

# NGHIÊN CỨU XÁC ĐỊNH NANO CURCUMIN TRONG MỘT SỐ LOẠI THỰC PHẨM CHỨC NĂNG BẰNG PHƯƠNG PHÁP SẮC KÍ LỎNG HIỆU NĂNG CAO

NGUYỄN THỊ QUỲNH CHI - NGÔ VĂN TỬ  
Trường Đại học Sư phạm, Đại học Huế  
ĐT: 0983 826 803

**Tóm tắt:** Bài báo này mô tả kết quả nghiên cứu và xây dựng quy trình xác định nano curcumin trong thực phẩm chức năng bằng phương pháp sắc ký lỏng hiệu năng cao (HPLC) với detector photodiode array (PDA). Kết quả nghiên cứu cho thấy: phép xác định ở bước sóng 424 nm; pha động là acetonitril – đệm  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  50 mM (pH=3,5) (60:40 v/v), cột Symmetry C18 (150 mm x 4,6 mm, 5  $\mu\text{m}$ ), thể tích tiêm mẫu 20  $\mu\text{L}$  và tốc độ dòng 0,8 mL/phút. Giới hạn phát hiện của nano curcumin thấp, LOD=0,005 ppm. Diện tích peak và nồng độ của chất có mối tương quan tuyến tính với hệ số tương quan ( $R \sim 1$ ). Phương pháp có độ nhạy cao, độ lặp lại tốt với RSD <2%. Kết quả kiểm tra chất lượng của qui trình trên mẫu thực tế cho thấy phương pháp có độ đúng tốt với độ thu hồi từ 97 - 102%.

**Từ khóa:** Curcumin, HPLC, thực phẩm chức năng

## 1. MỞ ĐẦU

Curcumin là thành phần chính của Curcuminoid – một chất trong củ nghệ. Curcumin là một trong những chất chống viêm, chống oxy hóa, chống lão hóa điển hình. Nó cũng có khả năng kháng nấm, kháng khuẩn, ức chế virus viêm gan B, C... rất cao [1].

Curcumin rất kém tan trong nước (độ tan 0,001%) và chỉ hấp thu vào máu 2-5%. Vì vậy, ngày nay người ta có xu hướng sản xuất và sử dụng thực phẩm chức năng chứa curcumin dưới dạng nano, chủ yếu là loại viên nang, dễ hấp thụ hơn.

Ở Việt Nam thì việc nghiên cứu xác định hàm lượng curcumin còn hạn chế, chưa được quan tâm rộng rãi và chủ yếu mới áp dụng trên đối tượng nghệ và phẩm màu. Bài báo này trình bày kết quả nghiên cứu: xác định nano curcumin trong một số loại thực phẩm chức năng bằng phương pháp HPLC. Với qui trình đưa ra được sử dụng để phân tích nano curcumin trong các mẫu thực phẩm chức năng trên địa bàn thành phố Huế.

## 2. THỰC NGHIỆM

### 2.1. Hóa chất và thiết bị nghiên cứu

\* Hóa chất:

- Chất chuẩn: curcumin chuẩn (99%, India).

- Mẫu thử: chế phẩm chứa nano curcumin (loại viên nang).

- Methanol, acetonitril đạt tiêu chuẩn HPLC (Merck).
- Dung môi, hóa chất khác:  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ,  $\text{H}_3\text{PO}_4$ , nước cất,... đạt tiêu chuẩn tinh khiết phân tích.

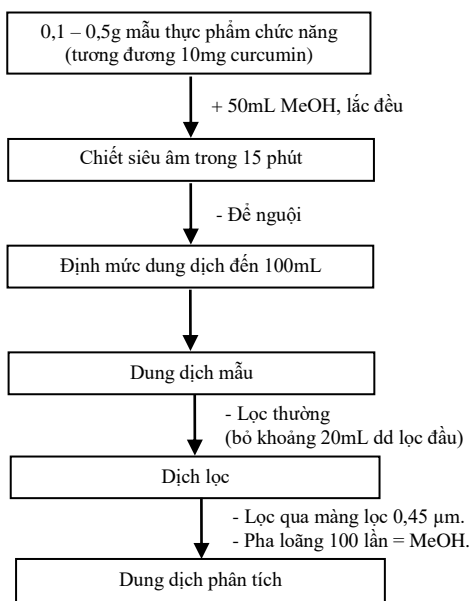
\* Thiết bị và dụng cụ phân tích:

- Máy sắc ký lỏng hiệu năng cao Series 20A của hãng Shimadzu, Nhật Bản: 4 kênh dung môi, bơm mẫu tự động, có buồng gia nhiệt cột, detector PDA, cột sắc ký Symmetry C18 (150mm x 4,6 mm, 5  $\mu\text{m}$ ) của hãng GL Sciences Inc, Nhật Bản.
- Cân phân tích Sartorius; thiết bị lọc nước siêu sạch của hãng Barnstead International, USA; tủ sấy của hãng Memmert; màng lọc 0,45  $\mu\text{m}$  của hãng Sartorius Stedim, Đức; máy lắc siêu âm, máy đo pH, các dụng cụ thủy tinh, bình định mức, pipet có độ chính xác phù hợp.

## 2.2. Quy trình phân tích

### 2.2.1. Xử lý mẫu

Qua tham khảo tài liệu [2], [3], [5], [6] để chọn quy trình xử lý mẫu theo sơ đồ như sau:



Hình 1. Sơ đồ xử lý mẫu

### 2.2.2. Chương trình sắc ký [2], [3], [5], [6]

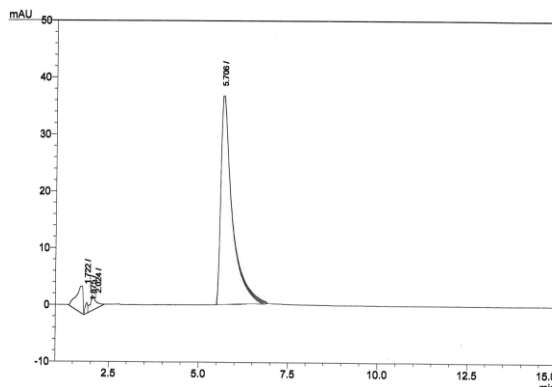
Cố định các điều kiện: cột Symmetry C18 (250 x 4,6 mm, 5  $\mu\text{m}$ ); detector PDA; thể tích bơm mẫu 20  $\mu\text{L}$ , ở nhiệt độ thường (25 $^{\circ}\text{C}$ ). Khảo sát pH của dung dịch đệm, pha động với hệ dung môi ACN:đệm  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , tốc độ dòng, tính tương thích của hệ thống sắc ký.

### 3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

#### 3.1. Kết quả

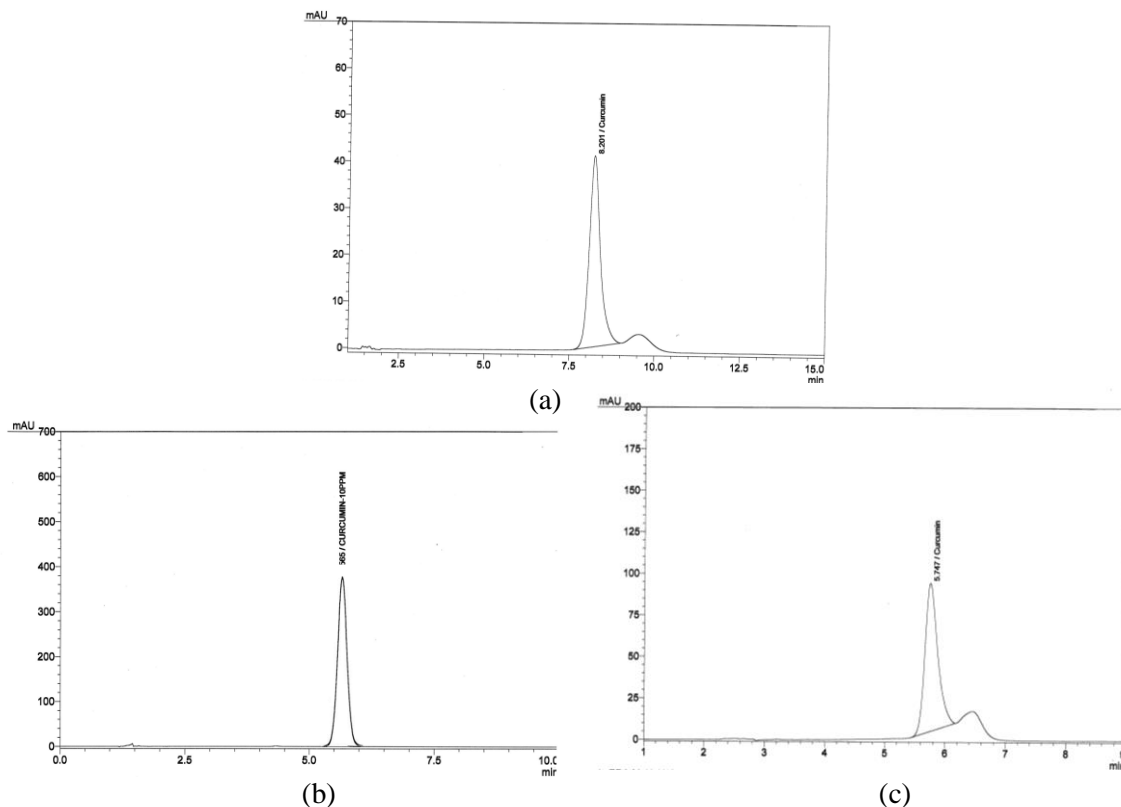
##### 3.1.1. Khảo sát ảnh hưởng của pH dung dịch đệm

Trong đề tài này, chúng tôi sử dụng dung dịch đệm photphat  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ . Các giá trị pH được lựa chọn để khảo sát bao gồm: 3; 3,5; 4; trên dung dịch chuẩn curcumin có nồng độ 10ppm với tỷ lệ pha động  $\text{ACN}:\text{KH}_2\text{PO}_4 = (50:50)$ ; tốc độ dòng 0,8 mL/ph;  $V_{\text{tiêm}} = 20 \mu\text{L}$ , kết quả thu được cho thấy: tại pH =3,5 thì peak phân tích xuất hiện ở khoảng thời gian không quá dài khoảng 5,5 phút, hiệu quả tách tốt. Do vậy, pH =3,5 được chọn để tiếp tục khảo sát các bước sau.



Hình 2. Sắc ký đồ khảo sát pH dung dịch đệm (pH=3,5)

##### 3.1.2. Khảo sát ảnh hưởng của pha động



Hình 3. Sắc ký đồ khảo sát thành phần pha động:  
(a)  $\text{ACN}:\text{KH}_2\text{PO}_4 = (50:50)$ ; (b)  $\text{ACN}:\text{KH}_2\text{PO}_4 = (60:40)$ ; (c)  $\text{ACN}:\text{KH}_2\text{PO}_4 = (70:30)$

Thành phần pha động được khảo sát bao gồm: acetonitril (ACN): đệm  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ . Chúng tôi tiến hành khảo sát các tỷ lệ pha động ACN: $\text{KH}_2\text{PO}_4$ = (50:50); ACN: $\text{KH}_2\text{PO}_4$ = (60:40) ACN: $\text{KH}_2\text{PO}_4$ = (70:30); trên dung dịch chuẩn curcumin có nồng độ 10ppm với tốc độ dòng 0,8 mL/ph;  $V_{\text{tiêm}} = 20 \mu\text{L}$ , kết quả thu được các sắc ký đồ được thể hiện qua hình 3a, b,c.

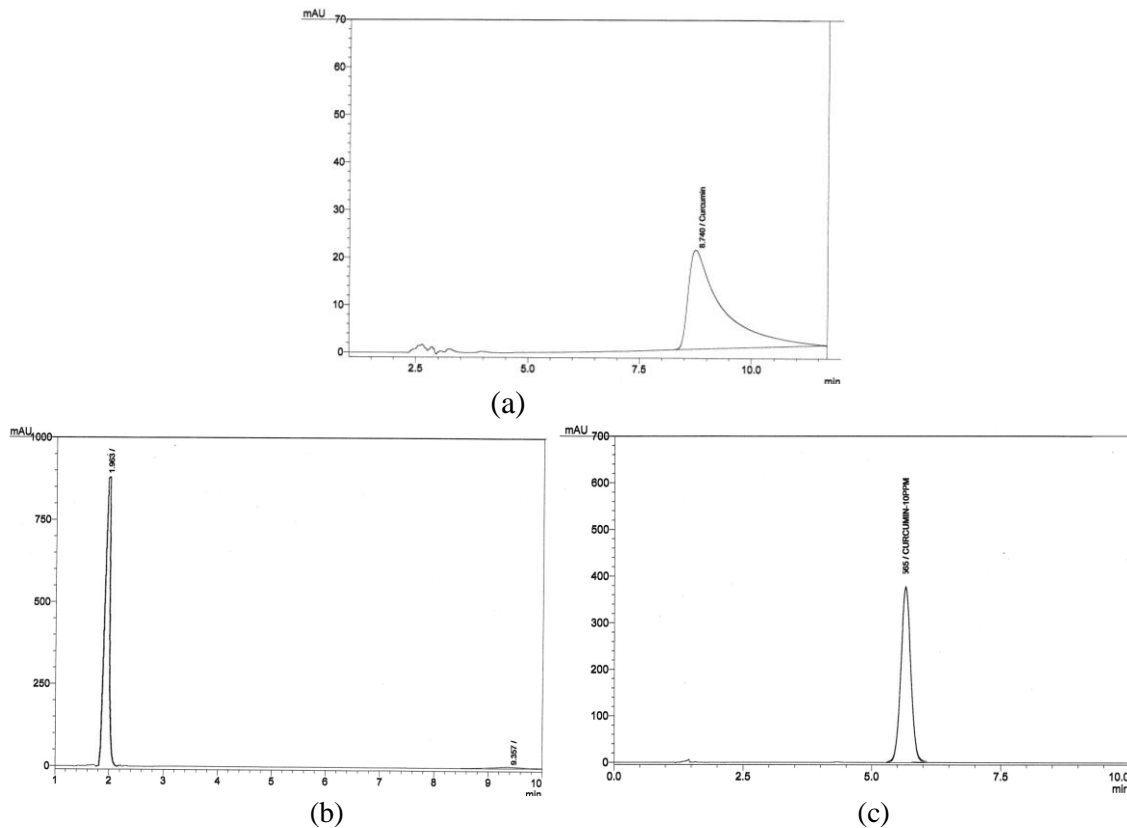
Bảng 1. Hệ số đối xứng peak của các tỷ lệ hệ dung môi pha động

Ký hiệu	Hệ dung môi	Tỷ lệ pha động	Hệ số đối xứng
(a)	ACN: $\text{KH}_2\text{PO}_4$	50 : 50	1,353
(b)	ACN: $\text{KH}_2\text{PO}_4$	60 : 40	1,080
(c)	ACN: $\text{KH}_2\text{PO}_4$	70 : 30	1,372

Ở trường hợp (a) và (c) xuất hiện peak phụ, điều này có thể giải thích ở các tỉ lệ pha động này cấu tử lạ có thể bị rửa giải.

Ở trường hợp (b) cho thấy peak thu được có hệ số đối xứng  $\sim 1$ , cân đối, nhọn đẹp, có cường độ tín hiệu cao, peak phân tích xuất hiện ở thời gian không quá dài khoảng 5,5 phút, hiệu quả tách tốt. Do vậy, tỉ lệ dung môi ACN:  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  =60:40 được chọn để tiếp tục khảo sát các bước sau.

### 3.1.3. Khảo sát tốc độ dòng



Hình 4. Sắc ký đồ của hệ pha động ACN: $\text{KH}_2\text{PO}_4$ =(60:40) với các tốc độ dòng: a. 0,5 mL/ph; b. 0,8 mL/ph; c. 1mL/ph

Tiến hành khảo sát trên hệ dung môi pha động ACN:KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (60:40), với các tốc độ dòng 0,5 mL/ph; 0,8 mL/ph; 1mL/ph. Kết quả được thể hiện qua các hình 4a, b, c.

Ở trường hợp (a) cho thấy peak phân tích bị nở rộng ở 1 bên chân, xuất hiện muộn. Ở trường hợp (c) thì peak xuất hiện nhưng quá nhỏ ở thời gian dài. Ở trường hợp (b) cho thấy peak phân tích xuất hiện ở khoảng thời gian không quá dài khoảng 5,5 phút, hiệu quả tách tốt, peak thu được cân đối, nhọn đẹp, có cường độ tín hiệu cao. Do vậy, chúng tôi chọn tốc độ 0,8 mL/ph để tiếp tục khảo sát các bước sau.

Bảng 2. Các thông số cơ bản ở tốc độ dòng khác nhau

Các thông số	Tốc độ dòng (mL/phút)		
	0,5 (a)	0,8 (b)	1 (c)
Thời gian lưu t <sub>R</sub>	8,740	5,565	9,357
Hệ số đối xứng S <sub>a</sub>	4,062	1,080	1,171

**Kết luận:** Qua kết quả khảo sát các yếu tố ảnh hưởng đến quá trình tách sắc ký, đã lựa chọn được điều kiện thích hợp để phân tích định lượng curcumin trên máy HPLC với cột C18, bước sóng phát hiện 424nm, thể tích bơm mẫu 20 µL, sử dụng hệ pha động ACN:KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> = (60:40), tốc độ dòng 0,8 mL/ph.

### 3.1.4. Tính tương thích của hệ thống sắc ký

Tiến hành sắc ký 6 lần cùng một mẫu chuẩn curcumin có nồng độ 10 ppm theo các điều kiện đã lựa chọn. Ghi thời gian lưu và diện tích peak thu được. Độ ổn định của hệ thống sắc ký được biểu thị bằng sai số tương đối (RSD%) của kết quả sau 6 lần tiêm của mẫu. Kết quả được trình bày trong bảng 3.

Bảng 3. Các thông số sắc ký của peak curcumin

Lần đo	Thời gian lưu (t <sub>R</sub> )	Diện tích peak	Hệ số Đối xứng
1	5,565	1543639	1,079
2	5,571	1545897	1,085
3	5,558	1542929	1,076
4	5,570	1548324	1,082
5	5,561	1547969	1,080
6	5,565	1545635	1,083
<b>TB</b>	<b>5,565</b>	<b>1545732,167</b>	<b>1,081</b>
<b>RSD (%)</b>	<b>0,11</b>	<b>0,20</b>	<b>0,30</b>

*ĐKSK: Cột C18, Detector PAD, bước sóng phát hiện 424 nm, tốc độ dòng 0,8 mL/phút, dung môi pha động là ACN:KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>=60:40, thể tích tiêm 20 µL.*

**Nhận xét:**

- Thời gian lưu trung bình của peak curcumin là 5,565 (RSD% = 0,10%) là khoảng thời gian thích hợp cho quá trình phân tích sắc ký.
- Diện tích peak trung bình của peak curcumin là 1545732,167 (RSD% = 0,20%) chứng tỏ kết quả thu được rất ổn định.

Những kết quả trên cho thấy phương pháp sắc ký lỏng hiệu năng cao có thể sử dụng cho qui trình phân tích curcumin trong các loại thực phẩm chức năng.

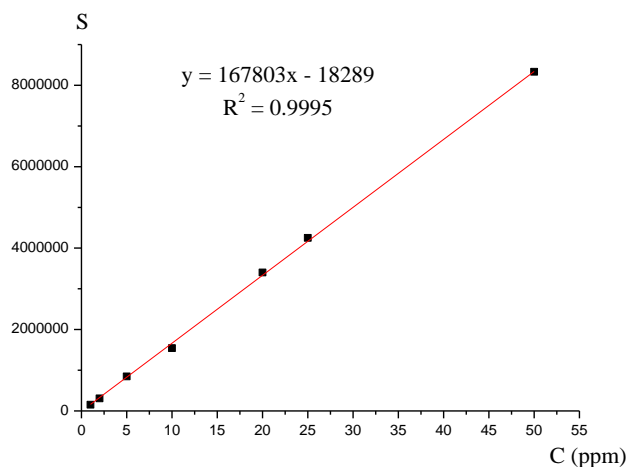
**3.2. Đánh giá phương pháp**

**3.2.1. Khoảng tuyến tính**

Tiến hành dãy TN để xác định khoảng tuyến tính có nồng độ chất phân tích từ 1÷50 ppm.

Bảng 4. Sự tương quan giữa diện tích peak và nồng độ chất phân tích

Nồng độ (ppm)	1	2	5	10	20	25	50
Diện tích	152444	307504	848875	1543327	3400336	4250420	8330840
PT hồi quy	$y = (167803.28659 \pm 1667.97575)x + (-18289.34075 \pm 38113.98885)$						
Hệ số tương quan	$R^2 = 0,9995$						



Hình 5. Đường hồi quy tuyến tính

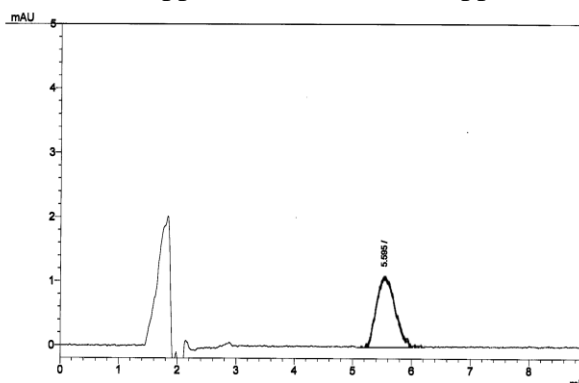
**Nhận xét:** Kết quả khảo sát cho thấy giữa nồng độ chất phân tích và diện tích peak có mối liên quan chặt chẽ, hệ số tương quan  $R^2 \sim 1$  trong khoảng nồng độ 1 ÷ 50 ppm.

**3.2.2. Xác định giới hạn phát hiện và giới hạn định lượng**

Chúng tôi dựa vào tỷ lệ tín hiệu trên nhiễu để xác định LOD.

Tiến hành chạy sắc kí 4-5 dung dịch chuẩn của curcumin trong khoảng xác định của phương pháp. Xác định độ lệch chuẩn SD. LOD được chấp nhận tại nồng độ mà tại đó tín hiệu lớn gấp 2-3 lần nhiễu nền (thường lấy =3).  $LOQ = (10/3)LOD$ .

Kết quả cho thấy:  $LOD = 0,005$  ppm và  $LOQ = 0,0165$  ppm.



Hình 6. Sắc ký đồ LOD tại nồng độ 5ppb

### 3.2.3. Xác định độ lặp lại của phương pháp

Để khẳng định khả năng áp dụng phương pháp HPLC vào phân tích hàm lượng curcumin trong mẫu thực tế, cần đánh giá qua độ lặp lại và độ đúng.

Tiến hành phân tích lặp lại sáu lần trên cùng một mẫu chất. Cân 20 viên của một mẫu thử, tính khối lượng trung bình  $m_{TB}$ . Cân lấy 6 lần lượng bột tương đương chứa khoảng 10 mg curcumin, tiến hành xử lý mẫu theo sơ đồ mục 2.2.1, đo kết quả ba lần, lấy giá trị trung bình. Kết quả được trình bày ở bảng 5.

Bảng 5. Kết quả khảo sát độ lặp lại trên mẫu thực phẩm chức năng

<b>Diện tích TB</b>	753107
<b>Nồng độ TB</b>	4,60
<b>RSD (%)</b>	0,32
<b>RSD<sub>Horwitz</sub></b>	12,72

Kết quả ở bảng 3.5 cho thấy: phương pháp đạt được độ lặp lại tốt cho nồng độ curcumin với  $RSD < 2\%$  ( $n=6$ ). Người ta cho rằng, khi xác định những nồng độ C bất kỳ, nếu đạt được RSD không vượt quá 0,5.  $RSD_{Horwitz}$  là đạt yêu cầu. ( $RSD_{Horwitz}$  là độ lệch chuẩn tương đối tính toán được từ phương trình Horwitz:  $RSD_{Horwitz} = 2^{1-0,51\log C}$  với C là nồng độ biểu diễn bằng phân số [4]. Như vậy, cỡ nồng độ 4,6ppm nếu  $RSD \leq 6,36\%$  là đạt yêu cầu.

### 3.2.4. Xác định độ đúng của phương pháp xây dựng

Để khảo sát độ đúng ta tiến hành phân tích mẫu thêm chuẩn.

Chuẩn bị các dung dịch thêm chuẩn curcumin với các nồng độ 8ppm; 10ppm; 12ppm. Tiến hành phân tích và tính độ thu hồi. Kết quả được trình bày ở bảng 6.

Bảng 6. Kết quả khảo sát độ đúng trên mẫu thực phẩm chức năng (n=3)

Mẫu	Nồng độ ban đầu C <sub>0</sub> (ppm)	Nồng độ thêm vào C <sub>1</sub> (ppm)	Nồng độ tìm thấy C <sub>2</sub> (ppm)	Tỷ lệ thu hồi Rev (%)	1/2.RSD <sub>Horwitz</sub> (%)	Kiểm tra
1	5,837	8,000	13,637	97,50	5,85	Đạt
2		10,000	15, 661	98,24	5,66	Đạt
3		12,000	18,008	101,43	5,50	Đạt

Kết quả ở bảng 3.5 cho thấy: phương pháp đạt được độ đúng tốt với độ thu hồi nằm trong khoảng từ 90% - 110%, thỏa mãn hàm Horwitz. Chứng tỏ qui trình phân tích có cơ sở khoa học để áp dụng định lượng curcumin trong mẫu thực phẩm chức năng.

### 3.3. Xác định hàm lượng curcumin trong các mẫu thực phẩm chức năng trên địa bàn thành phố Huế

Tiến hành phân tích 05 mẫu thực phẩm chức năng chứa curcumin. Kết quả trong bảng 7.

Bảng 7. Kết quả phân tích hàm lượng curcumin trong 05 mẫu thực phẩm chức năng

TT	Tên mẫu	Hàm lượng phân tích TB (mg/viên) (n=3)	Hàm lượng nhãn (mg/viên)	Kết quả TB (%) so với hàm lượng nhãn
1	Suncurmin	145,89 ± 0,82	150	97,26 ± 0,55
2	Nanocurmin	194,79 ± 2,59	200	97,39 ± 1,30
3	Cumar gold	152,78 ± 0,45	150	101,85 ± 0,30
4	Cumin pro	193,01 ± 0,62	200	96,50 ± 0,31
5	Nanocurcumin	246,71 ± 3,17	250	98,69 ± 1,27

**Nhận xét:** Từ kết quả phân tích trên 05 mẫu thực phẩm chức năng chúng tôi nhận thấy 100% sản phẩm thực phẩm chức năng đều chứa curcumin có hàm lượng gần với hàm lượng ghi trên bao bì sản phẩm mà nhà sản xuất đã công bố.

## 4. KẾT LUẬN

Phương pháp sắc ký lỏng hiệu năng cao, sử dụng phân tích hàm lượng curcumin trong các mẫu thực phẩm chức năng là phương pháp có độ nhạy cao (b =167803), độ lặp lại tốt của nồng độ curcumin (RSD% < 2%, n=6), giới hạn phát hiện thấp LOD = 0,005 ppm, giữa nồng độ curcumin và diện tích peak có tương quan tuyến tính tốt trong khoảng 1÷50 ppm với R ~ 1.

Kết quả kiểm tra chất lượng của phương pháp trên mẫu thực tế cho thấy phương pháp đạt được độ lặp lại tốt với RSD% <2%, n=6, độ đúng tốt với độ thu hồi từ 97 - 102%. Phương pháp nghiên cứu được sử dụng để xác định hàm lượng curcumin trong các mẫu thực phẩm chức năng. Kết quả phân tích 5 mẫu thực phẩm chức năng có bổ sung curcumin, chúng tôi nhận thấy 100% sản phẩm có hàm lượng curcumin như đã ghi trên bao bì.



### TÀI LIỆU THAM KHẢO

- [1] Trần Huỳnh Gia Thảo (2013). *Nghiên cứu chiết tách Curcumin từ thân rễ nghệ vàng tỉnh Bến Tre*, Luận Văn Thạc Sĩ, Đại học Sư Phạm Huế.
- [2] Jayaprakasha, J.K. (2002). Improve HPLC method for determination of curcumin, demethoxycurcumin and bisdemethoxycurcumin, *Journal of agriculture food chemistry*, 50(13), 3668-3672.
- [3] Nagappan, K.V. – Meyyanathan, S.N. – Rajinikanth, B.R. and Kannan, E. (2009), A liquid chromatography method for the simultaneous determination of curcumin and piperine in food products using diode array detection, *Asian J. Research Chem*, 2 (2), April.-June.
- [4] Miller, J. C. and Miller J. N. (1988). *Statistics For Analytical Chemistry- second edition*, Ellis Horwood Limited, John Wiley and Sons, England.
- [5] Ying, X. & al. (2006). Combinative method using HPLC quantitative and qualitative analysis for quality “consistency assessment of a herbal medicinal preparation”, *Journal of pharmaceutical and biomedical analysis*, 43, 204-212.
- [6] Zhong, M.Y. - Quan, S.C. – Hu, J.H. (2009). Simultaneous determination of curcumin and piperine in turmeric capsule by HPLC method, *Pharmaceutical Care and Research*, 6 (1), pp.54-56.

**Title:** STUDY ON NANO CURCUMIN IN SOME FUNCTIONAL FOOD BY HIGH PERFORMANCE LIQUID CHROMATOGRAPHY

**Abstract:** In this paper, we report the result of research and development analytical methods of nano curcumin in some functional foods by high performance liquid chromatography (HPLC) with photodiode array detector (PAD). The results of the study show that the determination is measured at 424 nm wavelength, the mobile phase is acetonitril and buffer  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  50mM (60:40 by volume), Symmetry C18 (150 mm x 4,6 mm, 5  $\mu\text{m}$ ) column, 20  $\mu\text{L}$  sample injection volume, flow rate 0.8 mL / min. The determination limit of curcumin is low, LOD=0,005ppm. The calibration curve of each analyte had a correlation coefficient close to 1. The precisions were all less than 2%. Results of quality control methods on real samples showed that the method has a high accuracy = 97 ÷ 102%.

**Keywords:** Curcumin, HPLC, functional food