

PHƯƠNG PHÁP PHÂN TÍCH NHANH HÀM LƯỢNG CURCUMIN, DEMETHOXYCURCUMIN VÀ BISDEMETHOXYCURCUMIN TỪ CỦ NGHỆ BẰNG HỆ THỐNG HPLC 1260 AGILENT

METHODOLOGY FOR QUICK ANALYSIS OF CURCUMIN, DEMETHOXYCURCUMIN VÀ BISDEMETHOXYCURCUMIN FROM TURMERIC BY AGILENT 1260 HPLC SYSTEM

Nguyễn Phi Hùng^{1,2*}, Nguyễn Anh Tuấn³, Đinh Thị Tú^{1,2}, Tô Đạo Cường⁴, Hoàng Thị Phương⁵, Đặng Ngọc Quang³, Đỗ Thị Thúy¹, Vũ Thị Hà¹, Bùi Thị Thực^{1,2}, Trịnh Thị Thu Hà¹

¹Viện Hóa học các hợp chất thiên nhiên, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam, Việt Nam

²Học viện Khoa học và Công nghệ, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam, Việt Nam

³Trường Đại học Sư phạm Hà Nội, Việt Nam

⁴Viện Nghiên cứu Nano, Trường Đại học Phenikaa, Việt Nam

⁵Viện Hóa học, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam, Việt Nam

*Tác giả liên hệ / Corresponding author: nguyenvphihung1002@gmail.com

(Nhận bài / Received: 27/02/2023; Sửa bài / Revised: 13/4/2023; Chấp nhận đăng / Accepted: 19/4/2023)

Tóm tắt – Trong nghiên cứu này, phương pháp phân tích curcumin (1), demethoxycurcumin (2) và bisdemethoxycurcumin (3) đơn giản, dễ thực hiện với độ đặc hiệu, độ tin cậy cao bằng hệ thống sắc ký lỏng hiệu năng cao (HPLC) đã được xây dựng. Kết quả thực nghiệm cho thấy, hệ số tương quan R^2 của ba hợp chất đều lớn hơn 0,9999, độ thu hồi trung bình ở mỗi mẫu đều đạt yêu cầu > 97% (98,60; 98,24 và 100,49% tương ứng với hợp chất 1–3), độ lệch chuẩn tương đối đều nhỏ hơn 1% (0,629 – 0,750 đối với thời gian lưu; 0,428 – 0,756 đối với diện tích pic). Trong khi đó, giá trị giới hạn phát hiện (LOD) và giới hạn định lượng (LOQ) của ba hợp chất đều ở mức thấp với các giá trị lần lượt trong khoảng 0,04 – 1,05 và 0,35 – 2,50 $\mu\text{g/mL}$, cho thấy phương pháp xây dựng được có độ nhạy cao theo chuẩn của Hiệp hội các nhà hoá học phân tích chính thống (AOAC). Phương pháp đã được áp dụng để phân tích hàm lượng ba hợp chất chính curcumin (1–3) trong một số mẫu nghệ khác nhau thu thập tại Việt Nam.

Từ khóa - Curcumin; sắc ký lỏng hiệu năng cao (HPLC); Demethoxycurcumin; Bisdemethoxycurcumin; cây nghệ; *Curcuma longa*

1. Đặt vấn đề

Nghệ vàng (*Curcuma longa* L.) là một loài thực vật thuộc họ Gừng (Zingiberaceae), được sử dụng làm gia vị và thuốc nhuộm trong thực phẩm, giấy, len, đồng thời là một vị thuốc thảo dược truyền thống trong dân gian, thường được sử dụng với công dụng chống viêm, giảm đau, hỗ trợ tiêu hóa và làm đẹp [1]. Thành phần hóa học chủ yếu là các hợp chất phenolic và terpenoit, bao gồm các hợp chất có khung cấu trúc diarylheptanoid (curcuminoids), phenylpropene, monoterpen, và sesquiterpen. Curcuminoids và tinh dầu là những thành phần hóa học chính tạo nên hoạt tính sinh học của nghệ. Nhiều hoạt tính sinh học cũng đã được khai thác như chống oxy hóa, chống ung thư, kháng khuẩn, diệt côn trùng, chống viêm loét và bảo vệ dạ dày. Vì thế, ngày nay nghệ được nghiên cứu và

Abstract - A high performance liquid chromatography (HPLC) method has been built for qualitative and quantitative analysis of curcumin (1), demethoxycurcumin (2) and bisdemethoxycurcumin (3) with specificity and high reliability. Experimental results show that the correlation coefficient R^2 of compounds (1–3) is greater than 0.9999, the average recovery in each sample is greater than 97% (with 98.60; 98.24, and 100.49% for compounds 1–3, respectively), the RSD values are all less than 1% (0.629 to 0.750 for retention time; 0.428 to 0.756 for peak area). Meanwhile, Limit of Detection (LOD) and Limit of Quantification (LOQ) values of compounds 1–3 are low with values in the range of 0.04 – 1.05 $\mu\text{g/mL}$ and 0.35 – 2.50 $\mu\text{g/mL}$, respectively, indicating the method is built with high sensitivity according to Association of Official Analytical Chemists (AOAC) standard. The method was applied to analyze the content of three curcumins (1–3) in a number of different turmeric samples collected in Vietnam.

Key words - Curcumin; high performance liquid chromatography (HPLC); Demethoxycurcumin; Bisdemethoxycurcumin; Turmeric; *Curcuma longa*

phát triển dưới dạng thực phẩm bảo vệ sức khỏe và được sử dụng nhiều [2-6].

Curcuminoid là nhóm chất tự nhiên được tách chiết từ củ nghệ, là thành phần chính tạo nên màu vàng-đỏ của nghệ và các sản phẩm từ nghệ, bao gồm ba hợp chất chính là curcumin (1) (hay còn gọi là curcumin A hoặc curcumin I), demethoxycurcumin (2) (curcumin B hay curcumin II) và bisdemethoxycurcumin (curcumin C hay curcumin III). Trong số ba hợp chất này thì curcumin (1) thường chiếm hàm lượng cao nhất [7] (Hình 1).

Các hợp chất curcumin (1–3) thường tồn tại ở dạng bột, màu vàng-đỏ, không mùi, kém bền với ánh sáng trực tiếp. Curcumin tan trong chất béo, ethanol, methanol, dichlorormethane, acetone và hầu như không tan trong nước. Hoạt tính sinh học nổi trội của chúng là chống oxy hóa,

¹ Institute of Natural Products Chemistry, Vietnam Academy of Science and Technology (VAST) (Phi-Hung Nguyen, Thi-Tu Dinh, Thi-Thuy Do, Thi-Ha Vu, Thi-Thuc Bui, Thi-Thu-Ha Trinh)

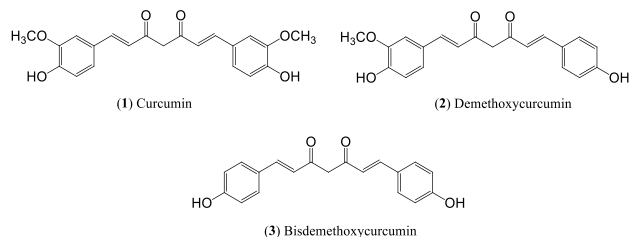
² Graduate University of Science and Technology, Vietnam Academy of Science and Technology (VAST) (Phi-Hung Nguyen, Thi-Tu Dinh, Thi-Thuc Bui)

³ Hanoi National University of Education (Anh-Tuan Nguyen, Dang Ngọc Quang)

⁴ Nano Institute (PHENA), Phenikaa University (Dao-Cuong To)

⁵ Institute of Chemistry, Vietnam Academy of Science and Technology (VAST) (Thi-Phuong Hoang)

kháng viêm, kháng khuẩn, kháng nấm và chống ung thư. Ngoài ra, curcumin khi kết hợp với một số dược liệu khác cho tác dụng phục hồi sức khỏe phụ nữ sau sinh, chống loét dạ dày – tá tràng; đồng thời được sử dụng trong một số loại mỹ phẩm làm đẹp, giảm thâm nám trên da [8]. Đặc biệt, một số hoạt tính sinh học của các hợp chất curcumin được tăng lên gấp nhiều lần, thậm chí hàng trăm lần khi kết hợp cùng với hoạt chất khác-chất có tác dụng hiệp lực.



Hình 1. Cấu trúc hóa học của ba hợp chất curcumins (1–3) từ cây nghệ (*C. longa*)

Một số phương pháp được sử dụng phổ biến để định tính, định lượng curcumins như phương pháp quang phổ hấp thụ (UV-Vis) [9], phương pháp TLC [10], điện di mao quản và HPLC [11]. Trong đó, HPLC là kỹ thuật được sử dụng nhiều nhất để phân tích curcumins với độ chính xác cao, dễ dàng áp dụng và triển khai các kỹ thuật. Nhiều nghiên cứu đã được thực hiện trong đó sử dụng các loại dung môi như THF, axit citric, đệm photphat (KH_2PO_4) thường được sử dụng [12,13]. Tuy nhiên, trên thực tế, việc áp dụng phương pháp và sử dụng lâu dài các loại dung môi này sẽ dẫn tới việc làm giảm tuổi thọ các thiết bị của hệ thống HPLC như cột sắc ký (do dung môi chạy qua cột gây nên hiện tượng xáo trộn các hạt silica gel, bắt hoạt các hạt, gây nên tắc cột, phá hủy cấu trúc của cột, ảnh hưởng đến kết quả sắc ký), ảnh hưởng đến các hệ thống đường ống dẫn, thiết bị gioăng của hệ thống bơm, lâu dài dẫn đến phá hủy toàn bộ hệ thống máy. Do vậy, việc nghiên cứu tìm ra các phương pháp mới, áp dụng các điều kiện tối ưu (hệ dung môi, thời gian vận hành máy, qui trình xử lý...) giúp rút ngắn được thời gian phân tích, giảm thiểu tác hại đối với hệ thống máy móc, thiết bị (HPLC) và mang lại hiệu quả phân tích cao vẫn là lựa chọn tốt và cần được tiếp tục nghiên cứu, áp dụng. Do đó, nhóm tác giả đã triển khai nghiên cứu này với mục tiêu lựa chọn được điều kiện sắc ký tối ưu áp dụng trong phân tích định tính và định lượng các hợp chất curcumins (1–3) trên một số đối tượng cụ thể là các mẫu nghệ thu thập ở các vùng khác nhau. Trong bài báo cáo này, nhóm tác giả trình bày về các kết quả cụ thể thu được từ nghiên cứu.

2. Vật liệu và thiết bị nghiên cứu

2.1. Vật liệu nghiên cứu

Chất chuẩn curcumin (1) 99,56% (SKS: WS.0118341.01), demethoxycurcumin (2) $\geq 98\%$ (CAS: 22608-11-3), và bisdemethoxycurcumin (3) $\geq 98\%$ (C12221958) cung cấp bởi Viện kiểm nghiệm thuốc Trung ương. Mẫu thử là các mẫu nguyên liệu củ nghệ được thu thập tại các vùng khác nhau ở Việt Nam, cụ thể: mẫu nghệ Bọ cạp (kí hiệu BC, thu thập tại Côn Sơn, tỉnh Hải Dương), mẫu Nghệ đen (kí hiệu ND, thu thập tại Tp. Thái Nguyên, tỉnh Thái Nguyên), mẫu cây Khỏe (kí hiệu CK, thu thập tại huyện Kbang, tỉnh Gia Lai) và mẫu Nghệ vàng (kí hiệu CL, thu thập tại tỉnh Bắc Cạn). Mẫu thực vật theo kí hiệu được

lưu giữ tại phòng Phân tích hóa học, Viện Hóa học các hợp chất thiên nhiên, Viện Hàn lâm KH&CN Việt Nam.

2.2. Thiết bị nghiên cứu

Hệ thống máy sắc kí lỏng hiệu năng cao - HPLC (Agilent Technologies 1260 series); Cột sắc ký Eclipse XDB-C₁₈ (150 x 4,6 mm, 5 μm) và cột bảo vệ XDB-C₁₈ của hãng Agilent; Cân điện tử (Max 220 g, $d = 10^{-4}$ g), model: Practum 224-1S, Satorius, Germany; Bể rung siêu âm, model: Elmasonic S100 H, Germany; Màng lọc PTFE 0,22 μm , Alain; Máy ly tâm 13500 rpm, Daihan Scientific, Korean; Hệ thống cất quay chân không của Eyela SB-1300, Japan. TLC sử dụng loại bản kính trắng sẵn của Merck (Kieselgel 60F₂₅₄ độ dày 0,25 mm; kích thước 20 x 20 cm; Art.5554). Dung môi acetonitril (ACN), methanol (MeOH) và nước cất loại dùng cho phân tích và chạy HPLC của hãng Fisher Scientific, Hàn Quốc. Dung dịch đệm fomic acid (Fa) của Merck, Germany. Các loại dung môi sử dụng trong phân tích như acetone, ethanol, diclomethan, hay methanol đều là loại phân tích có độ tinh sạch cao $\geq 98\%$.

2.3. Phương pháp nghiên cứu

2.3.1. Khảo sát tỷ lệ dung môi pha động trên hệ HPLC

Chuẩn bị mẫu chuẩn: Cân chính xác 1,0 mg (bằng cân phân tích có độ chính xác 4 số sau dấu phẩy) các hợp chất curcumin (1), hợp chất demethoxycurcumin (2) và bisdemethoxycurcumin (3) đối chiếu, hòa tan với 2,0 mL dung môi MeOH tạo dung dịch có nồng độ 500 $\mu\text{g/mL}$ (ppm). Mẫu được lọc qua màng lọc 0,22 μm trước khi bơm vào hệ thống.

Hệ dung môi được tiến hành khảo sát bao gồm 3 hệ với điều kiện như sau: Hệ số (1): ACN – H₂O + 0,1% Fa = 50 – 50 (tỉ lệ: thể tích/thể tích); Hệ số (2): ACN – MeOH – H₂O + 0,1% Fa = 25 – 35 – 40 (tỉ lệ: thể tích/thể tích); Hệ số (3): MeOH – H₂O + 0,1% Fa = 50 – 50 (tỉ lệ: thể tích/thể tích).

2.3.2. Khảo sát dung môi chiết mẫu

Mẫu dược liệu được chiết siêu âm với dung môi ethanol, ethylacetate (EtOAc), và acetone.

2.3.3. Khảo sát thời gian chiết mẫu

Mẫu dược liệu được chiết bằng phương pháp siêu âm, sử dụng dung môi đã lựa chọn được từ trước đó. Các điều kiện chiết khác tương tự như Mục 2.3.2. Sau khi lựa chọn được dung môi chiết mẫu, tiến hành khảo sát thời gian chiết siêu âm với các mốc thời gian: 30; 40; 50; 60 phút.

2.3.4. Định tính bằng TLC

Tiến hành chạy TLC để so sánh giữa ba hợp chất curcumin (1), demethoxycurcumin (2) và bisdemethoxycurcumin (3) với dịch chiết từ mẫu nguyên liệu củ nghệ vàng. Lựa chọn hệ dung môi triển khai để thu được sắc ký đồ tốt nhất. Sau khi tiến hành chạy, bản mỏng được đem đi soi dưới đèn tử ngoại (UV) các vết chất sẽ hiện lên dưới bước sóng 254 nm và 365 nm; rồi phun thuốc thử bằng dung dịch H₂SO₄ 10%, tiến hành đốt trên bếp nhiệt và quan sát các vết màu có trên bản mỏng.

Các bước tiến hành như sau: Với các mẫu thử: Cân khoảng 1,0 gam bột củ nghệ vàng vào bình tam giác 50 mL, thêm 25 mL methanol, siêu âm trong 40 phút. Lọc qua giấy lọc thu được dịch chiết. Đuổi dung môi trên hệ thống cô quay chân không, cô dịch lọc còn khoảng 2 mL được dịch

chấm sắc ký. Với các mẫu đối chiếu (mẫu chất chuẩn): Cân khoảng 1,0 mg mỗi chất chuẩn và hòa tan trong 1,0 mL methanol. Tiến hành triển khai TLC với hệ dung môi triển khai CH_2Cl_2 : acetone = 20: 1 (tỉ lệ thể tích/ thể tích).

2.4. Thẩm định phương pháp

Xây dựng phương pháp trên hệ thống máy HPLC, tiến hành thẩm định các thông số về độ đặc hiệu, độ lặp lại, tuyến tính, độ thu hồi và giới hạn phát hiện (LOD), giới hạn định lượng (LOQ).

2.4.1. Độ đặc hiệu

Tiến hành phân tích mẫu trắng (mẫu blank – chỉ có dung môi); các mẫu chuẩn curcumin A, B và C; mẫu thử (dịch chiết củ Nghệ vàng); mẫu thêm chuẩn (mẫu dịch chiết củ Nghệ vàng thêm các mẫu chất chuẩn curcumin A, B, C) với hệ dung môi đã được lựa chọn trước đó.

2.4.2. Độ lặp lại

Để đánh giá độ lặp lại của phương pháp, tiến hành pha các mẫu chuẩn curcumin A, B, C với các nồng độ 100, 120, và 150 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Tiến hành chạy sắc ký lần lượt từng mẫu với điều kiện đã lựa chọn cho kết quả như ở Bảng 1. Lặp lại thí nghiệm 3 lần, trong những thời điểm khác nhau, người thực hiện khác nhau, sau đó tiến hành so sánh các kết quả thu được.

Tính độ lệch chuẩn SD và độ lệch chuẩn tương đối RSD theo công thức sau:

$$\text{RSD}\% = \frac{\text{SD}}{\bar{x}} \cdot 100\%; \text{SD} = \sqrt{\frac{\sum(x_i - \bar{x})^2}{n-1}}$$

Trong đó, n : số lần làm thí nghiệm; x_i : giá trị tính được của lần thí nghiệm thứ “ i ”; \bar{x} : Giá trị trung bình của các lần thí nghiệm.

Tiêu chuẩn đánh giá độ lặp lại (RSD_r) được xác định theo phương trình Horwitz:

$$\text{RSD}_r(\text{Horwitz}) (\%) = 2 \cdot C^{-0,1505}; \text{PRSD}_r (\%) = C^{-0,1505}$$

Trong đó, C là nồng độ của chất cần phân tích trong mẫu thử tính theo phần thập phân.

Theo AOAC, để đạt kết quả tốt nhất, giới hạn cho phép đối với độ lặp lại nên đạt giá trị $\text{RSD}_{\text{thực nghiệm}} < \text{PRSD}_r$ [14].

2.4.3. Độ tuyến tính

Để khảo sát độ tuyến tính của các mẫu chất chuẩn phân tích, tiến hành các bước sau: Cân chính xác 1,0 mg (Cân phân tích 4 số) các mẫu chất chuẩn đối chiếu, hòa tan với 2,0 mL methanol tạo dung dịch với nồng độ 500 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Sau đó, pha loãng mẫu bằng dung dịch methanol thành các nồng độ khác nhau từ 50, 100, 200, 300, 400, và 500 $\mu\text{g}/\text{mL}$; lọc qua màng lọc kích cỡ 0,22 μm được dãy các dung dịch chuẩn phân tích.

2.4.4. Độ thu hồi

Độ thu hồi của phương pháp được xác định bằng phương pháp thêm một lượng chất chuẩn xác định vào mẫu trắng, phân tích các mẫu thêm chuẩn đó, làm lặp lại tối thiểu 3 lần bằng phương pháp khảo sát, tính độ thu hồi theo công thức sau đây:

$$\text{Đối với mẫu trắng: } R\% = \frac{C_{tt}}{C_c} \times 100,$$

Trong đó, $R\%$: độ thu hồi (%); C_{tt} : Nồng độ chất phân tích

trong mẫu trắng thêm chuẩn máy đo được ($\mu\text{g}/\text{mL}$); C_c : Nồng độ chuẩn thêm (lý thêm) ($\mu\text{g}/\text{mL}$).

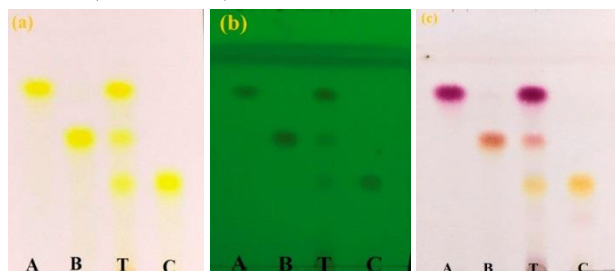
2.4.5. Giới hạn phát hiện (LOD) và giới hạn định lượng (LOQ)

Để xác định LOD và LOQ, tiến hành phân tích các mẫu chất chuẩn ở nồng độ thấp nhất mà tín hiệu của chất phân tích còn có thể phát hiện được bằng thiết bị đầu dò của hệ thống HPLC và xác định tỷ lệ tín hiệu chia cho nhiễu đường nền (S/N ; trong đó, S là chiều cao tín hiệu pic của chất phân tích, N là độ nhiễu đường nền). Nồng độ của dung dịch chuẩn được coi là LOD khi tỷ số S/N đạt gần 3 nhất. Nồng độ của dung dịch chuẩn được coi là LOQ khi tỷ số S/N đạt gần 10 nhất.

3. Kết quả và thảo luận

3.1. Định tính bằng TLC

Quan sát Hình 2 sắc ký đồ TLC của ba hợp chất cucumins (1–3) tương ứng với các kí hiệu trên TLC là A, B và C, và mẫu dịch chiết củ nghệ vàng (*C. longa*) kí hiệu là T cho thấy, với điều kiện triển khai bản mỏng hệ pha thường với hệ dung môi triển khai là CH_2Cl_2 : acetone = 20: 1 (tỉ lệ thể tích/ thể tích) cho kết quả phân tách các hợp chất tốt nhất. Giá trị R_f của ba hợp chất cucumins (1–3) tương ứng lần lượt là 0,7 (curcumin A), 0,5 (curcumin B) và 0,35 (curcumin C).



Hình 2. Sắc ký đồ TLC của ba hợp chất cucumins (1–3) và mẫu dịch chiết củ nghệ vàng (*C. longa*). Từ trái qua phải:

(a) Hình ảnh sắc ký bản mỏng nhìn ở điều kiện thường,

(b) Hình ảnh sắc ký bản mỏng nhìn dưới ánh sáng UV tại

254 nm trước khi phun thuốc thử, (c) Hình ảnh sắc ký bản mỏng sau khi phun thuốc thử H_2SO_4 10% trong EtOH và sấy ở 120°C

Ghi chú: A: hợp chất curcumin (1); B: hợp chất demethoxycurcumin (2); T: mẫu dịch chiết củ nghệ; C: hợp chất bisdemethoxycurcumin (3)

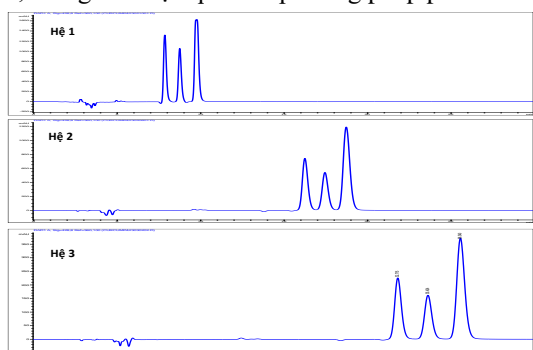
Cả ba hợp chất curcumin A, B, và C hiện màu vàng đặc trưng rất rõ ràng trên bản mỏng TLC khi quan sát ở điều kiện thường chưa phun thuốc thử (Hình 2a), bắt màu rất rõ khi quan sát dưới ánh sáng đèn UV tại bước sóng 254 nm trước khi phun thuốc thử (Hình 2b) và hiện màu đặc trưng của từng hợp chất sau khi phun thuốc thử H_2SO_4 10% trong EtOH và sấy ở 120°C (Hình 2c). Curcumin A (1) với hai nhóm methoxy trong phân tử (Hình 1) cho xuất hiện màu tím rất rõ rệt, đậm màu, sau khi phun thuốc thử và đốt, demethoxycurcumin B (2) với một nhóm methoxy trong phân tử cho màu đỏ-tím nhạt và cuối cùng là bisdemethoxycurcumin C (3), không có nhóm methoxy trong phân tử (bisdemethoxy), xuất hiện màu đỏ gạch hơi vàng (Hình 2c).

3.2. Thiết lập các thông số cho hệ thống HPLC

3.2.1. Lựa chọn hệ dung môi pha động

Qua khảo sát tỷ lệ dung môi cho thấy, tỷ lệ hệ dung môi số (1) cho sắc ký đồ ba pic tách không tốt, các pic phân

tách không rõ ràng. Tỷ lệ hệ dung môi số (3) cho thấy, thời gian lưu của các chất quá dài (gần 40 phút), dẫn tới kéo dài về mặt thời gian, tổn hao về lượng dung môi sử dụng, dẫn tới điều kiện không phù hợp để phân tích với lượng mẫu nhiều, làm giảm hiệu quả của phương pháp phân tích.



Hình 3. Sắc ký đồ HPLC của mẫu dịch chiết củ Nghệ vàng tương ứng với 3 hệ dung môi số (1), số (2) và số (3)

Với tỷ lệ dung môi hệ số (2) cho thấy, hiệu quả phân tách ba hợp chất curcumin (1–3) tốt nhất, tổng thời gian phân tích ít hơn (trong khoảng 20 phút), đồng thời lượng dung môi hữu cơ sử dụng ít (chiếm 25%). Điều này đồng nghĩa với việc sẽ giảm được chi phí cho quá trình phân tích mẫu, giúp tối ưu hóa trong việc phân tích với số lượng mẫu lớn, và tăng được năng suất và hiệu quả làm việc. Vì vậy, điều kiện hệ số (2) được lựa chọn và áp dụng để phân tích ba hợp chất curcumin trong các mẫu nghệ.

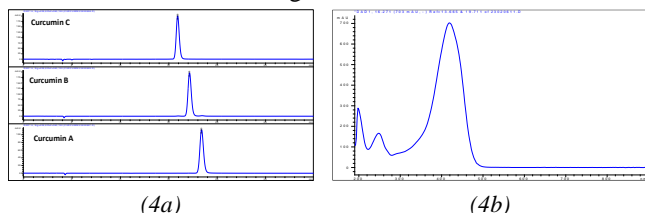
3.2.2. Điều kiện chạy HPLC

Sau khi đã khảo sát các điều kiện khác nhau và cuối cùng lựa chọn được điều kiện chạy sắc ký HPLC tối ưu với các thông số kỹ thuật và thiết bị như sau:

- Cột sắc ký: Sử dụng cột Eclipse XDB - C18 (kích thước $150 \times 4,6$ mm, với kích thước hạt $5 \mu\text{m}$) và cột bảo vệ (tiền cột) cùng loại XDB-C₁₈ của hãng Agilent.

- Pha động: Sử dụng hệ dung môi với kênh A: H₂O + 0,1 % FA – kênh B: ACN – kênh C: MeOH, được thiết lập chạy đẳng dòng với tỉ lệ 40 - 25 - 35 trong 30 phút;

- Tốc độ dòng: 0,5 mL/phút; Lượng bơm mẫu (hệ tự động): 5 μL ; Tổng thời gian phân tích mẫu: 30 phút; Nhiệt độ cột: 30 °C; Áp suất dòng: 64 bar; Đầu dò (Detector) UV/Vis: Đặt tại bước sóng 428 nm.



Hình 4. (4a) Phổ sắc ký đồ HPLC của ba mẫu hợp chất curcumins (1–3) và (4b) phổ UV của các hợp chất curcumin với độ hấp phụ cực đại tại 428 nm

Trên sắc ký đồ HPLC, pic tín hiệu lựa chọn của curcumin 1 (hay curcumin A) được phát hiện một cách ổn định tại thời gian lưu $R_t = 18,38$ phút, của demethoxycurcumin 2 (hay curcumin B): $R_t = 17,13$ phút, và của bisdemethoxycurcumin 3 (hay curcumin C): $R_t = 15,91$ phút. Đối với các mẫu chất tham chiếu, nhiều nền thấp cả ở mẫu chuẩn và mẫu thử. Như vậy khẳng định, có thể sử dụng các điều kiện sắc ký đã lựa

chọn để phân tích ba hợp chất curcumin (1–3) trong các mẫu được liệu nghệ.

3.3. Khảo sát điều kiện chiết mẫu thực vật

3.3.1. Khảo sát dung môi chiết mẫu

Sau khi chuẩn bị xong các mẫu dịch nguyên liệu phân tích, các mẫu dịch của các chất chuẩn phân tích, tiến hành chạy phân tích hàm lượng ba hợp chất curcumin (1–3) trên hệ thống máy HPLC. Kết quả Bảng 1 cho thấy, khi chiết được liệu với dung môi ethanol cho hàm lượng ba hợp chất curcumin (1–3) thấp nhất, với dung môi EtOAc cho hàm lượng cao hơn và khi chiết với dung môi acetone cho hàm lượng ba chất curcumin cao nhất, đồng thời hiệu suất chiết cũng cao hơn (Bảng 1). Vì thế, acetone được lựa chọn làm dung môi chiết các mẫu nguyên liệu nghệ để phục vụ nghiên cứu các bước tiếp theo.

Bảng 1. Kết quả khảo sát dung môi chiết mẫu nguyên liệu củ nghệ

Dung môi chiết	Hàm lượng curcumin A (%)	Hàm lượng Curcumin B (%)	Hàm lượng Curcumin C (%)
Ethanol	3,95	1,15	0,41
Acetone	7,96	2,43	0,85
EtOAc	5,62	0,85	0,59

3.3.2. Khảo sát thời gian chiết mẫu

Theo như khảo sát, thời gian chiết kéo dài sẽ giúp tăng hiệu quả chiết. Tuy nhiên, nếu thời gian chiết quá dài, không những làm giảm hiệu quả chiết mà còn tốn thời gian, dung môi bị bay hơi, máy siêu âm làm việc nhiều gây ồn. Vì thế, lựa chọn thời gian chiết phù hợp, tạo hiệu suất chiết cao nhất được thực hiện. Kết quả khảo sát thời gian chiết mẫu ở Bảng 2, cho thấy khi chiết mẫu nguyên liệu trong 50 phút sẽ đạt hiệu quả cao nhất với hàm lượng các hợp chất thu được là cao nhất tương ứng với curcumin A (8,12 %), curcumin B (2,59 %) và curcumin C (0,90 %).

Bảng 2. Kết quả khảo sát thời gian chiết mẫu

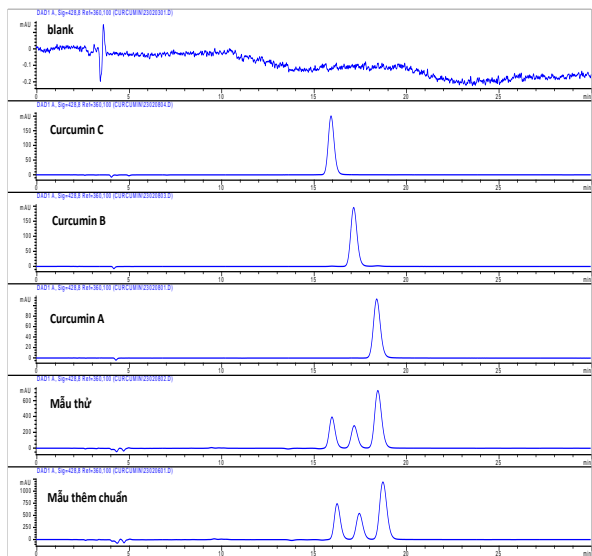
Thời gian chiết	Hàm lượng curcumin A (%)	Hàm lượng curcumin B (%)	Hàm lượng curcumin C (%)
30 phút	7,82	2,31	0,80
40 phút	7,96	2,43	0,85
50 phút	8,12	2,59	0,90
60 phút	8,10	2,58	0,90

3.4. Thẩm định phương pháp

3.4.1. Độ đặc hiệu

Tiến hành phân tích mẫu trắng (mẫu blank – chỉ có ung môi); các mẫu chuẩn curcumin A, B và C; mẫu thử (dịch chiết củ Nghệ vàng); mẫu thêm chuẩn (mẫu dịch chiết củ Nghệ vàng thêm các mẫu chất chuẩn curcumin A, B, C) với hệ dung môi đã được lựa chọn trước đó (Hình 5).

Kết quả thu được cho thấy tín hiệu pic của chất chuẩn curcumin A xuất hiện tại thời gian lưu $R_t = 18,38$ phút, curcumin B: $R_t = 17,13$ phút, và curcumin C: $R_t = 15,91$ phút. Trên sắc ký đồ mẫu trắng (blank), không thấy xuất hiện tín hiệu pic tại các thời gian lưu này. Trên sắc ký đồ mẫu thử và mẫu thêm chuẩn có tín hiệu các pic này, các tín hiệu pic tách khỏi nhau xuất hiện trên sắc ký đồ rất rõ rệt. Điều này chứng tỏ rằng phương pháp xây dựng có tính đặc hiệu chọn lọc phù hợp cho phân tích các hợp chất curcumin (1–3) trong mẫu nguyên liệu nghệ.



Hình 5. Sắc ký đồ HPLC của mẫu trắng (blank), mẫu chuẩn curcumin A, B và C, mẫu thử dịch chiết củ Nghệ vàng và mẫu thêm chuẩn

3.4.2. Khảo sát độ lặp lại

Để đánh giá độ lặp lại của phương pháp, tiến hành pha các mẫu chuẩn curcumin A, B, C với các nồng độ 100, 120, và 150 µg/mL. Tiến hành chạy sắc ký lần lượt từng mẫu với điều kiện đã lựa chọn cho kết quả như ở Bảng 1. Lặp lại thí nghiệm 3 lần, trong những thời điểm khác nhau, người thực hiện khác nhau, sau đó tiến hành so sánh các kết quả thu được.

Kết quả thu được trình bày trong Bảng 3 cho thấy độ lặp lại của ba hợp chất curcumin (1–3) dao động từ 0,629 đến 0,750 đối với thời gian lưu và từ 0,428 đến 0,756 đối với diện tích pic. Như vậy các điều kiện sắc ký đã lựa chọn và hệ thống HPLC sử dụng là phù hợp và đảm bảo sự ổn định của phép phân tích [15].

Bảng 3. Khảo sát tính thích hợp của phương pháp

Tên chất		Curcumin A		Curcumin B		Curcumin C	
Nồng độ (µg/mL)	Lần	R _t	S	R _t	S	R _t	S
	100	1	19,823	2403,0	18,103	4090,6	16,209
2		19,656	2418,5	18,239	4108,4	16,308	3893,2
3		19,432	2394,6	18,334	4112,0	16,012	3832,1
\bar{x}		19,637	2405,3	18,225	4103,6	16,176	3851,3
SD		0,196	12,124	0,116	11,458	0,151	36,266
% RSD		0,999	0,504	0,637	0,279	0,931	0,942
120	1	19,168	3084,4	18,027	4884,5	16,301	4578,8
	2	19,276	3045,6	18,194	4861,2	16,367	4514,5
	3	19,046	3102,3	18,365	4903,2	16,432	4602,1
	\bar{x}	19,163	3077,4	18,195	4882,97	16,367	4565,1
	SD	0,115	28,985	0,169	21,042	0,066	45,371
	% RSD	0,600	0,942	0,929	0,431	0,400	0,994
150	1	19,751	3855,4	17,332	6147,8	16,296	5671,4
	2	19,674	3812	17,354	6123,4	16,484	5692,3
	3	19,785	3822,6	17,139	6193	16,320	5709,2
	\bar{x}	19,737	3830,0	17,275	6154,73	16,36	5690,9
	SD	0,057	22,627	0,118	35,314	0,102	18,935
	% RSD	0,288	0,591	0,685	0,574	0,625	0,333
Trung bình % RSD		0,629	0,679	0,750	0,428	0,652	0,756

Ghi chú: S là diện tích pic thu được tương ứng với nồng độ chất chuẩn, R_t là thời gian lưu của chất chuẩn tính theo phút.

3.4.3. Độ tuyến tính

Kết quả khảo sát độ tuyến tính (Bảng 4) của các mẫu chất chuẩn cho thấy, đường chuẩn của cả ba hợp chất curcumin (1–3) có hệ số tuyến tính tốt với hệ số tương quan R² đều lớn hơn 0,9999.

Cụ thể, curcumin (1) có hệ số tương quan R² tính toán được là 0,99994, tương tự với hợp chất số 1, demethoxycurcumin (2) cũng có hệ số tương quan R² là 0,99994, còn của hợp chất bisdemethoxycurcumin (3) là 0,99995.

Bảng 4. Kết quả khảo sát độ tuyến tính của các hợp chất

Chất chuẩn	Khoảng nồng độ (µg/mL)	Phương trình đường chuẩn	Hệ số tương quan
Curcumin A	50 - 500	y = 43,564*x - 15,202	0,99994
Curcumin B	50 - 500	y = 42,959*x + 143,088	0,99994
Curcumin C	50 - 500	y = 28,602*x - 91,663	0,99995

3.4.4. Độ thu hồi (R %)

Độ thu hồi của phương pháp được xác định bằng phương pháp thêm một lượng chất chuẩn xác định vào mẫu trắng, phân tích các mẫu thêm chuẩn đó, làm lặp lại tối thiểu 3 lần bằng phương pháp khảo sát, sau đó tính độ thu hồi.

Kết quả thu được ghi ở Bảng 5 cho thấy giá trị độ thu hồi trung bình ở mỗi mẫu đều đạt yêu cầu (> 97%). Do đó, phương pháp HPLC xây dựng được có độ thu hồi tốt đạt theo yêu cầu đề ra [11,15].

Bảng 5. Khảo sát độ thu hồi khi thêm mẫu chuẩn ở các nồng độ khác nhau

Tên chất	C _c (µg/mL)	C _{tt} (µg/mL)	R (%)	Trung bình (R%)
Curcumin A	100	97,02147	97,02	98,60
	120	123,14897	100,12	
	150	147,96780	98,65	
Curcumin B	100	98,38924	98,39	98,24
	120	116,70950	97,26	
	150	148,59683	99,06	
Curcumin C	100	102,95834	102,96	100,49
	120	118,95803	99,13	
	150	149,04822	99,37	

3.4.5. Giới hạn phát hiện (LOD) và giới hạn định lượng (LOQ)

Để xác định giá trị LOD và LOQ, tiến hành phân tích các mẫu chất chuẩn ở nồng độ thấp nhất mà tín hiệu của chất phân tích còn có thể phát hiện được bằng thiết bị đầu dò của hệ thống HPLC và xác định tỷ lệ tín hiệu chia cho nhiễu nền (S/N; trong đó S là chiều cao tín hiệu pic của chất phân tích, N là độ nhiễu nền). Nồng độ của dung dịch chuẩn được coi là giới hạn phát hiện (LOD) khi tỷ số S/N đạt gần 3 nhất. Nồng độ của dung dịch chuẩn được coi là giới hạn định lượng (LOQ) khi tỷ số S/N đạt gần 10 nhất.

Kết quả phân tích ba mẫu chất chuẩn curcumin ở nồng độ 3,0 µg/mL, sau đó pha loãng dần đến khi dung dịch chuẩn không còn xuất hiện tín hiệu pic của chất cần phân tích được tổng hợp trong Bảng 6.

Dựa vào tỉ lệ S/N (trong Bảng 6) có thể xác định được giá trị giới hạn phát hiện (LOD) và giới hạn định lượng

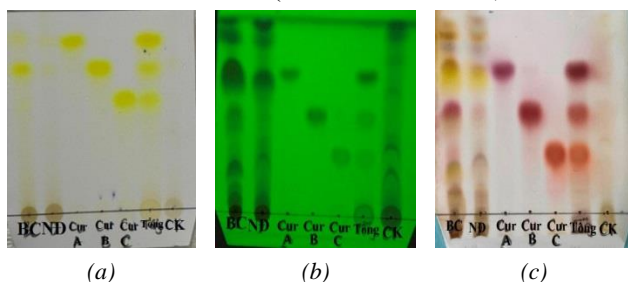
(LOQ) của các chất chuẩn với curcumin A (LOD: 1,05 $\mu\text{g/mL}$, LOQ: 2,50 $\mu\text{g/mL}$); Curcumin B (LOD: 0,20 $\mu\text{g/mL}$, LOQ: 0,70 $\mu\text{g/mL}$); Curcumin C (LOD: 0,04 $\mu\text{g/mL}$, LOQ: 0,35 $\mu\text{g/mL}$). Từ các kết quả thu được trên cho thấy phương pháp xây dựng được có độ nhạy cao, đảm bảo yêu cầu theo tiêu chuẩn AOAC [14].

Bảng 6. Kết quả xác định nồng độ giới hạn LOD, LOQ

Tên chất	Nồng độ chất ($\mu\text{g/mL}$)	Chiều cao pic (S)	Độ nhiễu đường nền (h = 2N)	Tỉ lệ S/N
Curcumin A	1,05	1,02	0,30	3,40
	2,50	2,05	0,20	10,25
Curcumin B	0,20	0,32	0,10	3,20
	0,70	1,35	0,13	10,38
Curcumin C	0,04	0,14	0,04	3,50
	0,35	0,83	0,08	10,37

3.5. Ứng dụng khảo sát hàm lượng curcumin trong các mẫu nghệ

Các mẫu khảo sát được xử lý chung theo quy trình xử lý các mẫu thử. Tiến hành chạy TLC so sánh giữa ba mẫu chất chuẩn curcumin (1–3) với các mẫu khảo sát, bao gồm: mẫu Nghệ Bọ cạp, mẫu Nghệ đen, mẫu cây khòe và mẫu Nghệ vàng thu thập được với hệ dung môi triển khai CH_2Cl_2 : acetone = 20: 1 (tỉ lệ thể tích/ thể tích).



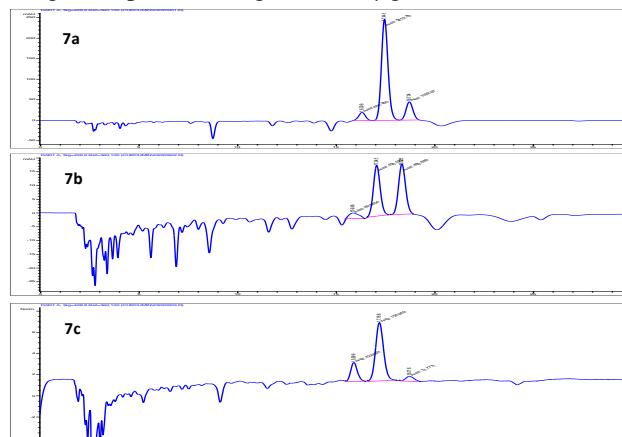
Hình 6. Sắc ký đồ TLC của ba hợp chất curcumin (1–3) và các mẫu khảo sát. a) Quan sát dưới ánh sáng thường trước khi phun thuốc thử; b) Quan sát dưới ánh sáng UV-254 nm trước khi phun thuốc thử; c) Quan sát dưới ánh sáng thường sau khi phun thuốc thử H_2SO_4 10% trong EtOH và sấy ở 120°C

Ghi chú: BC: Nghệ bọ cạp, ND: Nghệ đen; Tổng: Nghệ vàng; CK: cây khòe.

Ở Hình 6a, khi quan sát dưới ánh sáng thường trước khi phun thuốc thử, cả ba hợp chất curcumin (1–3) đều cho màu vàng chanh, màu tươi, rất rõ ràng tương tự như với mẫu nghệ Bọ cạp (BC), mẫu nghệ đen (ND) và mẫu nghệ vàng (Tổng). Tuy nhiên, khi quan sát dưới ánh sáng thường sau khi phun thuốc thử H_2SO_4 10% trong EtOH và sấy ở 120°C (Hình 6c) cho thấy, hợp chất curcumin (1) có màu tím-đỏ (Cur-A), hợp chất demethoxycurcumin (2) lại có màu đỏ-tím nhạt hơn (Cur-B) so với curcumin (1), còn hợp chất bisdemethoxycurcumin (3) lại có màu đỏ gạch (Cur-C). Cả ba hợp chất curcumin (1–3) khi quan sát dưới ánh sáng đèn UV-254 nm trước khi phun thuốc thử đều bắt ánh sáng tốt (Hình 6b). Dựa vào hình ảnh sắc ký đồ TLC với các vết màu trên sắc ký (Hình 6), có thể nhận thấy trong mẫu Nghệ bọ cạp, Nghệ đen, hợp chất curcumin B (2) hiện vết màu rõ ràng nhất, có khả năng hàm lượng hợp chất curcumin B trong hai mẫu này sẽ chiếm tỷ lệ cao hơn so

với các mẫu còn lại. Đối với mẫu cây khòe (CK), cả ba vết màu tương ứng với ba hợp chất curcumin (1–3) đều rất mờ, không thể hiện rõ ràng, điều này gợi ý rằng có thể hàm lượng của ba hợp chất curcumin này trong mẫu nguyên liệu là rất thấp.

Quan sát hình ảnh trên TLC, tiếp theo, tiến hành chạy định lượng hàm lượng ba hợp chất curcumin trong các mẫu khảo sát trên hệ thống máy HPLC theo phương pháp đã lựa chọn. Mẫu được pha với nồng độ đạt 30.000 ($\mu\text{g/mL}$) đối với mẫu Nghệ bọ cạp, Nghệ đen, và cây khòe. Mẫu Nghệ vàng được pha với nồng độ 1.000 $\mu\text{g/mL}$.



Hình 7. Sắc ký đồ HPLC của các mẫu khảo sát tại bước sóng 428 nm. (7a) Nghệ bọ cạp, (7b) Nghệ đen, (7c): cây Khòe

Khi quan sát sắc ký đồ HPLC mẫu Nghệ đen và cây Khòe, độ nhiễu pic lớn, tỉ lệ về chiều cao pic, diện tích pic của các hợp chất curcumin (1–3) thấp (Hình 7b và 7c), mặc dù các pic tương ứng với ba hợp chất curcumin (1–3) phân tách tốt với nhau. Đối với mẫu Nghệ bọ cạp cho thấy độ nhiễu đường nền thấp hơn, tỉ lệ chiều cao pic và diện tích các pic lớn hơn, hình dạng pic cân đối và độ phân tách rất rõ ràng (Hình 7a). Tất cả các sắc ký đồ thu được tại bước sóng 428 nm.

Bảng 7. Kết quả phân tích hàm lượng curcumin trong các mẫu khảo sát

Tên chỉ tiêu	Nghệ Bọ cạp (BC)	Nghệ đen (ND)	Cây Khòe (CK)
Hàm lượng Curcumin A (%)	0,094	0,033	0,002
SD	0,001	0,001	0,0001
%RSD	0,641	3,265	5,000
%PRSD	11,492	13,427	20,380
Hàm lượng Curcumin B (%)	0,490	0,026	0,0006
SD	0,0149	0,0012	0,00004
%RSD	2,964	4,374	6,381
%PRSD	8,878	13,935	24,428
Hàm lượng Curcumin C (%)	0,083	0,017	0,0009
SD	0,00153	0,00075	0,00001
%RSD	1,672	4,601	1,552
%PRSD	11,492	14,903	23,180
Tổng hàm lượng Curcumin (%)	0,667	0,076	0,017

Hàm lượng các hợp chất curcumin A, B, C (1–3) phân tích được trình bày trong Bảng 7, trong mẫu Nghệ Bọ cạp tổng hàm lượng các hợp chất curcumin (1–3) chiếm hàm lượng cao hơn hẳn đạt 0,667 % so với mẫu Nghệ đen (0,076 %) và mẫu cây Khỏe (0,017).

Giá trị SD, RSD và PRSD của ba hợp chất curcumin A, B, C (1–3) trong ba mẫu nghệ Bọ cạp (BC), Nghệ đen (NĐ) và cây Khỏe (CK) được trình bày trong Bảng 7. Đối với mẫu Nghệ Bọ cạp, độ lặp lại (RSD) của ba hợp chất curcumin (1–3) lần lượt là 0,641, 2,964 và 1,672 %; trong đó giá trị % RSD đều nhỏ hơn PRSD, cho thấy kết quả thu được là đáng tin cậy. Tương tự đối với mẫu Nghệ đen, độ lặp lại giao động trong khoảng 3,265 đến 4,601; riêng với mẫu cây Khỏe độ lặp lại của 3 hợp chất curcumin A, B, C tương ứng lần lượt là 5,000, 6,381 và 1,552. Giá trị RSD tính được đều nhỏ hơn nhiều lần so với giá trị PRSD, điều này chứng tỏ rằng độ lặp lại của các mẫu phân tích hoàn toàn phù hợp với yêu cầu theo tiêu chuẩn AOAC [14].

Trong quá trình xử lý mẫu nghệ Bọ cạp, khi quan sát cũng phát hiện thấy sắc tố vàng trong mẫu nguyên liệu rất rõ rệt, mẫu Nghệ đen có sắc tố vàng không rõ ràng và đặc biệt không quan sát thấy sắc tố vàng trong mẫu cây Khỏe. Từ các kết quả thu được này cho thấy sự khác nhau tương đối rõ rệt giữa các mẫu nghệ Bọ cạp, mẫu Nghệ đen và mẫu cây Khỏe khi phân tích về hàm lượng các hợp chất và tổng hàm lượng curcumin (1–3) và so sánh hình thái của chúng cùng với nhau.

4. Kết luận

Từ các kết quả nghiên cứu đã xây dựng được quy trình và các điều kiện tối ưu áp dụng để phân tích định tính cũng như định lượng ba hợp chất curcumin (1), demethoxycurcumin (2) và bisdemethoxycurcumin (3) sử dụng hệ thống máy HPLC hiệu 1260 của hãng Agilent. Trong đó, các mẫu nguyên liệu thử nghiệm được chiết với dung môi acetone trong thời gian 50 phút, sử dụng siêu âm, cho ra hàm lượng cao nhất. Thảm định phương pháp theo tiêu chuẩn AOAC đạt các chỉ tiêu về độ đặc hiệu, độ lặp lại, độ tuyến tính, độ thu hồi, xác định được các giá trị quan trọng trong phân tích như LOD và LOQ. Kết quả cho thấy, hệ số tương quan R^2 của ba hợp chất đều lớn hơn 0,9999, độ thu hồi trung bình ở mỗi mẫu đều đạt yêu cầu > 97 % (với 98,60, 98,24 và 100,49 % tương ứng với hợp chất curcumin 1–3), độ lệch chuẩn tương đối đều nhỏ hơn 1% (từ 0,629 - 0,750 đối với thời gian lưu và từ 0,428 - 0,756 đối với diện tích pic). Trong khi đó, giá trị LOD và LOQ của ba hợp chất curcumin 1–3 đều ở mức thấp với các giá trị lần lượt trong khoảng 0,04 - 1,05 và 0,35 - 2,50 $\mu\text{g/mL}$. Ứng dụng phương pháp xây dựng được để xác định hàm lượng ba hợp chất curcumin (1–3) trong các mẫu nghệ khác nhau. Kết quả đã đánh giá được hàm lượng từng thành phần và tổng hàm lượng của ba hợp chất này trong mẫu nghệ Bọ cạp, nghệ đen và cây Khỏe lần lượt là 0,667; 0,076 và 0,017 %. Đây là lần đầu tiên ba

hợp chất curcumin (1), demethoxycurcumin (2) và bisdemethoxycurcumin (3) được nhận dạng định tính và định lượng từ các loài dược liệu khác nhau thuộc chi nghệ trong đó bao gồm nghệ Bọ cạp, nghệ đen và cây Khỏe.

Lời cảm ơn: Nghiên cứu này được tài trợ bởi Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam trong đề tài với mã số QTRU02.04/20-21.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- [1] D. H. Bich *et al.*, *Medicinal Plants and Animals Used as Medicine in Vietnam*, Vol. 2, Science and Technology Publishing House, 2006, p. 385.
- [2] J. G. O. Filho, M. J. Almeida, T. L. Sousa, D. C. Santos, and M. B. Egea, "Bioactive Compounds in Underutilized Vegetables and Legumes-Bioactive compounds of Turmeric (*Curcuma longa* L.)", *Reference Series in Phytochemistry, Springer References*, 2021.
- [3] B. Jyotirmayee, G. Mahalik, "A review on selected pharmacological activities of *Curcuma longa* L.", *International Journal of Food Properties*, vol. 25, no. 1, pp. 1377–1398, 2022.
- [4] H. A. Zhang, D. D. Kitt, "Turmeric and its bioactive constituents trigger cell signaling mechanisms that protect against diabetes and cardiovascular diseases", *Molecular and Cellular Biochemistry*, vol. 476, no. 10, pp. 3785–3814, 2021.
- [5] T. M. Mioranza *et al.*, "Biological properties of Turmeric", *Scientia Agraria Paranaensis*, vol. 16, no. 1, pp. 1–12, 2017.
- [6] R. K. Verma, P. Kumari, R. K. Maurya, V. Kumar, R. B. Verma and R. K. Singh, "Medicinal properties of turmeric (*Curcuma longa* L.): A review", *International Journal of Chemical Studies*, vol. 6, no. 4, pp. 1354–1357, 2018.
- [7] D. Shrishail, H. Harish, H. Ravichandra, G. Tulsianand, and S. D. Shuruthi, "Turmeric: Nature's precious medicine", *Asian Journal of Pharmaceutical and Clinical research*, vol. 6, no. 3, pp. 10-16, 2013.
- [8] A. R. Vaughn, A. Branum and R. K. Sivamani, "Effects of Turmeric (*Curcuma longa*) on Skin Health: A Systematic Review of the Clinical Evidence", *Phytotherapy Research*, vol. 30, no. 8, pp. 1243–1264, 2016.
- [9] S. Mondal, S. Ghosh, and S. P. Moulik, "Stability of curcumin in different solvent and solution media: UV-visible and steady-state fluorescence spectral study", *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, vol. 158, pp. 212–218, 2016.
- [10] V. Vyshali *et al.*, "Optimization of Extraction of Curcuminoids from Turmeric Powder (*Curcuma longa*)", *Research Journal of Pharmacy and Technology*, vol. 14, no. 9, pp. 4615–4620, 2021.
- [11] P. V. Kadam, K. N. Yadav, C. L. Bhingare and M. J. Patil, "Standardization and quantification of curcumin from *Curcuma longa* extract using UV visible spectroscopy and HPLC", *Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry*, vol. 7, no. 5, pp. 1913–1918, 2018.
- [12] P. T. Phuong, N. Q. Ngoc, P. T. T. Huong, D. V. Don, N. T. T. Phuong, "Simultaneous Quantification of Curcumin and Piperine by High-Performance Liquid Chromatography Method", *Military Medical Journal*, vol. 6, pp. 7–12, 2014.
- [13] N. H. Giang, D. N. Nhan, P. V. Son, N. B. Duy, N. T. Lu, and L. M. Hai, "Quantification of Curcumin, Demethoxycurcumin, and Bisdemethoxycurcumin in Health Food Samples by HPLC UV Method", *Journal of Food Testing and Safety*, vol. 3, pp. 10–17, 2019.
- [14] C. Rivera and R. Rodriges, "Horwitz equation as quality benchmark in ISO/IEC 17025 testing laboratory", *Journal of AOAC International*, vol. 89, no. 4, pp.1103, 2006.
- [15] T. C. Son, P. X. Da, L. T. H. Hao, and N. T. Trung, *Method Validation in Chemical Analysis and Microbiology*, Science and Technology Publishing House, Hanoi, 2010, pp. 16–37.