

Định lượng curcumin trong tinh bột nghệ bằng điện di mao quản sử dụng kỹ thuật xếp chồng mẫu thể tích lớn

Nguyễn Thị Như Ngọc^{1*}, Đoàn Thị Hương Lan¹
(1) Khoa Dược, Trường Đại học Y - Dược, Đại học Huế

Tóm tắt

Đặt vấn đề: Tinh bột nghệ chứa một lượng rất nhỏ curcumin nên việc sử dụng kỹ thuật xếp chồng mẫu thể tích lớn (LVSS) để cô mẫu trực tuyến ngay trên máy điện di mao quản nhằm giảm thời gian xử lý mẫu và tăng độ nhạy của quy trình là cần thiết. Đề tài được thực hiện với hai mục tiêu: xây dựng và thẩm định quy trình định lượng curcumin trong tinh bột nghệ bằng điện di mao quản đầu dò UV-Vis và ứng dụng quy trình để định lượng curcumin trong một số mẫu tinh bột nghệ đang có trên thị trường. **Đối tượng và phương pháp nghiên cứu:** Mẫu tinh bột nghệ. Tối ưu hóa quy trình điện di, thẩm định phương pháp theo ICH, AOAC và ứng dụng vào phân tích mẫu thị trường. **Kết quả:** Điện di mao quản vùng kết hợp kiểu tiêm mẫu LVSS: tiêm glycerin 50 mBar - 5 giây, tiêm mẫu 100 mBar - 280 giây, tiêm BGE 50 mBar - 5 giây, áp điện thế -15 kV trong 190 giây. Giới hạn định lượng tăng gấp 94,6 lần so với không dùng LVSS. Phương pháp được thẩm định đạt các yêu cầu theo ICH, AOAC. **Kết luận:** Phương pháp có thể ứng dụng phân tích các mẫu tinh bột nghệ chứa hàm lượng nhỏ curcumin.

Từ khóa: curcumin, điện di mao quản.

Quantitative determination of curcumin in turmeric starch by capillary electrophoresis using large volume sample stacking

Nguyen Thi Nhu Ngoc^{1*}, Doan Thi Huong Lan¹
(1) Faculty of Pharmacy, Hue University of Medicine and Pharmacy, Hue University

Background: Turmeric starch contains a very small amount of curcumin. Therefore, using the large volume sample stacking (LVSS) technique is necessary to concentrate samples online right on the capillary electrophoresis system to reduce sample processing time and increase method sensitivity. The research was carried out with two goals: Developing and validating a method for quantifying curcumin in turmeric starch by capillary electrophoresis with UV-Vis detector and applying the method to quantify curcumin in some turmeric starch samples on the market. **Materials and methods:** Turmeric starch sample. After optimizing the process, the method was validated according to ICH and AOAC guidelines and applied to analyze market samples. **Results:** Capillary zone electrophoresis combined with LVSS sample injection: glycerin injection 50 mBar for 5 seconds, sample injection 100 mBar for 280 seconds and BGE injection 50 mBar for 5 seconds followed by polarity switching at -15 kV for 190 second. The limit of quantification increased 94.6 times compared to not using LVSS. The method was validated and met ICH and AOAC requirements. **Conclusion:** The method can be applied to analyze turmeric starch samples containing small amounts of curcumin.

Key words: curcumin, capillary electrophoresis.

1. ĐẶT VẤN ĐỀ

Tinh bột nghệ là một sản phẩm được tạo ra khi nghiền nát củ nghệ tươi, lọc bỏ bã rồi tách lấy tinh bột. Khác với bột nghệ, một sản phẩm được chế biến bằng cách xay củ nghệ đã phơi khô trực tiếp thành bột, nên hàm lượng các curcumin khá nhiều. Trên thị trường hiện đang lưu hành rất nhiều tinh bột nghệ với nhiều nguồn gốc khác nhau và sản xuất bằng phương pháp truyền thống theo kinh nghiệm nên thành phần chính của tinh bột nghệ chủ yếu là

các hạt tinh bột nghệ, còn bám lại một lượng rất nhỏ curcumin. Curcumin là thành phần chiếm tỷ lệ lớn trong các curcuminoid và thể hiện tác dụng chính như chống viêm, chống oxy hóa, làm lành vết thương, kháng khuẩn, giảm lipid máu... nên được xem như là chất chỉ điểm cho các sản phẩm từ nghệ [1]. Để đánh giá và kiểm soát chất lượng các loại tinh bột nghệ thì việc xây dựng một quy trình đánh giá qua chất chỉ điểm curcumin là rất cần thiết. Mặc khác, do hàm lượng curcumin trong tinh bột nghệ

Tác giả liên hệ: Nguyễn Thị Như Ngọc, email: ntngoc@huemed-univ.edu.vn
Ngày nhận bài: 28/02/2024; Ngày đồng ý đăng: 15/05/2024; Ngày xuất bản: 10/6/2024

khá thấp, người ta thường có xu hướng sử dụng kỹ thuật xếp chồng mẫu thể tích lớn - một trong những kỹ thuật cô mẫu trực tuyến là cần thiết để cô mẫu trực tuyến ngay trên máy điện di mao quản nhằm giảm thời gian xử lý mẫu và tăng độ nhạy của quy trình [2]. Hiện nay, ở Việt Nam có sử dụng phương pháp sắc ký lỏng và quang phổ UV-Vis định lượng curcumin trong bột nghệ và viên hoàn nghệ, chưa ứng dụng phương pháp điện di mao quản để phân tích tinh bột nghệ [3], [4]. Trên thế giới đã có công bố quy trình xác định curcuminoid trong nước tiểu bằng điện di mao quản đầu dò UV-Vis không có kết hợp kỹ thuật LVSS, phương pháp sắc ký lỏng đầu dò khối phổ hoặc điện hóa định lượng curcumin trong củ nghệ và bột nghệ [5], [6], [7]. Với những lý do trên, đề tài được thực hiện với hai mục tiêu: xây dựng và thẩm định quy trình định lượng curcumin trong tinh bột nghệ bằng điện di mao quản đầu dò UV - Vis, ứng dụng quy trình để định lượng curcumin trong một số mẫu tinh bột nghệ đang có trên thị trường.

2. ĐỐI TƯỢNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Đối tượng nghiên cứu

Mẫu tinh bột nghệ.

Chất đối chiếu: Curcumin, hàm lượng 98% (HPLC), AK Scientific (Mỹ).

Trang thiết bị: Máy điện di mao quản Agilent 7100 đầu dò PDA (Mỹ); bể siêu âm Elmasonic S100H (Đức); cân phân tích HR - 250AZ (Hàn Quốc); máy đo pH Sension⁺ pH3 Hach (Mỹ); máy lắc xoay Vortex, micropipet Labnet (Mỹ), tủ lạnh bảo quản mẫu TOSHIBA (Nhật), bể siêu âm S100H Elmasonic (Đức) và các dụng cụ thủy tinh chính xác.

Dung môi - hóa chất: Natri tetraborat decahydrat ($\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$), acid boric (H_3BO_3), methanol (MeOH) và nước (H_2O) của Merck (Đức); NaOH 1N và NaOH 0,1 N của Agilent (Mỹ).

2.2. Phương pháp nghiên cứu

Chuẩn bị mẫu

Mẫu thử: cân chính xác 0,15 g tinh bột nghệ vào bình định mức 50 ml, thêm 30 ml MeOH 70%, lắc đều và siêu âm trong 20 phút ở 60 °C, để nguội, định mức tới vạch. Dung dịch này được lọc qua màng 0,45 µm trước khi tiêm vào hệ thống điện di [3].

Dung dịch chuẩn: chuẩn bị dãy dung dịch chuẩn nồng độ chính xác 0,0037 - 0,592 ppm trong MeOH 70%.

Xây dựng quy trình định lượng curcumin trong tinh bột nghệ bằng điện di mao quản đầu dò UV-Vis

Khảo sát điều kiện điện di: dựa vào tính chất lý

hóa của curcumin, tiến hành khảo sát các điều kiện gồm nồng độ dung dịch đệm (15 mM, 20 mM, 25 mM, 30 mM, 35 mM, 40 mM, 45 mM), pH dung dịch đệm (pH 9,5; pH 10,8; pH 11,3), nhiệt độ mao quản (20 °C, 25 °C, 30 °C, 35 °C), điện thế áp vào hai đầu mao quản (20 kV, 25 kV, 30 kV) để tách tốt curcumin ra khỏi các chất khác trong nền mẫu.

Khảo sát điều kiện của kiểu tiêm LVSS: tiến hành khảo sát các điều kiện để thu được đáp ứng pic tốt nhất nhằm tăng độ nhạy cho phương pháp.

Thế tích tiêm mẫu: tiến hành khảo sát các thế tích tiêm mẫu tương ứng với $h = 1/9, 1/6, 1/4, 1/3, 1/2, 2/3, 4/5, 9/10$, 98% chiều dài cột bằng kiểu tiêm thủy động học. Sau khi tiêm, đảo cực dương về phía đầu dò bằng cách cài điện thế đảo $V_{rev} = -15$ kV. Dòng điện di (I_{95}) cần được theo dõi cẩn thận cho đến khi nó đạt khoảng 95% giá trị dòng điện ban đầu (I_{100}) thì ghi nhận thời gian đảo (t_{rev}). Sau khi mẫu được cô đặc lại ở đầu cột, tiến hành điện di với điều kiện như đã chọn.

Điện thế đảo: tiến hành khảo sát thay đổi điện thế đảo áp (V_{rev}) vào hai đầu mao quản ở các giá trị -10 kV, -15 kV, -20 kV, -25 kV tương ứng với thời gian đảo phù hợp đến khi I_{95} đạt 95% giá trị dòng I_{100} .

Thời gian đảo: sau khi chọn được điện thế đảo phù hợp cùng với thời gian đảo (t_{rev}) phù hợp, tiến hành khảo sát thời gian đảo dao động 5 giây quanh thời gian đó.

Nền mẫu: tiến hành khảo sát nền mẫu với các dung môi là MeOH 30%, MeOH 50%, MeOH 70%.

Tiêm glycerin trước lúc tiêm mẫu: tiến hành khảo sát điều kiện không và có tiêm glycerin 50 mBar - 5 giây trước khi tiêm vùng mẫu.

Tiêm BGE sau lúc tiêm mẫu: tiến hành khảo sát điều kiện không và có tiêm thêm BGE 50 mBar - 5 giây sau khi tiêm vùng mẫu.

Thẩm định phương pháp: tính đặc hiệu, tính phù hợp hệ thống, đường chuẩn và khoảng tuyến tính, giới hạn phát hiện, giới hạn định lượng, độ đúng, độ chính xác theo hướng dẫn ICH, AOAC [8], [9].

Xử lý số liệu

Các số liệu được xử lý thống kê và tính toán bằng phần mềm Microsoft Excel 2019.

Cách tính hàm lượng curcumin trong mẫu

Tính nồng độ curcumin của mẫu chế phẩm dựa trên đường chuẩn đã xây dựng, từ đó tính % hàm lượng curcumin trong mẫu tinh bột nghệ theo công thức:

$$H\% = \frac{C \cdot 50 \cdot 10^{-6}}{P} \cdot 100$$

Trong đó: C (ppm) là nồng độ mẫu thử tính từ đường chuẩn, p (g) là khối lượng cân mẫu thử.

3. KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU

3.1. Xây dựng quy trình định lượng curcumin trong tinh bột nghệ bằng điện di mao quản đầu dò UV-Vis

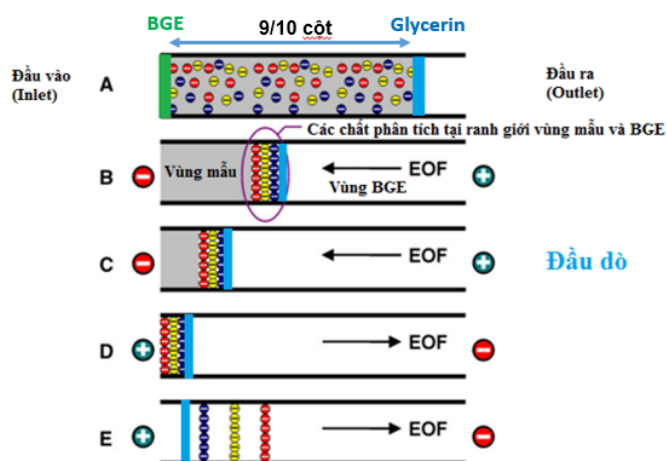
Khảo sát điều kiện điện di

Sử dụng dịch chiết mẫu thử từ tinh bột nghệ để khảo sát các điều kiện điện di. Dựa vào kết quả từ các điện di đồ thu được, đã chọn được điều kiện điện di với pic curcumin (CUR) tách nhau rõ ra khỏi các pic khác, pic sắc nhọn, đường nền đẹp, thời gian xuất hiện pic sớm.

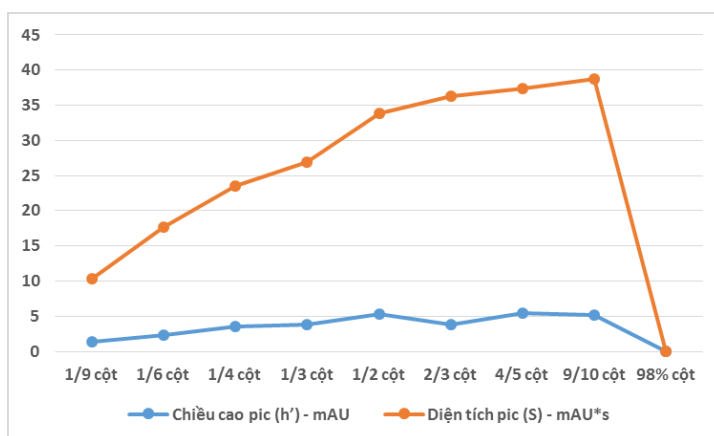
Điều kiện điện di được lựa chọn là: cột mao quản: cột silica nung chảy, chiều dài tổng 50 cm, chiều dài hiệu dụng 41,5 cm, đường kính trong 50 μ m; BGE: đệm borat 40 mM pH 10,8; điện thế: 25 kV; nhiệt độ cột: 35 $^{\circ}$ C; tiêm mẫu: 40 mBar - 5 giây; bước sóng phát hiện: 450 nm (Sig = 450, Ref = off). Hoạt hóa mao quản lần đầu: H₂O 3 phút, NaOH 1 N trong vòng 30 phút, NaOH 0,1 N 30 phút, H₂O 5 phút. Rửa mao quản đầu ngày, trước mỗi lần phân tích: NaOH 0,1 N 2 phút, H₂O 2 phút, BGE 3 phút. Rửa mao quản cuối ngày: H₂O 2 phút, NaOH 0,1 N trong vòng 5 phút, H₂O 9 phút.

Khảo sát điều kiện của kiểu tiêm LVSS

Với điều kiện điện di đã chọn ở trên, khi tiến hành phân tích mẫu có thể tích mẫu tiêm tương ứng với 40 mBar - 5 giây thì chỉ định lượng được mẫu có nồng độ curcumin 0,7 ppm. Đối với mẫu tinh bột nghệ thì hàm lượng curcumin thường bám lại trên hạt tinh bột nghệ khá ít so với hàm lượng curcumin trong các mẫu bột nghệ. Để nâng cao giới hạn định lượng của quy trình, tiến hành khảo sát điều kiện tiêm theo kiểu LVSS (Hình 1, 2 và Bảng 1). Sau khi khảo sát, điều kiện của kiểu tiêm mẫu LVSS được lựa chọn đạt được chiều cao và diện tích pic tối ưu nhưng hình dạng pic và khả năng tách vẫn đảm bảo là: mẫu được chuẩn bị trong nền mẫu MeOH 70%. Tiến hành tiêm glycerin ở 50 mBar - 5 giây, tiếp theo là dung dịch mẫu thử ở 100 mBar - 280 giây tương ứng 9/10 chiều dài cột, sau đó tiêm thêm BGE ở 50 mBar - 5 giây (bước A). Sau khi tiêm, áp một điện thế đảo -15 kV trong thời gian đảo 190 giây (bước B và C). Sau khi mẫu được cô đặc lại ở đầu cột (bước D), tiến hành điện di với điều kiện như đã chọn ở trên (bước E).



Hình 1. Quy trình của kỹ thuật LVSS



Hình 2. Kết quả khảo sát thể tích tiêm mẫu trong LVSS

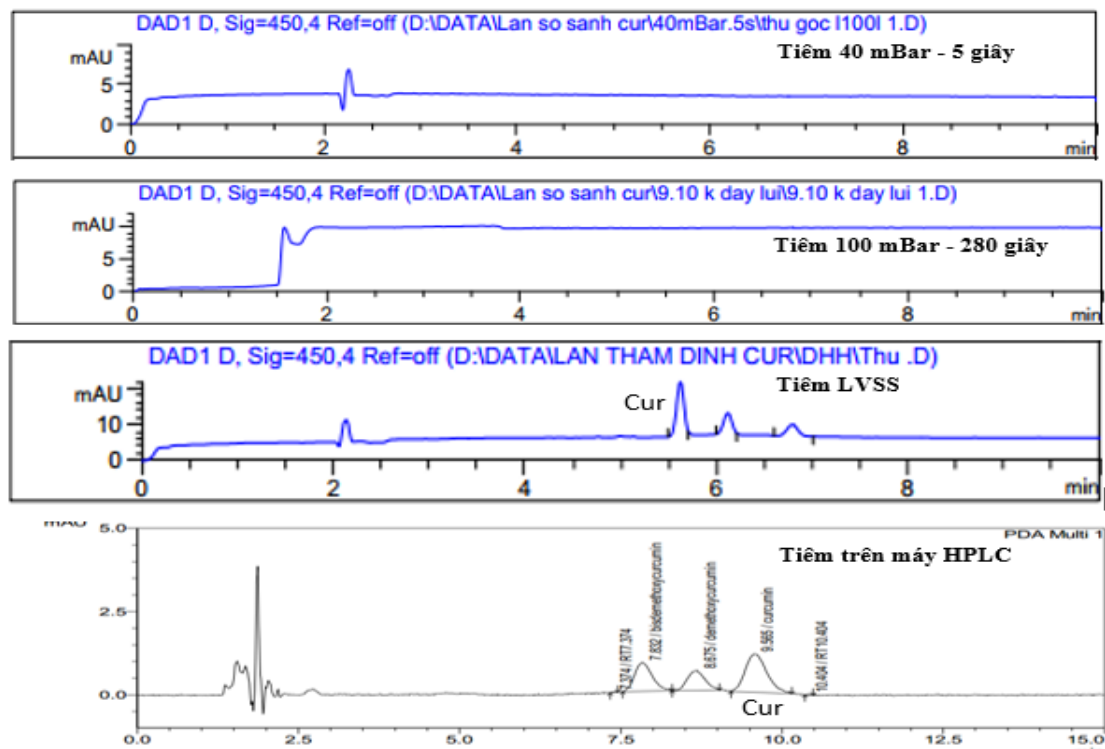
Bảng 1. Kết quả khảo sát một số yếu tố khác của kiểu tiêm LVSS

Yếu tố khảo sát	Rs	As	S (mAu.s)	h' (mAu)	
Điện thế đảo (V_{rev})	-10 kV	3,1	1,1	32,131	5,095
	-15 kV	3,1	1,1	38,815	5,856
	-20 kV	1,4	1,1	27,203	3,154
	-25 kV	2,6	1,3	20,751	2,216
Khảo sát thời gian đảo (t_{rev})	185 giây	1,6	1,0	38,380	4,906
	190 giây	3,1	1,1	38,815	5,856
	195 giây	3,3	1,1	15,066	2,651
Nền mẫu	MeOH 30%	1,4	1,0	20,848	2,737
	MeOH 50%	2,0	1,1	33,946	5,571
	MeOH 70%	3,1	1,1	38,815	5,856
Tiêm BGE sau khi tiêm mẫu	Không	2,6	1,1	38,236	5,624
	Có	3,1	1,0	38,894	5,826
Tiêm glycerin trước khi tiêm mẫu	Không	2,6	1,1	36,542	5,038
	Có	3,1	1,1	38,815	5,856

(Rs: Độ phân giải, As: hệ số đối xứng, S: Diện tích pic, h': chiều cao pic)

So sánh giữa các cách tiêm trong điện di và HPLC

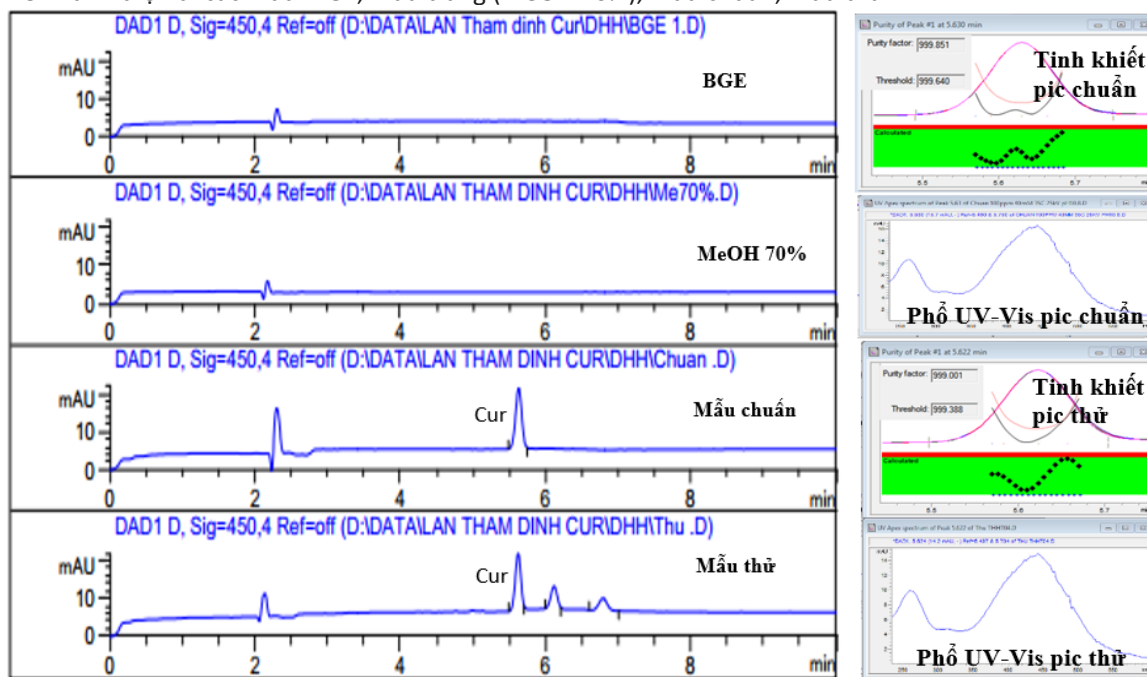
Tiến hành so sánh kết quả khi phân tích cùng một dịch chiết của mẫu tinh bột nghệ có nồng độ curcumin khoảng 0,185 ppm. Kết quả từ Hình 3 cho thấy: kiểu tiêm thể tích nhỏ (0,006 μ l) ứng với 40 mBar - 5 giây không phát hiện pic; kiểu tiêm thể tích lớn (0,884 μ l) ứng với 100 mBar - 280 giây (không đảo thế để xếp chồng mẫu) bị quá tải gây nhiễu đường nền; kiểu tiêm LVSS cho kết quả pic sắc nhọn, đối xứng, độ phân giải tốt so với khi tiêm 20 μ l trên máy HPLC đã công bố [3].



Hình 3. So sánh giữa các cách tiêm trong điện di và HPLC

3.2. Thẩm định phương pháp đã xây dựng theo hướng dẫn ICH và AOAC Độ đặc hiệu

Tiến hành điện di các mẫu: BGE, mẫu trắng (MeOH 70%), mẫu chuẩn, mẫu thử.



Hình 4. Điện di đồ các mẫu, độ tinh khiết và phổ UV-Vis chứng minh tính đặc hiệu

Trên điện di đồ mẫu trắng và mẫu BGE không xuất hiện pic tương ứng tại thời gian di chuyển của pic curcumin trong điện di đồ mẫu chuẩn. Trên điện di đồ mẫu thử xuất hiện pic tương ứng tại thời gian di chuyển của pic curcumin trong điện di đồ mẫu chuẩn. Pic curcumin tách hoàn toàn ra khỏi các pic khác. Phổ UV-Vis tại thời gian di chuyển của pic curcumin trong mẫu thử giống phổ UV-Vis tại thời gian di chuyển của pic curcumin trong mẫu chuẩn. Pic của curcumin trong các điện di đồ của các mẫu đạt độ tinh khiết cao.

Tính phù hợp hệ thống

Tiêm lặp lại 06 lần mẫu thử, thu được các điện di đồ. Độ lệch chuẩn tương đối RSD của thời gian di chuyển t_R và diện tích S của curcumin là 0,29% và 0,25% nằm trong khoảng cho phép ($RSD \leq 3,0\%$); $0,8 \leq A_s \leq 1,5$; $R_s \geq 1,5$; $N > 1000$ (N : Số đĩa lý thuyết, R_s : Độ phân giải, A_s : hệ số đối xứng). Quy trình phù hợp với hệ thống điện di mao quản cho việc định lượng curcumin trong tinh bột nghệ.

Đường chuẩn và khoảng tuyến tính

Tiến hành điện di các mẫu chuẩn curcumin có nồng độ 0,019 - 0,592 ppm. Xác định tương quan giữa nồng độ và diện tích pic của curcumin. Có sự tương quan tuyến tính giữa nồng độ với diện tích pic trong khoảng nồng độ khảo sát 0,019 - 0,592 ppm với $R^2 = 0,9978$. Sử dụng trắc nghiệm t - test và trắc

nghiệm F - test đã xác định được phương trình là $y = 199,94x$.

Giới hạn phát hiện (LOD)

Giới hạn phát hiện được xác định bằng cách tiến hành pha loãng dần nồng độ curcumin trong mẫu thử. Tại nồng độ 0,0037 ppm thì tỉ số tín hiệu/nhiều nền (S/N) là $0,07706/0,02500 \approx 3$ nên quy trình có giới hạn phát hiện là $LOD = 0,0037$ ppm.

Giới hạn định lượng (LOQ)

Giới hạn định lượng được xác định bằng cách tiến hành pha loãng dần nồng độ curcumin trong mẫu thử. Tại nồng độ 0,0074 ppm thì tỉ số S/N = $0,22505/0,02257 \approx 10$ nên quy trình có giới hạn định lượng là $LOQ = 0,0074$ ppm. Tiến hành xác định độ chính xác và độ đúng tại nồng độ tương ứng LOQ. Độ thu hồi của curcumin trong mẫu nằm trong khoảng 90 - 107% và độ lặp lại với $RSD \leq 5,3\%$ nên quy trình định lượng đạt yêu cầu về độ chính xác và độ đúng tại LOQ.

Độ đúng

Thêm chính xác một lượng chuẩn curcumin vào các mẫu thử sao cho các tỷ lệ sau khi thêm lần lượt là 10%, 20% và 30% so với hàm lượng curcumin trong mẫu thử. Tiến hành điện di mẫu thử không thêm chuẩn và các mẫu thử có thêm chuẩn, mỗi nồng độ được tiến hành phân tích 3 lần trong cùng điều kiện. Tính độ thu hồi dựa vào lượng chuẩn thêm vào ban đầu.

Bảng 2. Kết quả thẩm định độ đúng

Mẫu thêm chuẩn (n = 3)	Trung bình độ thu hồi (%)	RSD (%)
10%	100,551	1,048
20%	92,446	2,199
30%	93,229	1,589
Trung bình (n = 9)	95,404	4,300

Độ thu hồi của curcumin nằm trong khoảng cho phép 90 - 107%, giá trị RSD của 3 mẫu cùng nồng độ và của 9 mẫu đều 5,3% nên quy trình đạt yêu cầu về độ đúng.

Độ chính xác

Độ lặp lại được tiến hành trên 6 mẫu thử theo

quy trình và song song với mẫu chuẩn trong cùng ngày. Xác định hàm lượng (%) của curcumin trong mẫu và RSD của các mẫu. Độ chính xác trung gian tiến hành như độ lặp lại nhưng khác ngày và khác người thực hiện.

Bảng 3. Kết quả thẩm định độ chính xác

Độ chính xác	Hàm lượng (%)	RSD (%)
Độ lặp lại (n = 6)	0,0061	1,182
Độ chính xác trung gian (n = 6)	0,0062	1,151

RSD (%) của hàm lượng curcumin trong các mẫu đều nhỏ hơn 5,3%. So sánh với kết quả độ lặp lại và độ chính xác trung gian, kiểm tra bằng t - test cho thấy $|t_{\text{Stat}}| = 0,683 < t_{\text{Critical two-tail}} = 2,200985$ nên hai trung bình không khác nhau có ý nghĩa thống kê. Hai kiểm nghiệm viên thực hiện trong hai ngày đồng nhất về thống kê nên quy trình đạt độ chính xác trung gian.

Khoảng xác định

Độ đúng, độ chính xác và tính tuyến tính đều

đạt trong khoảng nồng độ 0,019 - 0,592 ppm. Vậy khoảng xác định của quy trình là 0,019 - 0,592 ppm.

3.3. Ứng dụng quy trình đã xây dựng để định lượng curcumin trong một số mẫu tinh bột nghệ trên thị trường

Quy trình sau khi được thẩm định đã được áp dụng để kiểm tra hàm lượng curcumin trong một số mẫu tinh bột nghệ trên thị trường đã được mã hóa.

Bảng 4. Kết quả phân tích một số mẫu trên thị trường

Mẫu	Nồng độ (ppm)	Hàm lượng (%)	Mẫu	Nồng độ (ppm)	Hàm lượng (%)
Cur1	0,147	0,0048	Cur5	0,229	0,0075
Cur2	0,327	0,0109	Cur6	0,129	0,0043
Cur3	0,298	0,0098	Cur7	0,175	0,0058
Cur4	0,464	0,0154			

Qua khảo sát các mẫu tinh bột nghệ trên thị trường cho thấy, hàm lượng % curcumin trong các mẫu tinh bột nghệ có sự khác biệt nhau. Hàm lượng curcumin trong 7 mẫu tinh bột nghệ khá thấp, biến thiên từ 0,0043 - 0,0154%. Các sản phẩm tinh bột trên thị trường ở Việt Nam có chất lượng rất khác nhau nên người tiêu dùng cũng khó phân biệt được.

4. BÀN LUẬN

4.1. Xây dựng quy trình định lượng curcumin trong tinh bột nghệ bằng điện di mao quản đầu dò UV-Vis

Điều kiện điện di

Mẫu tinh bột nghệ chứa hỗn hợp các curcuminoid gồm 3 thành phần: curcumin, demethoxycurcumin,

bisdemethoxycurcumin và hàm lượng curcumin là thành phần chiếm tỷ lệ lớn thể hiện tác dụng chính như chống viêm, chống oxy hóa, làm lành vết thương, kháng khuẩn, giảm lipid máu... nên được xem như là chất chỉ điểm cho các sản phẩm từ nghệ [1]. Các curcuminoid trên có cấu trúc hóa học khá giống nhau dẫn đến khó có khả năng tách các chất ra khỏi nhau. Quy trình điện di xây dựng đã tách tốt các chất ra khỏi nhau với pic sắc nhọn, hình dạng pic đối xứng, ít tổn kém dung môi và hóa chất so với phương pháp sắc ký lỏng hiệu năng cao đã công bố trước đó. Quy trình sử dụng kỹ thuật điện di mao quản vùng dựa trên sự khác biệt của tỷ lệ điện tích/kích thước (q/r) của các curcuminoid ở pH 10,8. Curcumin ở dạng enol có 3 nhóm -OH. Giá

trị hằng số phân ly pK_a của 3 proton dạng acid của curcumin (dạng H_2A^+ , HA , A_3^-) được xác định tương ứng là 7,3; 8,5 và 9,0 [1]. Khi sử dụng đệm borat pH 10,8 thì 3 nhóm -OH có khả năng chuyển thành $-O^-$ do $pH > pK_a$ nên curcumin mang điện âm (3-) [1]. Do có công thức cấu tạo khá tương tự như curcumin nên demethoxycurcumin và bisdemethoxycurcumin mang điện âm (3-) trong môi trường pH 10,8. Tuy nhiên, do kích thước của curcumin > demethoxycurcumin > bisdemethoxycurcumin nên curcumin bị hút về phía cực dương với vận tốc yếu nhất (q/r bé nhất). Kết hợp với dòng điện thẩm có vận tốc hướng ngược chiều về cực âm nên thứ tự các chất đến đầu dò đặt ở cực âm từ sớm đến muộn là curcumin, demethoxycurcumin, bisdemethoxycurcumin.

Điều kiện của kiểu tiêm LVSS

LVSS là một trong những kỹ thuật cô đặc mẫu trực tuyến ngay trên máy điện di mao quản nhằm thay thế cho việc xử lý cô đặc mẫu bên ngoài. Mẫu sẽ được tiêm vào cột với thể tích có thể lên đến 90% cột, sau đó áp một điện thế đảo cực (cực dương sẽ nằm về phía đầu dò) để hình thành dòng điện thẩm đóng vai trò như một bơm đẩy lùi chất phân tích và nền mẫu theo hướng từ phía đầu dò ngược ra lại đầu tiêm mẫu. Trong khi đó, các chất phân tích mang điện âm sẽ được hút theo hướng về cực dương phía đầu dò [2]. Kết quả là các curcuminoid mang điện âm được giữ lại trên cột tại ranh giới giữa vùng mẫu và vùng BGE, trong khi dung môi, chất mang điện dương và chất trung hòa sẽ bị đẩy ra khỏi cột nên mẫu sẽ được cô đặc lại. Để đạt được hiệu quả cho quá trình LVSS, đề tài đã khảo sát lựa chọn được các điều kiện nhằm đảm bảo được: thể tích mẫu được tiêm vào cột phù hợp để tránh bị quá tải; độ lớn điện thế đảo ở giai đoạn đẩy lùi phù hợp sao cho độ lớn tốc độ của chất phân tích mang điện âm hướng về cực dương vẫn lớn hơn tốc độ của dòng điện thẩm EOF hướng về phía cực âm để chúng vẫn được giữ lại trên cột, thời gian đẩy lùi phù hợp để không bị thất thoát chất phân tích; duy trì tồn tại ranh giới giữa vùng mẫu và vùng BGE để tránh doãng bằng vùng chất phân tích được cô đặc bằng cách tiêm thêm glycerin có độ nhớt cao vào giữa vùng mẫu và vùng BGE; đảm bảo độ chênh lệch độ dẫn điện giữa vùng mẫu và vùng BGE để tạo được ranh giới giúp thuận lợi quá trình xếp chồng nhưng vẫn đảm bảo tỷ lệ lớn các curcuminoid ở dạng mang điện âm bằng cách tiêm thêm một lượng nhỏ BGE vào vùng mẫu.

Kỹ thuật LVSS giúp làm tăng độ nhạy của phương pháp và giảm thời gian xử lý mẫu. Tuy nhiên, kỹ thuật này có nhược điểm là cần theo dõi dòng điện cẩn thận đến khi đạt đến 95% so với dòng điện ban đầu

để tránh thất thoát chất phân tích. Dòng điện này dễ thay đổi tùy thuộc vào độ ổn định của dung dịch BGE, cho nên cần kiểm tra lại dòng điện ban đầu và theo dõi lại thời gian vào mỗi ngày phân tích.

4.2. Thẩm định phương pháp đã xây dựng theo hướng dẫn ICH và AOAC

Phương pháp được thẩm định đạt các yêu cầu của ICH và AOAC. Sử dụng quy trình điện di kết hợp kiểu tiêm LVSS với giá trị LOQ đạt được là 0,0074 ppm gấp khoảng 94,6 lần so với sử dụng kiểu tiêm thể tích nhỏ tương ứng với 40 mBar - 5 giây chỉ đạt LOQ là 0,7 ppm và gấp khoảng 7,4 lần so với phương pháp HPLC đã được công bố với LOQ là 0,055 ppm [3]. Hiệu quả của kỹ thuật LVSS trong nghiên cứu này giúp định lượng được curcumin có hàm lượng nhỏ trong các mẫu tinh bột, ngoài ra còn làm nền tảng để phát triển các quy trình định lượng các chất có nồng độ nhỏ khác trong dịch sinh học như huyết tương, nước tiểu, ...

Phương pháp này bổ sung thêm một phương pháp mới vào các phương pháp để định lượng curcumin trong các mẫu tinh bột nghệ, đặc biệt là các mẫu có hàm lượng curcumin thấp. So với các phương pháp sắc ký lỏng cùng loại đầu dò UV-Vis, điện di mao quản sử dụng rất ít dung môi hóa chất do kích thước cột nhỏ nhưng lại đạt được giới hạn phát hiện nhỏ hơn do kết hợp kỹ thuật LVSS đồng thời giảm thời gian xử lý mẫu. Với kỹ thuật điện di mao quản đầu dò UV-Vis định lượng curcumin trong nước tiểu không sử dụng kỹ thuật LVSS chỉ đạt LOD là 0,247 ppm (không công bố LOQ) [6]. So với phương pháp đo quang phổ UV-Vis chỉ định lượng curcuminoid tổng, phương pháp này định lượng được riêng curcumin.

4.3. Ứng dụng quy trình đã xây dựng để định lượng curcumin trong một số mẫu tinh bột nghệ trên thị trường

Qua khảo sát các mẫu tinh bột nghệ trên thị trường cho thấy, hàm lượng % curcumin trong các mẫu tinh bột nghệ khá thấp và có sự khác biệt nhau. Hàm lượng curcumin trong 07 mẫu tinh bột nghệ biến thiên từ 0,0043 - 0,0154%. Ngoài ra, người sử dụng cũng như một số trang thông tin thường hay nhầm lẫn rằng tinh bột nghệ chứa curcumin nhiều hơn bột nghệ do nhầm lẫn khái niệm "tinh bột nghệ" sẽ chứa "tinh chất" nghệ nhiều hơn. Do đó, cần lựa chọn và hiểu đúng sản phẩm phù hợp để mang lại hiệu quả tốt nhất. Trong các mẫu sản phẩm mà nghiên cứu này phân tích, không có sản phẩm có hàm lượng quá nhỏ dưới LOQ so với phương pháp HPLC đã công bố là 0,0167 ppm [3]. Tuy nhiên, phương pháp này đã định lượng được các mẫu thử giả lập tại nồng độ LOQ là 0,0074 ppm trong phần thẩm định độ lặp lại tại LOQ.

5. KẾT LUẬN

Nghiên cứu đã xây dựng được phương pháp định lượng curcumin trong tinh bột nghệ bằng điện di mao quản sử dụng kỹ thuật cô đặc mẫu trực tuyến với kiểu tiêm LVSS có độ chính xác cao, độ đúng tốt,

khoảng tuyến tính phù hợp, độ chọn lọc cao, giới hạn phát hiện tốt. Phương pháp có thể sử dụng để định lượng được curcumin có hàm lượng nhỏ trong các mẫu tinh bột nghệ.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Nguyễn Thị Mạc Phương, Trần Thị Việt Hoa, Phan Thị Hoàng Anh, Lê Xuân Tiến. Tách và tinh chế các dẫn xuất curcuminoid trích từ củ nghệ vàng *Curcuma longa* L. Luận văn tốt nghiệp đại học Quốc gia thành phố Hồ Chí Minh. 2008.
2. McGrath. G., Smyth. W.F. Large-volume sample stacking of selected drugs of forensic significance by capillary electrophoresis. *J. Chromatogr. B.* 1996; 681(1):125 - 131.
3. Nguyễn Hữu Tiến, Lê Thị Bảo Trâm, Nguyễn Thị Như Ngọc, Phan Phước Thắng, Nguyễn Viết Khẩn. Định lượng Curcumin trong tinh bột nghệ và viên hoàn nghệ mật ong bằng sắc ký lỏng hiệu năng cao. *Tạp chí Y Dược học - Trường Đại học Y Dược Huế.* 2018; 8(4): 42 - 47.
4. Bộ Y Tế. Dược điển Việt Nam V. Nhà xuất bản Y học. 2017.
5. Kailong Yuan, Qianfeng Weng, Hongying Zhang, Jianhui Xiong, Guowang Xu. Application of capillary zone electrophoresis in the separation and determination of the curcuminoids in urine. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis.* 2005; 38(1): 133 - 138.
6. Hiserodt. R, Hartman. T. G., Ho. C. T., & Rosen. R. T. Characterization of powdered turmeric by liquid chromatography-mass spectrometry and gas chromatography-mass spectrometry. *Journal of chromatography A.* 1996; 740(1): 51 - 63.
7. Long. Y., Zhang. W., Wang. F., & Chen. Z. Simultaneous determination of three curcuminoids in *Curcuma longa* L, by high performance liquid chromatography coupled with electrochemical detection. *Journal of pharmaceutical analysis.* 2014; 4(5): 325 - 330.
8. International Conference on Harmonisation. Validation of Analytical Procedures: Text and methodology. ICH Secretariat. 2005.
9. Association of official analytical chemists (AOAC). Guidelines for Standard Method Performance Requirements. 2016; 1-18.