical method in term of specificity, linearity, precision, repeatability, and accuracy. The method was applied to determine curcuminoid content in five turmeric residue samples, finding the total amount of three analytes in these samples varying from 12.5 % to 14.5 % (w/w).

Keywords: Bisdemethoxycurcumin, demethoxycurcumin, curcumin, curcuminoids, turmeric residue

XÂY DỰNG PHƯƠNG PHÁP ĐỊNH LƯỢNG ĐỒNG THỜI BA CURCUMINOID TRONG BÃ NGHỆ

PHÙNG CHÁT^{1,✉}, NGUYỄN THỊ NGỌC HIỀN, HỒ VƯƠNG THỊ THANH XUÂN

¹Khoa Dược, Trường Đại học Đông Á

✉Tác giả liên hệ: chatp@donga.edu.vn

Nhận bài ngày 09 tháng 8 năm 2023

Chấp nhận đăng ngày 05 tháng 10 năm 2023

Tóm tắt: Bisdemethoxycurcumin (BDMC), demethoxycurcumin (DMC) và curcumin là các thành phần chính của curcuminoid, đã được chứng minh là có nhiều hoạt tính sinh học quan trọng. Ở Việt Nam, bã nghệ, một sản phẩm phụ sau khi sản xuất tinh bột nghệ và dầu nghệ, vẫn còn chứa một lượng lớn curcuminoid nhưng rất ít khi được khai thác để sử dụng. Trong nghiên cứu này, một phương pháp HPLC đã được phát triển để định lượng đồng thời ba thành phần chính trên trong bã nghệ nhằm đánh giá hàm lượng curcuminoid còn lại của bã nghệ để định hướng tiếp tục khai thác. Các chất nghiên cứu đã được phân tách riêng biệt trên hệ HPLC gồm cột C18 (250 x 4,6 mm, 5 μ m), rửa giải bằng hệ pha động là hỗn hợp của dung dịch acid phosphoric 0,1% và acetonitril (55 : 45) với tốc độ dòng duy trì ở 1,5 ml/min, và detector DAD đặt ở 425 nm. Phương pháp đã được thẩm định đáp ứng các yêu cầu về hiệu năng theo hướng dẫn của AOAC về các tiêu chí độ đặc hiệu, độ tuyến tính, độ đúng, độ lặp lại và độ chính xác trung gian. Áp dụng phương pháp trên, hàm lượng curcuminoid trong 05 mẫu bã nghệ nghiên cứu đã được xác định dao động từ 12,5 % đến 14,5 % (kl/kl).

Từ khóa: Bisdemethoxycurcumin, demethoxycurcumin, curcumin, curcuminoid, bã nghệ

1. ĐẶT VẤN ĐỀ

Trong y học cổ truyền, Nghệ vàng (*Curcuma longa* L.) với công năng hành khí, phá huyết, chỉ thống, sinh cơ, được nhân dân ta sử dụng độc lập hoặc kết hợp để điều trị một số bệnh điển hình như bổ máu, điều kinh, viêm loét dạ dày, liền sẹo, làm lành vết thương [1, 2]. Gần đây, các tác dụng của nghệ được chứng minh liên quan trực tiếp đến thành phần hóa học chính của dược liệu này là các curcuminoid. Trên các mô hình *in vitro*, các curcuminoids được chứng minh có nhiều hoạt tính sinh học quan trọng, nổi bật nhất là chống oxy hóa [3], chống viêm [4, 5], kháng khuẩn [6], kháng một số dòng tế bào ung thư...[7]. Trên mô hình *in vivo*, các hợp chất này có tác dụng làm hạ đường huyết [8], bảo vệ tế bào gan [9] và chống viêm loét dạ dày [10]. Từ những hoạt tính quan trọng trên, các curcuminoid đã được nghiên cứu tinh chế và dùng thay thế cho các chế phẩm nghệ trước đây dưới dạng bào chế tiện dụng, hiệu quả điều trị cao hơn.

Bên cạnh việc sử dụng Nghệ vàng để chiết xuất curcuminoid cho nhiều ứng dụng hữu ích trong thực tế, dược liệu này còn được sử dụng để sản xuất tinh bột nghệ với sản lượng tương đối lớn. Mặc dù curcuminoid có nhiều hoạt tính quan trọng, nhưng hàm lượng các hợp chất này trong tinh bột nghệ và tinh dầu nghệ lại không

nhieu, chủ yếu nằm trong phần bã nghệ, là phần đã được bỏ đi sau khi sản xuất tinh bột nghệ. Theo khảo sát của nhóm nghiên cứu trong quá trình thực hiện đề tài “*Nghiên cứu chiết xuất, phân lập curcumin, dầu từ bã của quá trình sản xuất tinh bột nghệ từ một số giống Nghệ vàng tại tỉnh Quảng Nam*”, hằng năm ước tính có hằng trăm tấn bã nghệ được bỏ đi sau khi sản xuất tinh bột nghệ mà không được tận dụng tiếp. Điều này đồng nghĩa với việc các đơn vị đang lãng phí rất nhiều nguồn tài nguyên curcuminoid tự nhiên, vừa có thể làm ảnh hưởng đến môi trường.

Trong khuôn khổ nội dung đề tài trên, nhóm nghiên cứu đã tiến hành xây dựng phương pháp định lượng đồng thời 3 curcuminoid, gồm curcumin, demethoxycurcumin (DMC) và bisdemethoxycurcumin (BDMC), trong bã nghệ phục vụ quá trình chiết xuất curcuminoid từ bã nghệ.

2. THỰC NGHIỆM

2.1. Đối tượng nghiên cứu

Bã nghệ được thu nhận từ một số xưởng sản xuất tinh bột nghệ tại Quảng Nam, sấy khô. Trước khi sử dụng cho nghiên cứu, các mẫu được xác định độ ẩm theo Phụ lục 12.13, Dược điển Việt Nam V [1]. Các mẫu nghiên cứu được trình bày ở Bảng 1.

Bảng 1. Các mẫu bã nghệ được sử dụng để nghiên cứu

TT	Địa điểm lấy mẫu	Ký hiệu	Độ ẩm (%)
1	Cơ sở sản xuất Tinh bột Nghệ Tánh Thuận (Xã Tam Thành, H. Phú Ninh)	BN1	8,3
2	Cơ sở SX Tinh bột Nghệ Tathiba (Xã Bình Lâm, H. Thăng Bình)	BN2	9,1
3	Cơ sở SX Tinh bột nghệ Fukia (Xã Tiên Lập, H. Tiên Phước)	BN3	7,2
4	Công ty TNHH sản xuất TMDV Phương Nga (Thị trấn Tân Bình, H. Hiệp Đức)	BN4	9,4
5	Cơ sở SX Tinh bột nghệ Hiệp Đức (Thị trấn Tân Bình, H. Hiệp Đức)	BN5	7,8

Mẫu BN1 được sử dụng để xây dựng và thẩm định quy trình định lượng các hợp chất cần nghiên cứu.

2.2. Phương pháp nghiên cứu

2.2.1. Phương pháp định lượng

Sử dụng phương pháp sắc ký lỏng hiệu năng cao (HPLC) theo Phụ lục 5.3, Dược điển Việt Nam V [1]. Quy trình phân tích cụ thể như sau:

* **Điều kiện sắc ký:** Hệ sắc ký lỏng pha đảo sử dụng cột C18 (250 x 4,6 mm; 5 µm) được rửa giải bằng hỗn hợp dung môi acid phosphoric 0,1 % và acetonitril tỷ lệ 55 : 45 với tốc độ dòng 1,5 ml/phút. Mẫu phân tích được tiêm 10 µl vào hệ thống sắc ký và tín hiệu các chất được phát hiện bởi detector DAD đặt ở bước sóng 425 nm. Nhiệt độ cột được duy trì ở 30 °C trong suốt quá trình phân tích mẫu.

* **Chuẩn bị mẫu:** Mẫu chuẩn gồm dãy dung dịch chứa đồng thời các hợp chất curcumin, DMC và BDMC ở các nồng độ từ 0,002 mg/ml; 0,01 mg/ml; 0,02 mg/ml; 0,1 mg/ml và 0,2 mg/ml pha trong methanol. Mẫu thử được chuẩn bị bằng cách cân chính xác khoảng 0,5 g mẫu bã nghệ vào bình định mức 100 ml. Thêm khoảng 70 ml methanol, siêu âm 30 phút. Để nguội, thêm methanol vừa đủ thể tích, lắc đều. Hút và pha loãng chính xác 5,0 ml dịch thu được trong vừa đủ 50,0 ml bằng methanol và lọc qua màng 0,45 μ m.

Tiến hành sắc ký các dung dịch chuẩn, dung dịch thử đã chuẩn bị như trên vào hệ thống sắc ký, ghi lại sắc ký đồ và các thông số diện tích pic, độ phân giải của các chất.

* **Đánh giá kết quả:** Thứ tự rửa giải của các chất lần lượt là BDMC, DMC và curcumin, trong đó, sắc ký đồ của mẫu chuẩn có nồng độ 0,02 mg/ml phải cho độ phân giải của pic BDMC so với pic DMC và của pic BDMC so với pic curcumin ít nhất là 1,5. Tính toán hàm lượng các chất BDMC, DMC và curcumin thông qua phương trình hồi quy được thiết lập từ diện tích pic các chất tương ứng trong mẫu chuẩn đã được sử dụng.

2.2.2. Thẩm định quy trình phân tích

Thẩm định phương pháp theo hướng dẫn của AOAC international [11], bao gồm độ đặc hiệu, độ thích hợp hệ thống, độ tuyến tính, độ đúng, độ chính xác và giới hạn định lượng.

2.3. Thiết bị, dụng cụ, hóa chất

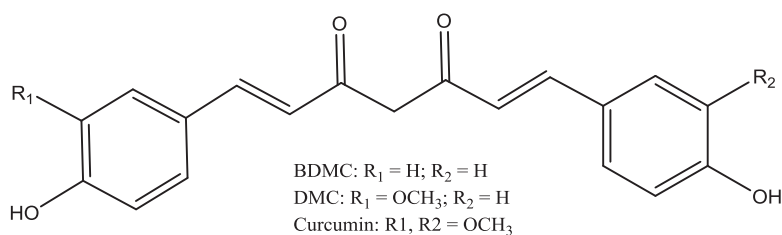
Thiết bị sắc ký lỏng hiệu năng cao Shimadzu LC20A (Shimadzu, Nhật Bản); cân phân tích Mettler Toledo MS105 chính xác tới 0,01 mg (Mettler Toledo, Thụy Sĩ; máy lắc siêu âm; các bình định mức, pipet, và các dụng cụ thủy tinh có độ chính xác phù hợp.

Chất chuẩn phòng thí nghiệm được thiết lập bởi Viện Kiểm nghiệm Thuốc TP. Hồ Chí Minh, gồm curcumin (lô QT209 071120, hàm lượng 85,7 % nguyên trạng), demethoxycurcumin (lô QT376 0422, hàm lượng 87,7 % nguyên trạng) và bisdemethoxycurcumin (lô QT377 0422, hàm lượng 90,0 % nguyên trạng).

Các dung môi methanol, acetonitril (loại tinh khiết dùng cho sắc ký), acid phosphoric, diclomethan, ethanol (loại tinh khiết phân tích), và nước deion RO.

III. KẾT QUẢ VÀ BÀN LUẬN

3.1. Xây dựng quy trình định lượng



Hình 1. Công thức cấu tạo các curcuminoid

Các hợp chất curcuminoid đang nghiên cứu có công thức cấu tạo gồm 02 vòng thơm và nhiều hệ nối đôi liên hợp nên các hợp chất này có màu vàng và sẽ hấp thụ các bức xạ vùng UV-VIS. Hợp chất này ít phân cực nên rất ít tan trong nước, tan nhiều trong các dung môi methanol, ethanol và các dung môi ít phân cực khác nên hệ sắc ký pha thuận và pha đảo đều có thể khả thi để lựa chọn phân tích các hợp chất này. Trong phân tích, phương pháp sắc ký lỏng pha đảo thông dụng và “thân thiện” hơn với môi trường cũng như thiết bị phân tích, các hợp chất này tan trong methanol và ethanol, nên ưu tiên lựa chọn phương pháp này để xây dựng quy trình định lượng.

Qua tham khảo một số tài liệu nghiên cứu trước đó khi phân tích định lượng các curcuminoid trong nghệ và

một số sản phẩm từ nghệ, cột C18 được sử dụng để khảo sát xây dựng quy trình phân tích [12]. Các hợp chất này có pKa > 7 nên sử dụng các dung dịch đệm vùng acid làm pha động để đảm bảo các hợp chất tồn tại ở dạng nguyên trạng, tránh tương tác ion và nâng cao hiệu quả tách các chất. Hệ pha động gồm hỗn hợp acid phosphoric 0,1 % (pH ~ 1,5) và acetonitril ở các tỷ lệ khác nhau được khảo sát để xác định hệ pha động dùng để định lượng các curcuminoid từ bã nghệ.

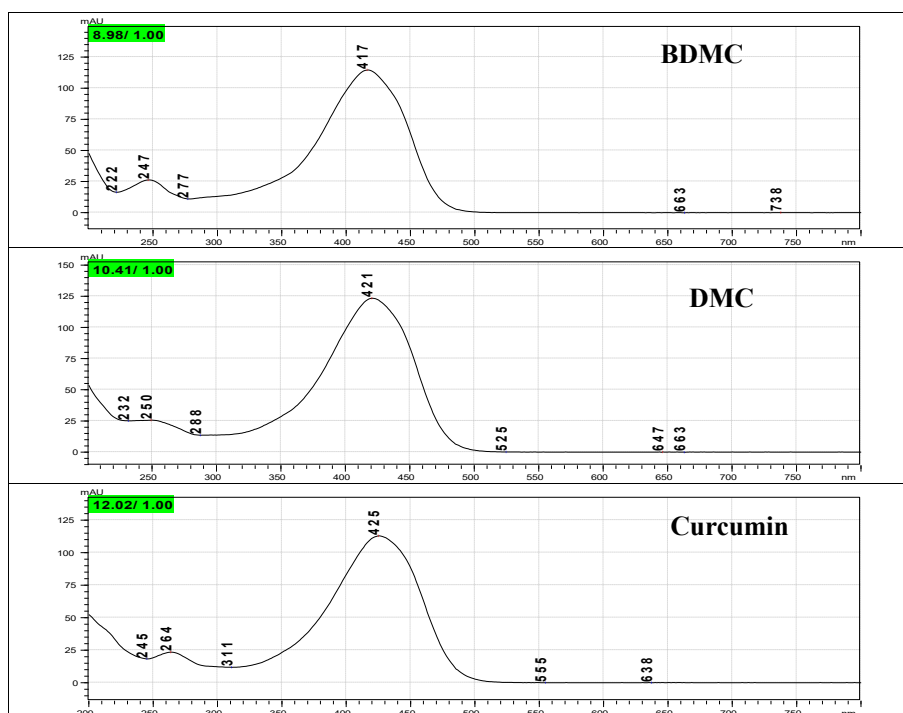
Chương trình pha động đẳng dòng được khảo sát phân tích dung dịch chứa 3 thành phần nghiên cứu ở nồng độ 0,1 mg/ml với hỗn hợp acid phosphoric 0,1 % và acetonitril ở các tỷ lệ khác nhau, gồm 50 : 50; 55 : 45 và 60 : 40. Kết quả được trình bày như Bảng 2.

Bảng 2. Kết quả phân tích mẫu hỗn hợp curcuminoid với các hệ pha động khác nhau

	Thời gian lưu (phút)	Độ phân giải	Hệ số kéo đuôi
Chương trình 1: Acid H₃PO₄ 0,1 % : acetonitril tỷ lệ 60 : 40			
Bisdemethoxycurcumin	16,55	–	1,1
Demethoxycurcumin	19,45	4,9	1,2
Curcumin	22,55	4,8	1,1
Chương trình 2: Acid H₃PO₄ 0,1 % : acetonitril tỷ lệ 55 : 45			
Bisdemethoxycurcumin	8,97	–	1,1
Demethoxycurcumin	10,42	4,3	1,1
Curcumin	11,97	4,3	1,1
Chương trình 3: Acid H₃PO₄ 0,1 % : acetonitril tỷ lệ 50 : 50			
Bisdemethoxycurcumin	5,5	–	1,1
Demethoxycurcumin	6,1	2,5	1,1
Curcumin	6,8	2,3	1,1

Theo kết quả trên, cả ba chương trình pha động đều cho pic các chất có độ cân đối khá cao (hệ số kéo đuôi ~ 1,1), tuy nhiên các thông số khác lại có sự khác biệt nhiều. Ở chương trình pha động 1 và chương trình pha động 2 cho độ phân giải giữa các pic không quá khác nhau, nhưng thời gian rửa giải các chất bằng chương trình pha động 1

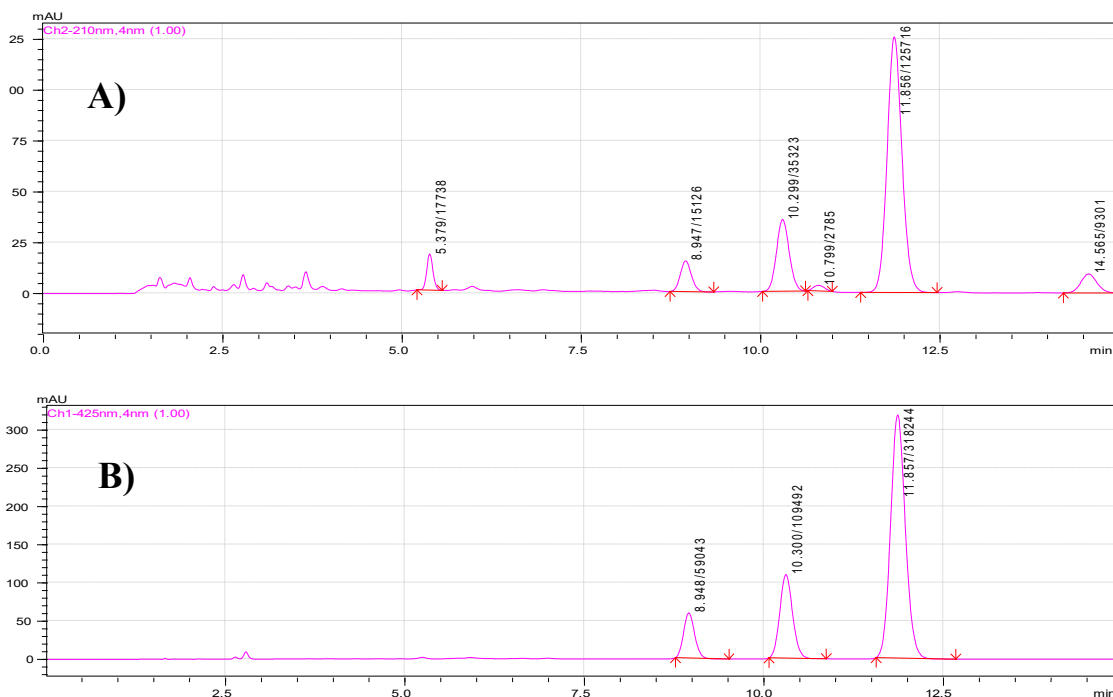
gần như là gấp đôi thời gian phân tích ở chương trình 2. Chương trình pha động 3 có thời gian lưu các chất ngắn hơn, tuy nhiên độ phân giải các chất lại ít hơn hẳn chương trình pha động 1 và 3. Do đó, chương trình pha động 2 được lựa chọn để tiếp tục nghiên cứu.



Hình 2. Phổ UV-VIS của các chất nghiên cứu

Dịch chiết các dược liệu thường chứa khá nhiều tạp chất, bên cạnh việc tách các hợp chất cần phân tích bằng kỹ thuật sắc ký, việc lựa chọn bước sóng phân tích thích hợp cũng giúp hạn chế bớt các ảnh hưởng của các chất không liên quan lên kết quả phân tích. Các hợp chất BDMC, DMC và curcumin hấp thụ bức xạ cả ở vùng UV và VIS, trong vùng VIS các hợp chất này có cực đại hấp thụ tương ứng ở các bước sóng 417 nm, 421 nm và 425 nm, trong

đó curcumin là hợp chất thường có hàm lượng lớn hơn hai hợp chất còn lại khá nhiều trong nghệ tự nhiên. Khảo sát ở bước sóng ngắn tại 210 nm, mẫu thử có xuất hiện pic của một số tạp chất, đặc biệt là có tạp chất xuất hiện ngay cạnh pic DMC (thời gian lưu 10,3 phút), trong khi bước sóng 425 nm khá chọn lọc cho các hợp chất curcuminoid này (xem Hình 3). Như vậy bước sóng 425 nm sẽ ưu tiên lựa chọn để định lượng các curcuminoid trong mẫu bã nghệ.



Hình 3. Sắc ký đồ của mẫu thử phân tích ở bước sóng 210 nm (A) và 425 nm (B)

Các thể tích tiêm mẫu ở 10 μ l và 20 μ l cũng được khảo sát. Đây là hai thể tích tiêm thường sử dụng trong HPLC, trong đó thể tích tiêm mẫu là 10 μ l cho độ phân giải các pic tốt hơn, đáp ứng pic trong khoảng khả năng phân tích mẫu thử khá tốt. Do đó lựa chọn 10 μ l là thể tích tiêm mẫu trong quy trình. Nhiệt độ cột đặt ở 30 $^{\circ}$ C giúp ổn định hệ thống trong suốt quá trình phân tích, đảm bảo độ lặp lại của kết quả.

Cả ba hợp chất BDMC, DMC và curcumin đều tan tốt trong methanol, dự kiến lựa chọn dung môi này làm dung môi pha mẫu. Lần lượt cân chính xác khoảng 0,5 g mẫu bã nghệ vào 4 bình định mức 100 ml, thêm 70 ml methanol. Tiến hành siêu âm các bình chứa mẫu trên với thời gian tương ứng là 5 phút, 10 phút, 30 phút và 60 phút. Duy trì nhiệt độ siêu âm không quá 30 $^{\circ}$ C. Sau thời gian siêu âm, để nguội, thêm methanol đến vạch. Hút và pha loãng chính xác 5,0 ml trong vừa đủ 50,0 ml bằng methanol và

lọc qua màng lọc 0,45 μ m. Tiêm lần lượt các dung dịch trên vào hệ thống sắc ký. So sánh giá trị diện tích pic của các hợp chất trên khối lượng mẫu đã cân. Kết quả cho thấy các giá trị này ở các bình sau siêu âm 30 phút và 60 phút là tương đương nhau. Như vậy để tiết kiệm thời gian chuẩn bị mẫu và tránh cho các chất có thể bị phân hủy trong quá trình siêu âm, chọn thời gian siêu âm mẫu là 30 phút.

Sau quá trình tối ưu các thông số sắc ký và chuẩn bị mẫu, quy trình phân tích được trình bày ở Mục 2.2.1.

3.2. Thảm định quy trình phân tích

3.2.1. Độ đặc hiệu

Tiến hành sắc ký các dung dịch gồm methanol (mẫu trắng); các dung dịch chuẩn chứa lần lượt từng thành phần hợp chất BDMC, DMC và curcumin ở nồng độ tương ứng là 0,0196 mg/ml, 0,0202 mg/ml và 0,0205 mg/ml; và dung dịch thử 1 ở phân độ lặp lại.

Kết quả cho thấy sắc ký đồ mẫu thử xuất hiện 03 pic chính có thời gian lưu tương ứng với thời gian lưu của pic BDMC (~ 8,9 phút), DMC (~ 10,3 phút) và curcumin (~ 11,9 phút) trên sắc ký đồ của các dung dịch chuẩn. Sắc ký đồ mẫu trắng không xuất hiện pic có thời gian lưu tương ứng với thời gian lưu của các hợp chất trên. Như vậy quy trình phân tích đã xây dựng đáp ứng yêu cầu về độ đặc hiệu để định lượng các curcuminoid

trong bã nghệ.

3.2.2. Độ thích hợp hệ thống

Tiêm lặp lại 06 lần dung dịch chuẩn chứa 3 thành phần hợp chất nghiên cứu có nồng độ khoảng 0,02 mg/ml vào hệ thống sắc ký. Ghi lại sắc ký đồ, đánh giá độ lặp lại của thời gian lưu, diện tích pic, độ phân giải giữa các hợp chất.

Bảng 3. Kết quả đánh giá độ thích hợp hệ thống

Tên hợp chất	Thời gian lưu		Diện tích pic		Độ phân giải trung bình
	Trung bình (phút)	RSD (%)	Trung bình (mAU.S)	RSD (%)	
BDMC	8,96	0,01	1565213	0,3	–
DMC	10,40	0,02	1592535	0,2	4,4
Curcumin	11,91	0,01	1648908	0,2	4,4

Độ phân giải giữa các hợp chất gần nhau lớn hơn 1,5; độ lặp lại của thời gian lưu và diện tích pic các hợp chất không quá 2,0 % đã đáp ứng yêu cầu về độ thích hợp hệ thống để định lượng các curcuminoid trong bã nghệ.

3.2.3. Độ tuyến tính

Từ dung dịch chuẩn gốc chứa đồng thời ba hợp chất BDMC, DMC và curcumin có nồng độ lần lượt là 200,4

µg/ml; 202,4 µg/ml và 201,3 µg/ml, pha loãng lần lượt 2, 10, 20 và 1000 lần để thu được các dung dịch chuẩn thử độ tuyến tính có nồng độ các chất trong khoảng từ 0,2 µg/ml đến 200 µg/ml. Lần lượt tiêm các dung dịch trên vào hệ thống sắc ký, ghi lại sắc ký đồ, thiết lập phương trình hồi quy giữa diện tích pic và nồng độ các dung dịch tương ứng. Kết quả độ tuyến tính được thể hiện ở Bảng 4.

Bảng 4. Kết quả đánh giá độ tuyến tính

Tên hợp chất	R	Phương trình hồi quy
BDMC	1,00000	$C (\mu\text{g/ml}) = 12,75 \times 10^{-6} \times S + 0,300$
DMC	1,00000	$C (\mu\text{g/ml}) = 12,54 \times 10^{-6} \times S + 0,176$
Curcumin	0,99999	$C (\mu\text{g/ml}) = 12,02 \times 10^{-6} \times S + 0,303$

Hệ số tương quan giữa diện tích pic và nồng độ các hợp chất đều lớn hơn 0,998, như vậy quy trình đã xây dựng đáp ứng yêu cầu về độ tuyến tính.

Chuẩn bị mẫu thử và mẫu chuẩn theo quy trình phân tích, tiến hành 2 ngày khác nhau, mỗi ngày tiến hành định lượng trên 06 thử độc lập. Kết quả đánh giá độ lặp lại và độ chính xác trung gian được trình bày ở Bảng 5.

3.2.4. Độ lặp lại và độ chính xác trung gian

Bảng 5. Kết quả đánh giá độ lặp lại và độ chính xác trung gian của phương pháp

Tên hợp chất	Độ lặp lại (n = 6)		Độ chính xác trung gian (n = 12)	
	Hàm lượng trung bình % (kl/kl)	RSD %	Hàm lượng trung bình % (kl/kl)	RSD %
BDMC	1,30	1,4 (< 1,9 %)	1,36	1,4 (< 3 %)
DMC	2,73	1,3 (< 1,9 %)	2,82	1,6 (< 3 %)
Curcumin	9,07	0,8 (< 1,9 %)	9,15	1,1 (< 3 %)

* Kết quả tính theo dược liệu khô kiệt

Kết quả nghiên cứu cho thấy độ lặp lại và độ chính xác trung gian cho RSD của hàm lượng các hợp chất trong mẫu không lớn hơn các giá trị tham chiếu theo hướng dẫn của AOAC international. Như vậy phương pháp đã xây dựng đáp ứng yêu cầu về độ lặp lại và độ chính xác trung gian.

3.2.5. Độ đúng và khoảng làm việc

Độ đúng của phương pháp được thực hiện bằng cách thêm chuẩn vào nền mẫu thử ở các nồng độ khác nhau. Mỗi nồng độ tiến hành trên 03 mẫu độc lập, cụ thể như sau:

Pha dung dịch chuẩn gốc có nồng độ các chất BDMC, DMC và curcumin lần lượt là 0,1104 mg/ml, 0,1825 mg/ml và 0,2821 mg/ml.

* **Mức nồng độ 1:** Cân chính xác khoảng 0,03 g bã nghệ vào bình định mức 100 ml. Thêm chính xác 1,0 ml dung dịch chuẩn gốc và tiến hành theo quy trình phân tích. Dung dịch thử sau khi chuẩn bị có nồng độ các chất BDMC, DMC và curcumin lần lượt ở khoảng 0,0005 mg/ml, 0,001 mg/ml và 0,003 mg/ml.

* **Mức nồng độ 2:** Cân chính xác khoảng 0,3 g bã nghệ vào bình định mức 100 ml. Thêm chính xác 10,0 ml dung dịch chuẩn gốc và tiến hành theo quy trình phân tích. Dung dịch thử sau khi chuẩn bị có nồng độ các chất BDMC, DMC và curcumin lần lượt ở khoảng 0,005 mg/ml, 0,01 mg/ml và 0,03 mg/ml.

* **Mức nồng độ 3:** Cân chính xác khoảng 0,5 g bã nghệ vào bình định mức 100 ml có chứa sẵn chính xác khoảng 15 mg chuẩn BDMC, 35 mg chuẩn DMC và 120 mg chuẩn curcumin và tiến hành theo quy trình phân tích. Dung dịch thử sau khi chuẩn bị có nồng độ các chất BDMC, DMC và curcumin lần lượt ở khoảng 0,02 mg/ml, 0,045 mg/ml và 0,15 mg/ml.

Tiến hành sắc ký các dung dịch thử độ đúng trên. Tính hàm lượng các hợp chất thu hồi được theo các giá trị khối lượng chuẩn đưa vào và giá trị hàm lượng sẵn có của các hợp chất trong mẫu (được tính toán từ phần độ lặp lại). Kết quả thử độ đúng của phương pháp được thể hiện ở Bảng 6.

Bảng 6. Kết quả đánh giá độ đúng của phương pháp

Mẫu thử (n = 3)	BDMC		DMC		CURCUMIN	
	% thu hồi	RSD (%)	% thu hồi	RSD (%)	% thu hồi	RSD (%)
Mức nồng độ 1	98,3	1,1	98,7	1,0	99,4	0,3
Mức nồng độ 2	100,5	1,3	100,7	1,5	99,5	0,2
Mức nồng độ 3	99,3	0,6	99,4	0,6	99,3	0,5

Độ thu hồi của các hợp chất nghiên cứu ở các mức nồng độ đã khảo sát nằm trong khoảng từ 98,0 % đến 102,0 %, đáp ứng được yêu cầu về độ đúng theo hướng dẫn của AOAC international.

Các mức nồng độ đã thử độ đúng nằm trong khoảng tuyến tính, có độ lặp lại và độ thu hồi tốt. Từ đó suy ra khoảng làm việc của phương pháp đối với hợp chất BDMC là 0,0005 – 0,005 mg/ml; của hợp chất DMC là 0,001 – 0,045 mg/ml và của hợp chất curcumin là 0,003 – 0,15 mg/ml.

Quy trình định lượng phục vụ cho việc đánh giá giá trị sử dụng của bã nghệ theo hàm lượng curcuminoid trong mẫu để xem xét có tái sử dụng bã nghệ hay không. Do đó, với các mẫu bã nghệ có hàm lượng curcuminoid nhỏ hơn các giá trị đang xem xét thì sẽ không được tiếp tục tái sử dụng. Như vậy, khoảng làm việc đã xây dựng của quy trình đã đáp ứng được yêu cầu thực tế của nghiên cứu mà không cần đánh giá thêm LOD và LOQ của quy trình.

3.3. Đánh giá hàm lượng một số mẫu bã nghệ đã thu nhận tại các cơ sở sản xuất

Áp dụng quy trình phân tích để đánh giá hàm lượng các mẫu bã nghệ do nhóm nghiên cứu thu nhận tại các cơ sở sản xuất tinh bột nghệ Tỉnh Quảng Nam, được trình bày ở Bảng 1. Kết quả cho thấy trong tất cả các mẫu bã nghệ đã thu nhận, curcumin là hợp chất có hàm lượng cao nhất, BDMC là hợp chất có hàm lượng thấp nhất, hàm lượng curcuminoid tổng trong các mẫu bã nghệ thu được từ 11,5 % - 14,5 %. Theo chuyên luận Nghệ trong Dược điển Việt Nam V, hàm lượng curcuminoid toàn phần yêu cầu là không ít hơn 5,0 % [1], như vậy lượng curcuminoid trong bã nghệ là tương đối cao so với yêu cầu. Do đó, việc tận dụng được nguyên liệu bã nghệ sau khi đã sử dụng để sản xuất tinh bột nghệ và tinh dầu nghệ để sản xuất curcuminoid và curcumin là cần thiết và sẽ mang lại thêm giá trị kinh tế đáng kể cho nhân dân.

Bảng 7. Hàm lượng các curcuminoid trong một số mẫu bã nghệ

Tên mẫu	Hàm lượng curcuminoid trong mẫu (% , kl/kl)			
	<i>BDMC</i>	<i>DMC</i>	<i>Curcumin</i>	<i>Tổng</i>
BN1	1,30	2,73	9,07	13,10
BN2	1,15	2,33	8,01	11,49
BN3	1,48	2,94	10,07	14,49
BN4	1,02	2,55	9,33	12,90
BN5	1,24	3,06	8,53	12,83

4. KẾT LUẬN

Nghiên cứu này đã xây dựng được phương pháp định lượng các curcuminoid trong mẫu bã nghệ bằng kỹ thuật sắc ký lỏng hiệu năng cao với các điều kiện sắc ký thông dụng, sẵn có ở các phòng thí nghiệm. Phương pháp này giúp đánh giá được khả năng tái sử dụng của các mẫu bã nghệ để sản xuất curcuminoid và curcumin. Nghiên cứu

cũng đã ứng dụng phương pháp đã xây dựng để kiểm tra 05 mẫu bã nghệ được thu nhận ở các cơ sở sản xuất tinh bột nghệ khác nhau trên địa bàn Tỉnh Quảng Nam và cho hàm lượng curcuminoid tổng trên 12,5 %. Các mẫu này đều có thể được tiếp tục sử dụng để sản xuất curcumin và curcuminoid. Như vậy việc xây dựng phương pháp đánh giá hàm lượng curcuminoid từ bã nghệ là cần thiết, có giá trị khoa học và thực tiễn.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Hội đồng Dược điển Việt Nam - Bộ Y tế (2017), *Dược điển Việt Nam V*, Hà Nội, Nhà xuất bản Y học.
- Đỗ Huy Bích và cộng sự (2011), *Cây thuốc và Động vật làm thuốc ở Việt Nam*, Hà Nội, Nhà xuất bản Khoa học và Kỹ thuật.
- H. Ahsan, N. Parveen, NU. Khan, SM. Hadi (1999), Pro-oxidant, anti-oxidant and cleavage activities on DNA of curcumin and its derivatives demethoxycurcumin and bisdemethoxycurcumin, *Chemico-biological interactions*, 121(2), pp. 161-175.
- B. K. Adams, et al. (2005), EF24, a novel synthetic curcumin analog, induces apoptosis in cancer cells via a redox-dependent mechanism, *Anti-cancer drugs*, 16(3), pp. 263-275.
- M. T. Huang et al. (1995), Effects of curcumin, demethoxycurcumin, bisdemethoxycurcumin and tetrahydrocurcumin on 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate-induced tumor promotion, *Carcinogenesis*, 16(10), pp. 2493-2497.
- S. Kumar, U. Narain, S. Tripathi, K. Misra (2001), Syntheses of Curcumin Bioconjugates and Study of Their Antibacterial Activities against beta-Lactamase-Producing Microorganisms, *Bioconjugate chemistry*, 12(4), pp. 464-469.
- A. Unlu, E. Nayir, M. D. Kalenderoglu, O. Kirca, M. Ozdogan (2016), Curcumin (Turmeric) and cancer, *Journal of BUON : official journal of the Balkan Union of Oncology*, 21(5), pp. 1050-1560.
- T. Nishiyama, et al. (2005), Curcuminoids and sesquiterpenoids in turmeric (*Curcuma longa* L.) suppress an increase in blood glucose level in type 2 diabetic KK-Ay mice, *Journal of agricultural and food chemistry*, 53(4), pp. 959-963.
- N. Kamalakkannan, R. Rukkumani, P. S. Varma, P. Viswanathan P, K. N. Rajasekharan, V. P. Menon (2005), Comparative effects of curcumin and an analogue of curcumin in carbon tetrachloride-induced hepatotoxicity in rats, *Basic & clinical pharmacology & toxicology*, 97(1), pp. 15-21.
- K. I. Priyadarsini KI (2014), The chemistry of curcumin: from extraction to therapeutic agent, *Molecules*, 19(12), pp. 20091-20112.
- AOAC International (2016), Appendix F, *Guidelines for Standard Method Performance Requirements*, http://www.eoma.aoac.org/app_f.pdf.
- H. Soni, S. Patel, N. Govind, S. Ak (2011), Qualitative and quantitative profile of curcumin from ethanolic extract of *Curcuma longa*, *International Research Journal of Pharmacy* 2(4), pp. 180-184.