

## XÂY DỰNG VÀ THẨM ĐỊNH QUY TRÌNH ĐỊNH LƯỢNG ĐỒNG THỜI CURCUMIN I, II, III BẰNG HPLC–DAD

Lữ Thiên Phúc\*, Huỳnh Thị Mỹ Duyên, Lý Ngọc Hạnh, Lê Thị Minh Ngọc

Trường Đại học Y Dược Cần Thơ

\*Email: luthienphucpharma@yahoo.com.vn

### TÓM TẮT

**Đặt vấn đề:** Xây dựng và thẩm định quy trình định lượng đồng thời các hoạt chất curcumin, đặc biệt curcumin I trong viên nén nổi đạt độ tin cậy, không bị ảnh hưởng bởi sản phẩm phân hủy bằng kỹ thuật sắc ký lỏng hiệu năng cao đầu dò dây diod quang, hiện chưa có công trình công bố, là một nhu cầu cấp thiết. **Mục tiêu nghiên cứu:** Xây dựng và thẩm định quy trình định lượng đồng thời 3 curcumin I, II, III trong viên nén nổi curcumin bằng HPLC-DAD. **Đối tượng và Phương pháp nghiên cứu:** viên nén nổi curcumin 100mg; phương pháp thẩm định quy trình định lượng đồng thời 3 curcumin I, II, III trong viên nén nổi bằng hệ thống HPLC đầu dò DAD theo hướng dẫn của ICH và đánh giá theo Sổ tay đăng ký thuốc. **Kết quả:** Phương pháp HPLC với đầu dò DAD, cột Phenomenex Gemini C18 pha đảo, pha động gồm Acetonitril:acid phosphoric pH 3,0 (50:50), nhiệt độ cột 50 °C, tốc độ dòng 1 mL/phút, bước sóng phát hiện 428 nm. Khoảng nồng độ tuyến tính 2–20 µg/mL, phương trình hồi qui của curcumin I là  $y = 286257x$  với  $R^2 = 0,9988$ ,  $P < 0,005$ ; curcumin II là  $y = 50235x$  với  $R^2 = 0,9943$ ,  $P < 0,005$  và curcumin III là  $y = 9223,7x$  với  $R^2 = 0,9984$ ,  $P < 0,005$ . Phương pháp cho thấy có sự tuyến tính trong khoảng nồng độ khảo sát, đạt độ chính xác và độ đúng. **Kết luận:** Phương pháp HPLC chính xác, có thể được áp dụng để định lượng đồng thời 3 curcumin I, II, III trong viên nén nổi.

**Từ khóa:** Curcumin I, II, III; HPLC; viên nén nổi.

### ABSTRACT

## VALIDATION OF QUANTITATIVE PROCEDURE FOR DETERMINATION

### CURCUMIN I, II, III BY HPLC–DAD

Lu Thien Phuc\*, Huynh Thi My Duyen, Ly Ngoc Hanh, Le Thi Minh Ngoc

Cantho University of Medicine and Pharmacy

**Background:** The aim of this study applied to identification, control of impurities and assay procedures is included, especially curcumin I. **Objectives:** validation of quantitative procedure for determination three curcumin I, II, III in floating tablets by HPLC-DAD to demonstrate that it is suitable for its intended purpose. **Materials and Methods:** curcumin tablet 100mg; A reversed-phase high performance liquid chromatographic method (HPLC) was validated for the determination of curcumin in floating tablets following ICH guidelines. **Results:** The HPLC method depends upon using a reversed-phase Phenomenex Gemini C18 column at 50°C with a mobile phase consisting of Acetonitrile:acid phosphoric pH 3,0 (50:50, v/v) at a flow rate 1mL.min<sup>-1</sup>. Quantitation was achieved by DAD detection at 428 nm. Calibration curve was linear over the concentration range 2-20 µg/mL ( $r > 0.999$ ,  $P < 0,005$ ). The HPLC method showed good linearity, precision and accuracy. **Conclusion:** The HPLC method was successfully applied to the assay of curcumin I, II, III in floating tablets. The procedure was rapid, simple and suitable for quality control applications.

**Keywords:** Curcumin I, II, III; HPLC; floating tablets.

### I. ĐẶT VẤN ĐỀ

Curcumin trong củ Nghệ vàng đã được chứng minh có khả năng kháng ung thư [4], [5], [6], [7] trong đó curcumin I là có hoạt tính sinh học cao nhất. Ngày nay, nhiều

công trình nghiên cứu phát triển dạng bào chế mới cho curcumin. Trong đó, dạng thuốc nổi trong dạ dày mang lại hiệu quả cao và đang rất được quan tâm[8]. Tuy nhiên, chưa có công trình nghiên cứu công bố định lượng đồng thời 3 curcumin để đánh giá chính xác hàm lượng của thuốc. Chính vì vậy, nghiên cứu tiến hành xây dựng và thẩm định quy trình định lượng curcumin I, II, III trong viên nén nổi trên hệ thống HPLC đầu dò DAD.

## II. ĐỐI TƯỢNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

### 2.1. Đối tượng nghiên cứu

Viên nén nổi chứa phức chất curcumin (tương ứng 100 mg curcumin) được nghiên cứu và bào chế bởi Bộ môn Bào chế, khoa Dược, trường Đại học Y Dược Cần Thơ.

Chất chuẩn: Curcumin được cung cấp bởi Viện Kiểm nghiệm Tp. Hồ Chí Minh, hàm lượng 92,16%. Dung môi, hóa chất: Acetonitril và acid phosphoric (Merck, Đức) đạt tiêu chuẩn dùng trong HPLC và methanol (Xilong, Trung Quốc) đạt tiêu chuẩn dược dụng.

### 2.2. Phương pháp nghiên cứu

#### 2.2.1. Điều kiện sắc ký

Máy sắc ký lỏng hiệu năng cao Hitachi L-2000 với đầu dò DAD.

Cột sắc ký : Cột Phenomenex Germini RP<sub>18</sub> (150 mm × 4,6 mm, 5 μm).

Hệ pha động : ACN : acid phosphoric pH 3,0 (50 : 50).

Thể tích tiêm mẫu : 10 μL.

Nhiệt độ cột : 50 °C.

Bước sóng phát hiện : 428 nm.

Tốc độ dòng : 1 mL/phút.

#### 2.2.2. Chuẩn bị mẫu

*Mẫu chuẩn:* Chuẩn curcumin được pha trong MeOH thành dung dịch chuẩn gốc có nồng độ 200 μg/mL. Pha loãng dung dịch chuẩn gốc thành dung dịch chuẩn làm việc có nồng độ 10 μg/mL. Lọc qua màng lọc 0,45 μm.

*Mẫu thử:* Cân 20 viên nén nổi curcumin, xác định khối lượng trung bình của viên, nghiền thành bột mịn và trộn đều. Cân chính xác một lượng bột thuốc pha trong MeOH để được dung dịch có nồng độ 200 μg/mL. Tiếp tục pha loãng để được dung dịch thử làm việc có nồng độ khoảng 10 μg/mL. Lọc qua màng lọc 0,45 μm.

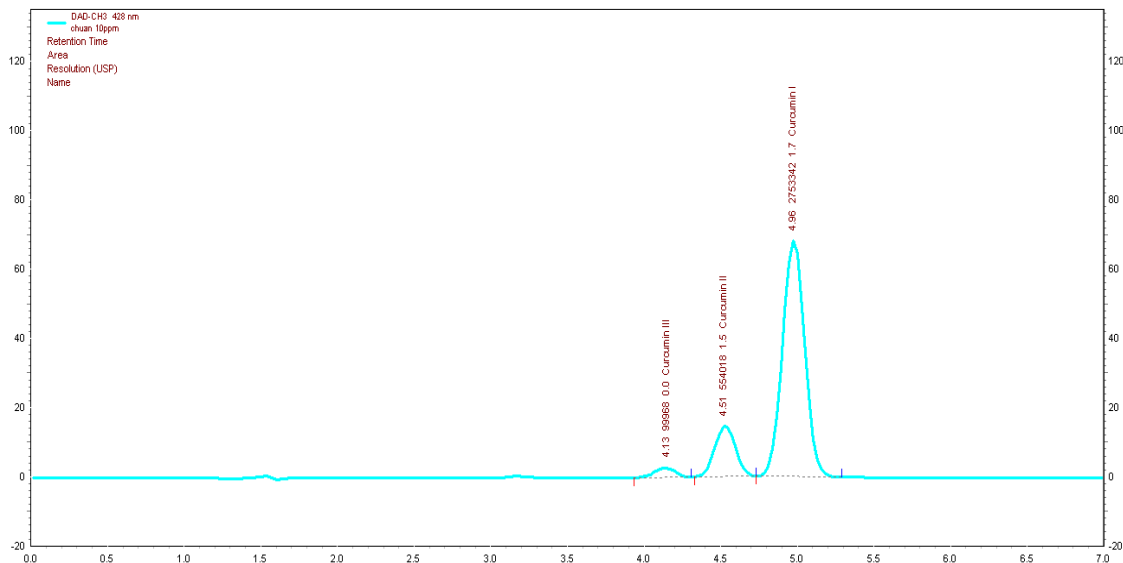
#### 2.2.3. Xây dựng và thẩm định quy trình định lượng

Khảo sát và thẩm định quy trình phân tích theo hướng dẫn Q2(R1) tháng 11-2005 của ICH (The International Conference on Harmonisation) [2],[3] và đánh giá theo Sổ tay hướng dẫn đăng ký thuốc-Cục Quản Lý Dược Việt Nam [1]. Tiến hành thẩm định các yêu cầu về độ đặc hiệu, tính tuyến tính, khoảng xác định, độ đúng và độ chính xác.

## III. KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU

### 3.1. Xác định tính tương thích hệ thống

Sắc ký đồ mẫu chuẩn ở hình 1 cho thấy 3 đỉnh curcumin I, curcumin II và curcumin III (*hình 1*).



Hình 1. Sắc ký đồ mẫu chuẩn curcumin

Kết quả cho thấy, các sắc ký đồ tách nhau hoàn toàn với hệ số phân giải  $R_s \geq 1,5$ ;

Bảng 1. Kết quả khảo sát tính tương thích hệ thống

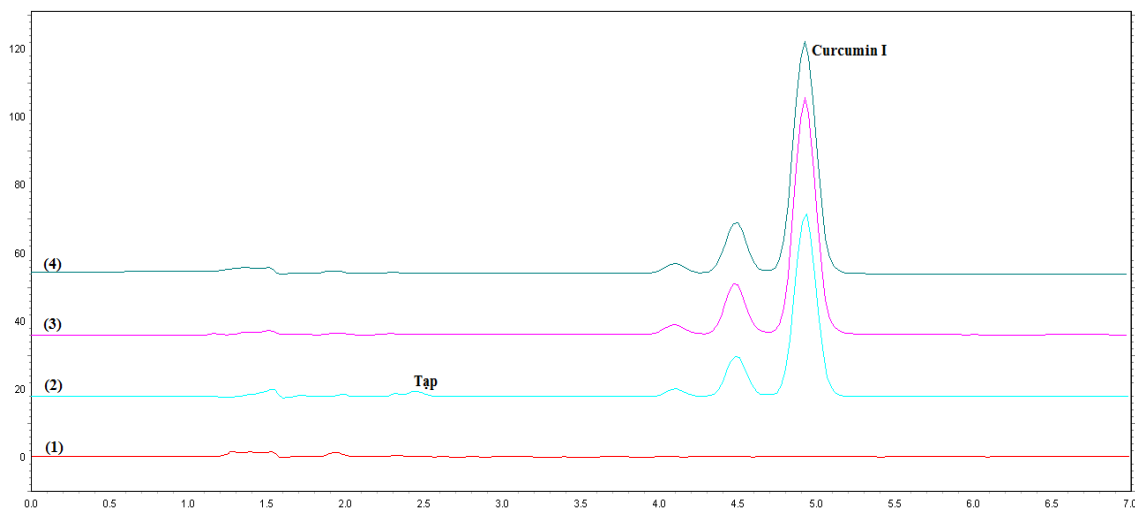
		Tính tương thích hệ thống trên mẫu chuẩn (n = 6)					
		$t_R$ (phút)	S (mV*s)	N	As	Rs	k'
Curcumin I	$\bar{X}$	4,93	2819748,83	5085,17	1,05	1,69	2,24
	RSD (%)	0,00	1,30	0,86	1,40	0,48	0,00
Curcumin II	$\bar{X}$	4,48	522541,67	5269,83	1,06	1,60	1,95
	RSD (%)	0,00	1,99	1,63	1,58	1,17	0,00
Curcumin III	$\bar{X}$	4,12	82707,17	5088,83	1,03	-	1,71
	RSD (%)	0,27	1,35	1,19	1,02	-	0,64
		Tính tương thích hệ thống trên mẫu thử (n = 6)					
		$t_R$ (phút)	S (mV*s)	N	As	Rs	k'
Curcumin I	$\bar{X}$	4,91	2880735,17	5335,50	1,08	1,68	2,23
	RSD (%)	0,19	0,99	1,56	0,95	1,11	0,18
Curcumin II	$\bar{X}$	4,47	524714,17	5108,83	1,05	1,60	1,94
	RSD (%)	0,23	1,39	0,61	1,12	1,65	0,53
Curcumin III	$\bar{X}$	4,11	84957,67	5087,67	1,04	-	1,70
	RSD (%)	0,20	1,43	0,89	1,01	-	0,48

Kết quả RSD của các thông số sắc ký ứng với mẫu chuẩn và mẫu thử khi tiêm lặp lại 6 lần liên tiếp đều nhỏ hơn 2% trình bày như ở bảng 1. Như vậy, quy trình đạt tính tương thích hệ thống.

### 3.2. Thẩm định quy trình định lượng

#### 3.2.1. Độ đặc hiệu

Phân tích đồng thời mẫu chuẩn, mẫu thử, mẫu trắng, mẫu phân hủy trong đệm pH 8 ở hình 2.

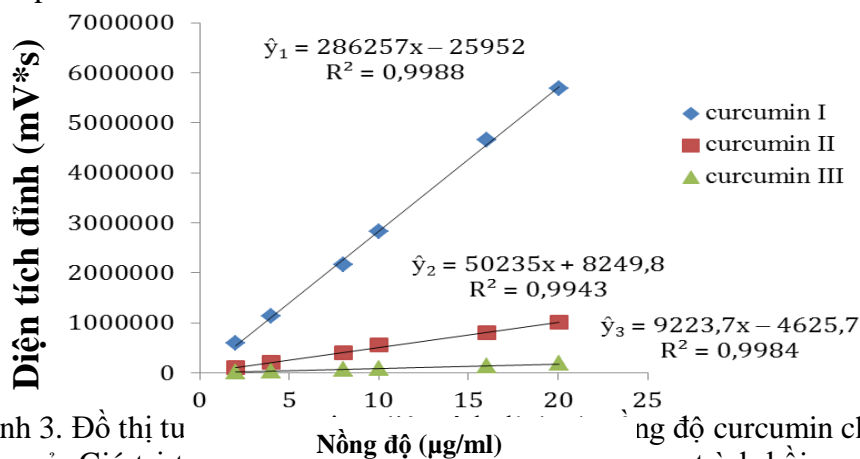


Hình 2. Kết quả overlay mẫu trắng (1), mẫu phân hủy pH 8 (2), mẫu chuẩn (3) và mẫu thử viên nén nổi curcumin 100mg (4) ở chế độ max plot

Kết quả: Thời gian lưu của pic curcumin trong mẫu chuẩn và mẫu thử như nhau. Mẫu trắng (tá dược pha trong MeOH và pha động) không xuất hiện pic ở trong khoảng thời gian lưu tương ứng với thời gian lưu của pic curcumin. Đồng thời, pic tạp ở các mẫu phân hủy tách hoàn toàn khỏi pic curcumin I, II, III. Độ tinh khiết pic curcumin: I, II, III trong mẫu thử viên nén nổi curcumin 100mg và mẫu phân hủy đều bằng 100%. Hệ số chõng phổ UV của pic curcumin trong sắc ký đồ mẫu thử và mẫu chuẩn bằng 1,0. Như vậy, quy trình đạt độ đạt hiệu.

### 3.2.2. Tính tuyến tính

Phân tích sắc ký 6 mẫu chuẩn curcumin có nồng độ từ 2–20 µg/mL. Trong khoảng nồng độ khảo sát, có mối liên hệ tuyến tính giữa diện tích pic curcumin I, II, III và nồng độ chất phân tích.



Hình 3. Đồ thị tu  
Kết quả: Giá trị t

ng độ curcumin chuẩn  
ong trình hồi quy không có ý  
nghĩa thống kê, phương trình noi quy của curcumin I là  $y = 286257x$  với  $R^2 = 0,9988$ ; curcumin II là  $\hat{y} = 50235x$  với  $R^2 = 0,9943$  và curcumin III là  $\hat{y} = 9223,7x$  với  $R^2 = 0,9984$ , có ý nghĩa trong khoảng nồng độ [2,01–20,1] µg/mL.

### 3.2.3. Độ đúng và độ chính xác

Tỷ lệ phục hồi ở mỗi nồng độ riêng biệt và tỷ lệ hồi phục trung bình đều nằm trong giới hạn yêu cầu 98,0% –102,0% theo hướng dẫn của Cục Quản lý Dược Việt Nam–Sở tay đăng ký thuốc. Như vậy, quy trình đạt độ đúng.

Bảng 2. Kết quả thẩm định độ đúng và độ chính xác

		Độ đúng và độ chính xác (n = 9)				
		Mẫu				
	Giá trị thống kê	80%	100%	120%	Trung bình	Khoảng tin cậy
Curcumin I	Tỷ lệ phục hồi (%)	99,22	101,16	101,07	100,48	100,48 ± 0,89%
	RSD (%)	0,67	0,85	1,02	1,20	
Curcumin II	Tỷ lệ phục hồi (%)	99,63	99,43	100,73	99,93	99,93 ± 1,04%
	RSD (%)	0,78	1,01	0,42	0,90	
Curcumin III	Tỷ lệ phục hồi (%)	99,14	99,95	99,14	99,41	99,41 ± 0,72%
	RSD (%)	1,54	0,75	0,38	0,97	

Kết quả: RSD hàm lượng curcumin I, II, III trong 9 mẫu ≤ 2%, đạt giới hạn theo hướng dẫn của Sở tay đăng ký thuốc–Cục Quản lý Dược Việt Nam. Vậy, quy trình đạt độ lặp lại .

Thẩm định trên cùng mẫu đồng nhất, 2 kiểm nghiệm viên phân tích trên 2 hệ thống HPLC khác nhau, trong cùng phòng thí nghiệm

Bảng 3. Kết quả thẩm định độ chính xác trung gian

		Độ chính xác trung gian (n = 6)		
		Kiểm nghiệm viên 1	Kiểm nghiệm viên 2	Trung bình
Curcumin I	Hàm lượng (%)	99,47	99,44	99,46
	RSD (%)	0,87	0,63	0,73
Curcumin II	Hàm lượng (%)	99,74	99,66	99,70
	RSD (%)	1,15	1,12	1,08
Curcumin III	Hàm lượng (%)	100,19	100,76	100,48
	RSD (%)	1,47	0,82	1,17

Kết quả: sự khác biệt không có ý nghĩa thống kê như được trình ở bảng 3. Chứng tỏ quy trình có tính ổn định có thể áp dụng cho các thiết bị phân tích khác nhau và trên các kiểm nghiệm viên khác nhau.

### 3.2.4. Khoảng tuyến tính

Kết quả đánh giá độ đúng và độ chính xác ở các mức nồng độ 80%, 100% và 120% đều đạt theo quy định. Bên cạnh đó, trong khoảng nồng độ từ 80%–120% so với hàm lượng ghi trên nhãn cũng nằm trong miền giá trị nên vẫn đảm bảo được tính tuyến tính. Như vậy, trong khoảng nồng độ từ 80%–120% so với hàm lượng ghi trên nhãn quy trình phân tích vẫn đảm bảo được độ đúng, độ chính xác và tính tuyến tính hay nói cách khác khoảng tuyến tính của quy trình phân tích là từ 80%–120% so với hàm lượng ghi trên nhãn đáp ứng theo yêu cầu của Sở tay đăng ký thuốc–Cục Quản lý Dược Việt Nam.

#### IV. BÀN LUẬN

Nghiên cứu tiến hành xây dựng và thẩm định quy trình định lượng đồng thời 3 curcumin I, II, III trong viên nén nổi curcumin 100mg trên hệ thống máy HPLC Hitachi L-2000 với đầu dò DAD chứng minh các tạp chất phân hủy (nếu có) không ảnh hưởng kết quả định lượng curcumin trong viên nén nổi [3],[8],[9]. Nghiên cứu cho thấy, quy trình đạt tính tương thích hệ thống, độ đặc hiệu, độ tuyến tính, khoảng xác định, độ đúng và độ chính xác. Đồng thời các yếu tố như dung môi pha mẫu MeOH, pha động, tá dược, tạp chất phân hủy không ảnh hưởng đến kết quả định lượng curcumin I, II, III. Nghiên cứu đã tiến hành phân hủy curcumin trong điều kiện pH 8 theo nghiên cứu của Ying-Jan Wang và cộng sự [10] cho thấy ở pH này curcumin phân hủy nhanh nhất. Bên cạnh đó, nghiên cứu tiến hành nhiều mẫu phân hủy trong điều kiện khác nhau như: ánh sáng, nhiệt độ 80 °C, NaOH 1 N, HCl 1 N, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 30%, các pic tạp tách hoàn toàn pic curcumin và độ tinh khiết pic curcumin I, II và III là 100%. Đối chiếu nghiên cứu của Ying-Jan Wang và cộng sự [10], đã nhận định trans-6-(4-hydroxy-3-methoxyphenyl)-2,4-dioxo-5-hexenal là sản phẩm thoái hóa chính; vanillin, acid ferulic, feruloylmethan là sản phẩm thoái hóa nhỏ và lượng vanillin tăng theo thời gian khảo sát. Quy trình cho thấy curcumin I có nồng độ cao nhất phù hợp với tác dụng sinh học của thuốc.

#### V. KẾT LUẬN

Kết quả thẩm định quy trình định lượng đồng thời 3 curcumin I, II, III trong viên nén nổi curcumin 100mg theo ICH và đánh giá theo Sổ tay đăng ký thuốc-Cục Quản lý Dược Việt Nam cho thấy quy trình đạt tính tương thích với hệ thống sắc ký, đảm bảo tính chọn lọc đặc hiệu, có độ đúng trong khoảng 98%–102%, độ chính xác cao (RSD < 2%) và đạt độ chính xác trung gian khác người, khác hệ thống máy.

#### TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Bộ Y tế, 2013. *Sổ tay hướng dẫn đăng ký thuốc-phụ lục 8: Thẩm định phương pháp phân tích*.
2. ICH (2005), *Q1A(R2) Stability testing of new drug substances and products*.
3. ICH, 2005. *Q2(R1) Validation of analysis procedures: Text and methodology*.
4. Glen R,B, Irving (2011), "Curcumin: the potential for efficacy in gastrointestinal diseases", *Best Practice & Research Clinical Gastroenterology*, 25, pp, 519–534
5. Julie S. Jurenka, MT(ASCP), 2009. Anti-inflammatory Properties of Curcumin, a Major Constituent of Curcuma longa: A Review of Preclinical and Clinical Research. *Alternative Medicine Review*, 2, pp. 141–153.
6. Rajesh L. Thangapazham, Anuj Sharma, and Radha K. Maheshwari, 2006. Multiple molecular targets in cancer chemoprevention by curcumin. *The AAPS Journal*, 8, pp. E443-E449.
7. Shishir Shishodia, Madan M, Chaturvedi, Bharat B, Aggarwal (2007), "Role of Curcumin in cancer therapy", *Current Problems in Cancer*, 31(4), pp, 243–305.
8. Shishu, Neeta Gupta and Nidhi Aggarwal (2008), "Bioavailability enhancement and targeting of stomach tumors using astro-retentive floating drug delivery system of Curcumin-A technical note", *AAPS PharmSciTech*, 9(3), pp, 810–813.
9. WHO (2009), *Stability testing of active pharmaceutical ingredients and finished pharmaceutical product*

10. Ying-Jan Wang, Min-Hsiung Pan, Ann-Lii Cheng 1997. Stability of curcumin in buffer solutions and characterization of its degradation products. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 15, pp. 1867–1876.

(Ngày nhận bài: 04/07/2019- Ngày duyệt đăng: 24/08/2019)

---