

PHÁT TRIỂN VÀ THẨM ĐỊNH PHƯƠNG PHÁP PHÂN TÍCH ĐỊNH LƯỢNG CURCUMIN TRONG HUYẾT TƯƠNG THỎ

Nguyễn Xuân Thành

Viện Nghiên cứu Khoa học và Ứng dụng, Trường Đại học Sư phạm Hà Nội 2

TÓM TẮT

Vật liệu 3D-nano-cellulose (M3NC) có tiềm năng sử dụng như một hệ chất mang curcumin. Cần xây dựng phương pháp định lượng curcumin trong huyết tương để đánh giá sinh khả dụng của chế phẩm M3NC chứa curcumin. Nghiên cứu này nhằm mục đích phát triển và thẩm định phương pháp sắc ký lỏng siêu hiệu năng (UPLC) để phân tích định lượng curcumin trong huyết tương thỏ. Kết quả nghiên cứu đã chọn được các điều kiện phân tích mẫu phù hợp sử dụng cột là thép không gỉ C18 (15 cm x 4,6 cm, 5 μ m), pha động gồm acetonitril và acid acetic 2% (50/50, v/v), đầu dò ở bước sóng 425 nm, tốc độ dòng là 1,2 ml/phút. Phương pháp được thẩm định về tính tương thích hệ thống, tính đặc hiệu, độ tuyến tính, giới hạn phát hiện và giới hạn định lượng, độ lặp lại, độ đúng và khoảng xác định theo hướng dẫn của Cục quản lý Thực phẩm và Dược phẩm Hoa Kỳ. Kết quả nghiên cứu đã chứng minh phương pháp này đạt yêu cầu thẩm định của quy trình phân tích curcumin trong huyết tương thỏ về tính tương thích hệ thống, tính đặc hiệu, độ tuyến tính, giới hạn phát hiện và giới hạn định lượng, độ lặp lại, độ đúng và khoảng xác định. Phương pháp này phù hợp dùng để phân tích định lượng curcumin trong huyết tương thỏ.

Từ khóa: *Curcumin; huyết tương thỏ; sắc ký lỏng siêu hiệu năng (UPLC); thẩm định; phân tích định lượng*

Ngày nhận bài: 06/6/2019; Ngày hoàn thiện: 04/7/2019; Ngày đăng: 15/7/2019

DEVELOPMENT AND VALIDATION OF AN UPLC METHOD FOR QUANTITATIVE ANALYSIS OF CURCUMIN IN RABBIT PLASMA

Nguyen Xuan Thanh

Institute of Scientific Research and Applications (ISA), Hanoi Pedagogical University 2

ABSTRACT

The 3D-nano-cellulose (3DNC) material has the potential to be used as a curcumin delivery system. To assess the bioavailability of 3DNC containing curcumin, it is necessary to develop a method to quantify curcumin in plasma. The aim of the present research was to develop and validate an ultra performance liquid chromatography (UPLC) method for the quantitative analysis of curcumin in rabbit plasma. The samples were assayed by the acquity UPLC H-class/Xevo TQD instrument using a C8 column (15 cm x 4.6 cm, 5 μ m). The mobile phase was consisted of acetonitrile and acetic acid 2% (50/50, v/v) with the flow rate of 1.2 ml/min. The column effluent was monitored by detection at 425 nm. The UPLC method was validated by determining system suitability, selectivity, sensitivity, linearity, repeatability, precision, and working range in accordance with the guidelines of the United States Food and Drug Administration. The developed UPLC method proved to be simple, suitable, selective, sensitive, precise, and reproducible. This validated method is suitable for quantification of curcumin in rabbit plasma samples.

Keywords: *Curcumin; rabbit plasma; ultra performance liquid chromatography (UPLC); validation; quantitative analysis*

Received: 06/6/2019; Revised: 04/7/2019; Published: 15/7/2019

Email: nguyentuanh@hpu2.edu.vn

<http://jst.tnu.edu.vn>; Email: jst@tnu.edu.vn

1. Mở đầu

Gần đây nhiều tác dụng sinh học của curcumin được các nghiên cứu chỉ ra như: Chất chống oxy hóa mạnh, tăng khả năng miễn dịch, ức chế sự phát triển của khối u, chữa một số bệnh tiêu hóa, gan mật, kháng khuẩn, chống viêm,... và an toàn với con người [1, 2]. Sau khi chiết xuất được curcumin, các nhà khoa học nhận thấy curcumin rất ít tan trong nước nên sinh khả dụng (SKD) rất thấp làm cản trở khi áp dụng trên người. Yang và cộng sự cho thấy, nồng độ curcumin tối đa trong huyết tương chuột cống sau khi uống liều 500 mg/kg là $0,06 \pm 0,01$ $\mu\text{g/ml}$, chứng tỏ SKD đường uống chỉ khoảng 1% [3]. Tương tự, nghiên cứu của Shoba và cộng sự, nồng độ curcumin cao nhất trong huyết tương là $1,35 \pm 0,23$ $\mu\text{g/ml}$ sau 1 giờ dùng đường uống với liều 2 g/kg trên chuột cống [4]. Nhiều công trình nghiên cứu được động học của curcumin cho thấy: Độ tan thấp, chuyển hóa mạnh và thải trừ nhanh là các lý do chính dẫn đến SKD của curcumin thấp. Trong số các biện pháp để khắc phục trở ngại, nano curcumin được quan tâm nghiên cứu nhiều. Các công nghệ này bao gồm nhũ tương nano, huyền phù nano, polyme nano,... [5]. Mạng lưới cấu trúc 3D-nano-cellulose (M3NC) là một loại nguyên liệu mới do vi khuẩn *Acetobacter xylinum* tạo ra có nhiều ứng dụng trong các lĩnh vực khác nhau. Nhiều nghiên cứu đã chứng minh M3NC có tiềm năng như một hệ vận tải và phân phối được chất vì cấu trúc mạng lưới gồm các sợi siêu mảnh cỡ nano của nó có thể tạo hệ trị liệu giải phóng kéo dài nhằm tăng SKD của thuốc. Để đánh giá sinh khả dụng của M3NC chứa curcumin cần xây dựng quy trình định lượng curcumin trong huyết tương. Đã có một số phương pháp định lượng curcumin trong huyết tương ở chuột và một số đối tượng khác [3, 4, 6, 7, 8, 9, 10] nhưng chưa có nghiên cứu được thực hiện trên huyết tương thỏ. Nghiên cứu này nhằm mục tiêu xây dựng phương pháp định lượng curcumin trong huyết tương thỏ

bằng sắc ký lỏng siêu hiệu năng (UPLC) có độ nhạy và độ lặp lại cao giúp đánh giá sinh khả dụng của curcumin trong các chế phẩm.

2. Phương pháp nghiên cứu

2.1. Vật liệu và thiết bị

- Hóa chất: Curcumin (95%, Apollo, Ấn Độ); acetonitril, methanol, ethyl acetat, acid acetic băng,... (Merck); các hóa chất khác đạt tiêu chuẩn dùng trong sắc ký và phân tích.

- Chế phẩm: Vật liệu 3D-nano-cellulose chứa curcumin ở dạng viên (dùng cho đường uống) hoặc dạng miếng (dùng qua da) được Viện Nghiên cứu Khoa học và Ứng dụng - Trường Đại học Sư phạm Hà Nội 2 cung cấp theo kết quả từ các nghiên cứu trước đây [11, 12].

- Thiết bị: Hệ sắc ký lỏng siêu hiệu năng (Acquity UPLC H-Class, kết hợp khối phổ Xevo TQD, Waters, Mỹ); thiết bị lắc (xor Vortex ZX3, Velp Scientifica, Mỹ); thiết bị bốc hơi dung môi ở áp suất giảm (Centrivap solvent system, Labconco, Mỹ); tủ lạnh sâu (MDF 236, Sanyo, Nhật); một số thiết bị nghiên cứu khác.

2.2. Động vật thí nghiệm

Thỏ trắng khỏe mạnh được cung cấp từ Viện Kiểm nghiệm thuốc Trung ương. Thỏ được cho nhịn đói 12 giờ, chỉ uống nước trước khi thí nghiệm.

2.3. Xây dựng phương pháp phân tích

- Điều kiện sắc ký được khảo sát theo các điều kiện trong các tài liệu đã công bố [6, 7, 8, 9, 10] và khảo sát sơ bộ để lựa chọn chương trình sắc ký.

- Quy trình xử lý mẫu được khảo sát theo các tài liệu trước và thực hiện khảo sát sơ bộ về lựa chọn dung môi, điều kiện, phương pháp chiết,...

2.4. Thẩm định phương pháp định lượng

- Tính đặc hiệu: Dung môi pha mẫu (mẫu trắng), huyết tương trắng (mẫu nền), dung dịch chuẩn gốc, dung dịch chuẩn, dung dịch thử [13, 14]. Trên sắc ký đồ (SKĐ) mẫu trắng và mẫu nền không cho pic nào có thời gian lưu tương ứng với thời gian lưu của curcumin trên

SKĐ mẫu chuẩn. Trên SKĐ mẫu thử cho một pic có thời gian lưu tương ứng với thời gian lưu của curcumin trên SKĐ mẫu chuẩn [14].

- Tính tương thích hệ thống: Tiêm dung dịch chuẩn vào hệ thống sắc ký, ghi lại các SKĐ, xác định các thông số diện tích (S) pic của pic curcumin. Độ lệch chuẩn tương đối (RSD) của tR < 1% và RSD của Spic < 2% [14].

- Độ tuyến tính: Chuẩn bị các dung dịch chuẩn.

+ Dung dịch chuẩn gốc: Cân 10 mg curcumin và hòa tan hoàn toàn bằng methanol vừa đủ 100 ml, trộn đều. Hút 1 ml dung dịch trên pha loãng bằng methanol vừa đủ 100 ml, trộn đều.

+ Dung dịch chuẩn 1 (1,010 µg/ml): Hút 0,3 ml dung dịch chuẩn gốc vào 1,2 ml huyết tương trắng (ly tâm 3 ml máu thô 5000 vòng/phút trong 10 phút để lấy dịch nổi), trộn đều, chuyển vào bình chiết. Thêm 10 ml dung dịch ethyl acetat, lắc nhẹ trong 5 phút, thu được dung dịch pha ethyl acetat. Chiết 3 lần, gộp dịch chiết, lọc qua màng lọc 0,4 µm, tráng kỹ màng lọc. Đun cách thủy khoảng 60 °C cho bay hơi hết dung môi. Thêm 0,3 ml methanol và trộn đều.

+ Tiến hành pha loãng tương tự dung dịch chuẩn 1, thu được dung dịch chuẩn 2 (0,505 µg/ml), 3 (0,252 µg/ml), 4 (0,101 µg/ml), 5 (0,050 µg/ml), 6 (0,025 µg/ml): LOD 1, 7 (0,013 µg/ml): LOD 2, 8 (0,006 µg/ml): LOD 3, 9 (0,003 µg/ml): LOD 4.

Tiêm 200 µl mỗi dung dịch chuẩn (từ 1-6) vào hệ thống UPLC. Khảo sát sự tương quan theo phương trình: $y = ax + b$ với y (diện tích pic) và x (nồng độ); bằng phương pháp bình phương cực tiểu. Nếu hệ số tương quan $R \geq 0,98$ thì phương pháp định lượng có độ tuyến tính tốt [13].

- Giới hạn phát hiện và giới hạn định lượng: Dung dịch chuẩn có nồng độ thấp nhất mà khi tiêm vào hệ thống UPLC vẫn phát hiện được pic curcumin gọi là giới hạn phát hiện (LOD); trong khi giới hạn định lượng (LOQ) được tính theo công thức: $LOQ = LOD \times 3,3$ [14].

- Độ lặp lại của phương pháp: Cân 10 mg curcumin hòa tan trong methanol vừa đủ 100

ml. Hút 1,0 ml dung dịch trên pha loãng trong methanol vừa đủ 100 ml. Hút 5 ml dung dịch này pha loãng vừa đủ 20 ml bằng methanol. Hút 1 ml dung dịch này vào 2 ml huyết tương trắng, trộn đều, chuyển vào bình chiết. Thêm 10 ml dung dịch ethyl acetat, lắc nhẹ trong 5 phút, thu được dung dịch pha ethyl acetat. Chiết 3 lần, gộp dịch chiết, lọc qua màng lọc 0,45 µm, tráng kỹ màng lọc. Đun cách thủy khoảng 60 °C cho bay hơi hết dung môi. Thêm chính xác 1 ml dung dịch methanol, trộn đều thu được dung dịch mẫu tự tạo. Chuẩn bị 6 dung dịch mẫu tự tạo riêng biệt như trên. Tiêm 200 µl mỗi dung dịch mẫu tự tạo (từ 1 đến 6) vào hệ thống UPLC. Hàm lượng curcumin trong mẫu tự tạo được tính dựa vào phương trình hồi quy tuyến tính. Nếu RSD < 2% thì phương pháp có độ lặp lại tốt [13].

- Độ đúng và khoảng xác định: Chuẩn bị 3 mức nồng độ, mỗi mức nồng độ làm 3 mẫu.

+ Độ đúng 10%: Hút 0,5 ml dung dịch chuẩn gốc pha loãng vừa đủ 20 ml bằng methanol. Hút 0,3 ml dung dịch này vào 1,2 ml huyết tương trắng, trộn đều, chuyển vào bình chiết. Thêm 10 ml dung dịch ethyl acetat, lắc nhẹ trong 5 phút, thu được dung dịch pha ethyl acetat. Chiết 3 lần, gộp dịch chiết, lọc qua màng lọc 0,45 µm, tráng kỹ màng lọc. Đun cách thủy khoảng 60 °C cho bay hơi hết dung môi. Thêm 0,3 ml dung dịch methanol, trộn đều thu được dung dịch độ đúng 10%.

+ Độ đúng 100%: Hút 5 ml dung dịch chuẩn gốc pha loãng vừa đủ 20 ml bằng methanol. Hút 0,3 ml dung dịch này vào 1,2 ml huyết tương trắng, trộn đều, chuyển vào bình chiết. Tiến hành tương tự dung dịch độ đúng 10%.

+ Độ đúng 400%: Hút 0,3 ml dung dịch chuẩn gốc vào 1,2 ml huyết tương trắng, trộn đều, chuyển vào bình chiết. Thêm 10 ml dung dịch ethyl acetat, lắc nhẹ trong 5 phút, thu được dung dịch pha ethyl acetat. Tiến hành tương tự dung dịch độ đúng 10%.

Tiêm 200 µl mỗi dung dịch ở các độ đúng trên vào hệ thống UPLC. Hàm lượng

curcumin trong mẫu tự tạo được tính dựa vào phương trình hồi quy tuyến tính. Độ đúng trung bình ứng với mỗi mức nồng độ phải nằm trong khoảng từ 85% đến 115% [13]. Khoảng xác định được suy ra từ độ đúng và độ tuyến tính của phương pháp ($RSD \leq 3,0\%$). Khoảng xác định từ nồng độ LOQ đến độ đúng 3.

2.5. Xử lý số liệu

Sử dụng Microsoft Excel để xử lý số liệu thực nghiệm. Kết quả được biểu diễn dưới dạng “giá trị trung bình $\pm$ độ lệch chuẩn”. Giá trị trung bình của hai mẫu được kiểm định giả thiết bằng test thống kê. Những khác biệt được coi là có ý nghĩa khi giá trị $p < 0,05$.

3. Kết quả và bàn luận

3.1. Xây dựng phương pháp phân tích

- Khảo sát điều kiện sắc ký: Trên cơ sở tham khảo các tài liệu công bố [6, 7, 8, 9, 10], chúng tôi đã khảo sát, tối ưu hóa các điều kiện sắc ký và lựa chọn được các kết quả sau: Cột thép không gỉ C18 (15 cm x 4,6 cm, 5 μ m); Tốc độ: 1,2 ml/phút; Detector: 425 nm; Nhiệt độ: 40 $^{\circ}$ C; Thể tích tiêm: 200 μ l; Pha động: Acetonitril và acid acetic 2% (50/50, v/v).

- Khảo sát quy trình xử lý mẫu: Theo các nghiên cứu trước đây [7, 10] và khảo sát sơ bộ, mẫu được chuẩn bị như sau:

+ Huyết tương trắng: Hút 2 ml huyết tương thô khi chưa cho thô dùng curcumin qua đường uống hoặc qua da (ly tâm dung dịch máu thô 5000 vòng/phút trong 10 phút lấy dịch nổi) vào bình chiết. Thêm 10 ml dung dịch ethyl acetat, lắc nhẹ trong 5 phút, thu được dung dịch pha ethyl acetat. Chiết 3 lần, gộp dịch chiết, lọc qua màng lọc 0,45 μ m, tráng kỹ màng lọc. Đun cách thủy khoảng 60 $^{\circ}$ C cho bay hơi hết dung môi. Thêm chính xác 1 ml dung dịch methanol và trộn đều.

+ Dung dịch chuẩn gốc (1 μ g/ml): Cân 10 mg curcumin và hòa tan hoàn toàn bằng methanol vừa đủ 100 ml, trộn đều. Hút 1 ml dung dịch pha loãng bằng methanol vừa đủ 100 ml.

+ Dung dịch chuẩn: Hút 5 ml dung dịch chuẩn gốc pha loãng vừa đủ 20 ml bằng methanol. Hút 0,3 ml dung dịch này vào 1,2

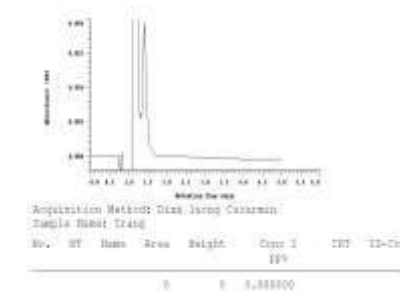
ml huyết tương trắng, trộn đều, chuyển vào bình chiết. Thêm 10 ml dung dịch ethyl acetat, lắc nhẹ trong 5 phút, thu được dung dịch pha ethyl acetat. Chiết 3 lần, gộp dịch chiết, lọc qua màng lọc 0,45 μ m, tráng kỹ màng lọc. Đun cách thủy khoảng 60 $^{\circ}$ C cho bay hơi hết dung môi. Thêm chính xác 0,3 ml dung dịch methanol và trộn đều.

+ Dung dịch thử: Hút 1,2 ml huyết tương thô tại các thời điểm nghiên cứu sau khi cho thô dùng chế phẩm chứa curcumin qua đường uống hoặc qua da (ly tâm 3 ml máu thô 5000 vòng/phút trong 10 phút thu lấy dịch nổi) vào bình chiết. Thêm 10 ml dung dịch ethyl acetat, lắc nhẹ trong 5 phút, thu được dung dịch pha ethyl acetat. Chiết 3 lần, gộp dịch chiết, lọc qua màng lọc 0,45 μ m, tráng kỹ màng lọc. Đun cách thủy khoảng 60 $^{\circ}$ C cho bay hơi hết dung môi. Thêm chính xác 1 ml dung dịch methanol và trộn đều.

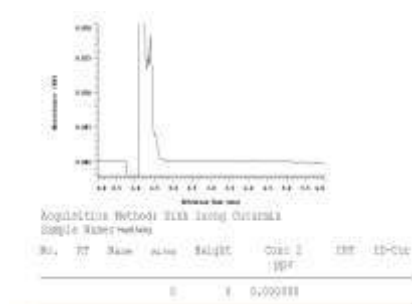
3.2. Thẩm định phương pháp định lượng

- Tính đặc hiệu: Với điều kiện sắc ký và quy trình xử lý mẫu như ở mục 3.1, tiêm 200 μ l các dung dịch sau lần lượt vào hệ thống UPLC: Mẫu trắng (methanol); mẫu nền (huyết tương trắng); dung dịch chuẩn; dung dịch thử.

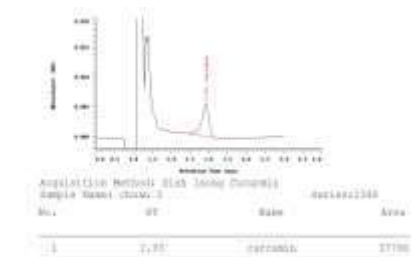
Kết quả ở các hình 1, 2, 3, 4 cho thấy, trên SKĐ của mẫu trắng, mẫu nền không cho pic nào có thời gian lưu tương ứng với thời gian lưu của curcumin trên SKĐ mẫu chuẩn nên không ảnh hưởng tới phép thử. Trên SKĐ mẫu thử cho một pic có thời gian lưu (tR) tương ứng với thời gian lưu của curcumin trên SKĐ mẫu chuẩn: tR của pic curcumin trên SKĐ của mẫu chuẩn = 2,93 phút và mẫu thử = 2,96 phút. Như vậy, phương pháp định lượng có tính đặc hiệu [13].



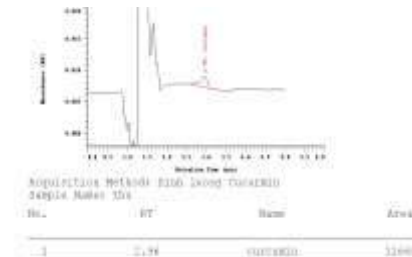
Hình 1. Sắc ký đồ của mẫu trắng



Hình 2. Sắc ký đồ của mẫu nền



Hình 3. Sắc ký đồ của mẫu chuẩn



Hình 4. Sắc ký đồ của mẫu thử

- Tính tương thích hệ thống: Tiến hành sắc ký theo các điều kiện sắc ký và quy trình xử lý mẫu như ở mục 3.1, với tiêm lặp lại 6 lần dung dịch chuẩn vào hệ thống UPLC. Kết quả ở bảng 1 cho thấy phương pháp phân tích curcumin với các điều kiện sắc ký đã chọn có tính tương thích hệ thống tốt với RSD của tR = 0,89 (RSD ≤ 1%) và Spic = 1,63 (RSD ≤ 2%). Như vậy, hệ thống đạt yêu cầu để phân tích mẫu curcumin [13].

Bảng 1. Khảo sát độ thích hợp của hệ thống

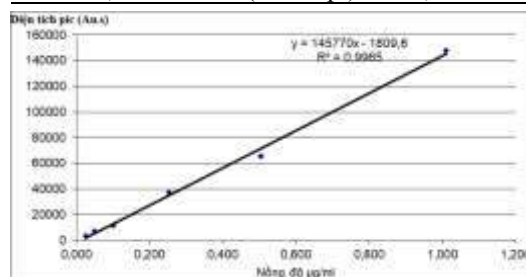
STT	Thời gian lưu của curcumin (phút)	Diện tích pic của curcumin (Au.s)
1	2,93	37025
2	2,93	37786
3	2,93	38017
4	2,88	36403
5	2,88	36817
6	2,93	37342
Trung bình	2,91	37231,67
RSD	0,89	1,63

- Độ tuyến tính: Tiêm lần lượt từ dung dịch chuẩn 1 đến 6 vào hệ thống UPLC với các điều kiện và quy trình xử lý mẫu như ở mục 3.1. Sự tương quan giữa nồng độ và Spic các dung dịch chuẩn được trình bày ở bảng 2 và hình 5. Từ kết quả ở bảng 2, khảo sát sự tương quan giữa y (Spic) và x (nồng độ); bằng phương pháp bình phương cực tiểu, kết quả cho thấy hệ số $R^2 = 0,9965$ ($R = 0,998 \geq 0,98$), chứng tỏ có sự phụ thuộc tuyến tính rất chặt về nồng độ và Spic của curcumin trong khoảng nồng độ: 0,025-1,01 µg/ml.

Bảng 2. Tương quan giữa nồng độ và diện tích pic các dung dịch chuẩn

STT	% so với định lượng	Nồng độ curcumin (µg/ml)	Diện tích pic (Au.s)
1	10	0,025	3200
2	20	0,050	7059
3	40	0,101	11386
4	100	0,252	37231,67
5	200	0,505	65732
6	400	1,010	147924

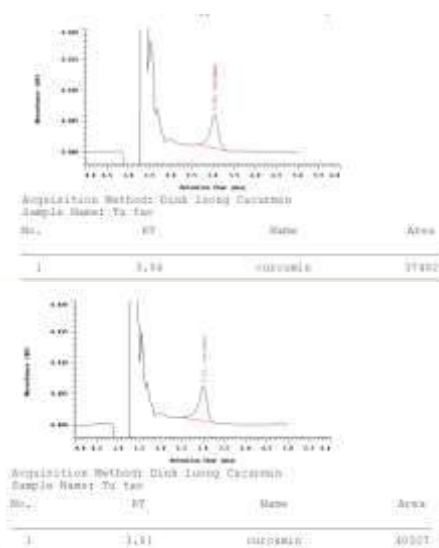
Hệ số tương quan: $R = 0,9965$; Hệ số góc: 145770; Hệ số chặn (intercept): 1809,6.



Hình 5. Biểu đồ xác định mối tương quan giữa nồng độ và diện tích pic của curcumin trong các dung dịch chuẩn

- Giới hạn phát hiện và giới hạn định lượng: Lần lượt tiêm 200 µl các dung dịch LOD1, LOD2, LOD3,... vào hệ thống UPLC với các điều kiện sắc ký và quy trình như ở mục 3.1.

Kết quả cho thấy dung dịch LOD 3 thu được pic của curcumin có diện tích 876 AU.s, nhưng dung dịch LOD 4 không còn phát hiện pic của curcumin. Như vậy, giới hạn phát hiện của phương pháp là 0,006 µg/ml. Giới hạn định lượng: $LOQ = 3,3 \times LOD = 3,3 \times 0,006 = 0,0198$ µg/ml.



Hình 6. Sắc ký đồ về độ lặp lại

Bảng 3. Khảo sát độ lặp lại của phương pháp

ST T	Lượng cân mẫu thử (mg)	Diện tích pic curcumin(A u.s)	Kết quả định lượng (%)
1	10,75	40594	96,28
2	10,86	41648	97,84
3	10,83	41557	97,89
4	10,79	40508	95,71
5	10,82	40736	96,00
6	10,85	40548	95,28
	Trung bình		96,50
	RSD (%)		1,15

Bảng 4. Kết quả khảo sát độ đúng của phương pháp

STT	Mẫu	Lượng chuẩn curcumin thêm vào (µg)	Diện tích pic curcumin (Au.s)	Lượng curcumin tìm lại (µg)	% thu hồi	Thống kê
1	10%	0,021	2949	0,020	94,15	Trung
2	10%	0,022	2984	0,020	92,96	bình: 92,53
3	10%	0,024	3148	0,021	90,49	RSD: 2,02
4	100%	0,259	35901	0,243	94,10	Trung
5	100%	0,264	38052	0,258	97,83	bình: 94,83
6	100%	0,266	36265	0,246	92,56	RSD: 2,86
7	400%	0,980	134024	0,909	92,73	Trung
8	400%	0,994	132885	0,901	90,69	bình: 92,25
9	400%	0,961	132255	0,897	93,33	RSD: 1,50
	Trung bình (%)					93,21
	RSD (%)					2,32

4. Kết luận

Kết quả khảo sát chọn được các điều kiện phân tích của hệ thống UPLC phù hợp về cột là thép không gỉ C18 (15 cm x 4,6 cm, 5 µm), pha động gồm acetonitril và acid acetic 2% (50/50, v/v), detector (425 nm), tốc độ dòng là 1,2 ml/phút, nhiệt độ là 40 °C, thể tích tiêm mẫu là 200 µl. Kết

- Độ lặp lại: Kết quả ở bảng 3 và sắc ký đồ trên hình 6 cho thấy với các điều kiện sắc ký và quy trình xử lý mẫu như ở mục 3.1, kết quả của 6 lần định lượng curcumin trong mẫu thử tự tạo cho độ lặp lại với RSD = 1,15% (RSD ≤ 3%). Như vậy, phương pháp phân tích có độ lặp lại tốt.

- Độ đúng và khoảng xác định: Tiến hành sắc ký theo các điều kiện sắc ký và quy trình xử lý mẫu như ở mục 3.1 với các mẫu chuẩn bị có độ đúng 10%, 100%, 400%. Kết quả về độ đúng của phương pháp được trình bày ở bảng 4 cho thấy dung dịch độ đúng 10% với khả năng thu hồi curcumin đạt 92,53%, độ lặp lại RSD = 2,02%; dung dịch độ đúng 100% với khả năng thu hồi curcumin đạt 94,83%, độ lặp lại RSD = 2,86%; dung dịch độ đúng 400% với khả năng thu hồi curcumin đạt 92,25%, độ lặp lại RSD = 1,50%. Kết quả này cho thấy tại nồng độ curcumin từ 10% đến 400% so với nồng độ định lượng có độ đúng tốt với tỷ lệ thu hồi: 92,25-94,83% (90%-110%), độ lặp lại cao với RSD = 1,50-2,86% (RSD ≤ 3%). Như vậy, khoảng xác định của phương pháp là trong giới hạn từ 10% đến 400% so với nồng độ định lượng. Từ kết quả độ đúng suy ra khoảng xác định từ 0,021 đến 0,961 µg/ml.

qua thẩm định cho thấy trong khoảng nồng độ 0,025-1,01 µg/ml, có sự tương quan tuyến tính chặt giữa diện tích pic và nồng độ dung dịch với hệ số xác định $R^2 = 0,9965$. Phương pháp UPLC cho tương thích hệ thống tốt với các thông số sắc ký có RSD < 2%. Phương pháp được thẩm định cho độ đặc hiệu cao, có độ lặp lại tốt với RSD = 1,15%, giới hạn phát hiện là 0,006 µg/ml, giới hạn định lượng là 0,0198 µg/ml, có độ đúng tốt với tỷ lệ thu hồi 92%-95% và khoảng xác định 0,021-0,961 µg/ml. Phương pháp phân tích phù hợp để định lượng curcumin trong huyết tương thỏ.

Lời cảm ơn

Kết quả nghiên cứu được tài trợ kinh phí từ đề tài KHCN cấp Bộ, mã số: B2017-SP2-09. Xin trân trọng cảm ơn các thành viên đề tài đã đóng góp thực hiện các nội dung nghiên cứu.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- [1]. M. Mimeault, S. K. Batra, "Potential applications of curcumin and its novel synthetic analogs and nanotechnology-based formulations in cancer prevention and therapy", *Chin Med.*, Vol. 6, pp. 1-19, 2011.
- [2]. R. A. Sharma, A. J. Gescher, W. P. Steward, "Curcumin: The story so far", *European Journal of Cancer*, Vol. 41, No. 13, pp. 1955-1968, 2005.
- [3]. L. Hu, Y. Shi, J. H. Li, N. Gao, J. Ji, F. Niu, Q. Chen, X. Yang, S. Wang, "Enhancement of oral bioavailability of curcumin by a novel solid dispersion system", *AAPS PharmSciTech*, Vol. 16, No. 6, pp. 1327-1334, 2015.
- [4]. G. Shoba, D. Joy, T. Joseph, M. Majeed, R. Rajendran, P. S. Srinivas, "Influence of piperine on the pharmacokinetics of curcumin in animals and human volunteers", *Planta Medica*, Vol. 64, No. 4, pp. 353-356, 1998.
- [5]. M. Sun, X. Su, B. Ding, X. He, X. Liu, A. Yu, H. Lou, G. Zhai, "Advances in nanotechnology-based delivery systems for curcumin", *Nanomedicine (Lond)*, Vol. 7, No. 7, pp. 1085-1100, 2012.
- [6]. L. Hu, D. Kong, Q. Hu, N. Gao, S. Pang, "Evaluation of high-performance curcumin nanocrystals for pulmonary drug delivery both in vitro and in vivo", *Nanoscale Res Lett.*, Vol. 10, No. 1, pp. 1-9, 2015.
- [7]. V. Kakkar, S. Singh, D. Singla, S. Sahwney, A. S. Chauhan, G. Singh, I. P. Kaur, "Pharmacokinetic applicability of a validated liquid chromatography tandem mass spectroscopy method for orally administered curcumin loaded solid lipid nanoparticles to rats", *J. Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci.*, Vol. 878, No. 32, pp. 3427-3431, 2010.
- [8]. J. Li, Y. Jiang, J. Wen, G. Fan, Y. Wu, C. Zhang, "A rapid and simple HPLC method for the determination of curcumin in rat plasma: assay development, validation and application to a pharmacokinetic study of curcumin liposome", *Biomed Chromatogr.*, Vol. 23, No. 11, pp. 1201-1207, 2009.
- [9]. Z. Ma, A. Shayeganpour, D. R. Brocks, A. Lavasanifar, J. Samuel, "High-performance liquid chromatography analysis of curcumin in rat plasma: application to pharmacokinetics of polymeric micellar formulation of curcumin", *Biomed Chromatogr.*, Vol. 21, No. 5, pp. 546-552, 2007.
- [10]. A. Mishra, G. Dewangan, W. R. Singh, S. Hazra, T. K. Mandal, "A simple reversed phase high-performance liquid chromatography (RP-HPLC) method for determination of curcumin in aqueous humor of rabbit", *J. Adv. Pharm. Technol. Res.*, Vol. 5, No. 3, pp. 147-149, 2014.
- [11]. Nguyễn Xuân Thành, "Nghiên cứu một số đặc tính của mạng lưới 3D-nano-cellulose nạp curcumin được sản xuất từ vi khuẩn *Acetobacter xylinum*", *Tạp chí Khoa học và Công nghệ - Đại học Thái Nguyên*, T. 184, S. 08, tr. 83-88, 2018.
- [12]. Nguyễn Xuân Thành, "Đánh giá sự giải phóng curcumin của vật liệu cellulose vi khuẩn nạp curcumin định hướng dùng qua đường uống", *Tạp chí Khoa học và Công nghệ - Đại học Thái Nguyên*, T. 184, S. 08, tr. 17-21, 2018.
- [13]. Food and Drug Administration, *Guidance for Industry: Bioanalytical Method Validation*, U.S. Department of Health and Human Services, pp. 4-17, 2013.
- [14]. International Conference on Harmonization of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use, *Validation of analytical procedures: Text and Methodology*, Q2B, 2005.

