

Xây dựng tiêu chuẩn kỹ thuật chế phẩm chứa hoạt chất nanocurcumin dạng liposom

Nguyễn Tường Vân¹, Vĩnh Định²

¹Khoa Dược, Đại học Nguyễn Tất Thành, ²Khoa Dược, Đại học Y Dược Tp. Hồ Chí Minh
tuongvan_nguyen1990@ymail.com, npvdinh@yahoo.com

Tóm tắt

Nghiên cứu tập trung xây dựng tiêu chuẩn kỹ thuật cho viên nang mềm chứa hoạt chất nanocurcumin dạng liposom. Viên nang mềm chứa nanocurcumin liposom có công thức là curcumin toàn phần 15,0 mg và các tá dược sáp ong trắng, dầu cọ, lecithin, dầu đậu nành. Bước đầu tiên là tiến hành phân lập curcumin II, III từ bột nghệ bằng phương pháp sắc ký cột. Pha động là CHCl₃-MeOH có độ phân cực tăng dần. Xác định các đặc tính của curcumin II, III như màu sắc, độ tan, độ tinh khiết (sắc ký lớp mỏng, quét nhiệt vi sai, sắc ký lỏng) và cấu trúc chất thu được (phổ hồng ngoại, phổ khối, phổ cộng hưởng từ hạt nhân). Sau đó sử dụng curcumin phân lập được và chuẩn curcumin I (Chromadex, USA) để thẩm định quy trình định lượng đồng thời curcumin I, curcumin II và curcumin III. Xây dựng tiêu chuẩn kỹ thuật cho viên nang mềm chứa nanocurcumin gồm có các chỉ tiêu hình thức, độ đồng đều khối lượng, độ hòa tan, kích thước hạt, định tính, định lượng.

Nhận 16.12.2017
Được duyệt 15.01.2018
Công bố 01.02.2018

Từ khóa
nghệ, curcumin, sắc ký cột, sắc ký lỏng hiệu năng cao, kích thước hạt

© 2018 Journal of Science and Technology - NTTU

1. Đặt vấn đề

Curcuminoid, thành phần trong củ nghệ, tạo nên màu vàng đặc trưng của củ nghệ, làm gia vị thức ăn, được chiết từ phần rễ củ của *Curcuma longa* L. Zingiberaceae. Danh từ curcuminoid thường được dùng đại diện cho curcumin I, curcumin II, curcumin III tìm trong dịch chiết nghệ. Curcuminoid có nhiều công dụng chữa bệnh, vị thuốc trong các bài thuốc cổ truyền của người Ấn Độ. Curcumin, chiếm từ 2 – 5 %, là chất có hoạt tính sinh học nhiều nhất trong các curcuminoid [1]. Tuy nhiên, các bằng chứng lâm sàng trên người khỏe và người bệnh đều cho thấy sinh khả dụng đường uống của các curcuminoid thấp. Gần đây có nhiều nghiên cứu dược động học ở người, thực hiện trên đối tượng nanocurcumin, dạng bào chế hạt nano của curcumin, có kích thước hạt từ 1 – 100 nm [2]. Khi so sánh sinh khả dụng của nanocurcumin và dịch chiết curcumin (chứa 95 % curcuminoid), cho thấy khi được bảo vệ trong lớp acid béo, và bao bọc bên ngoài là một lớp chất nhũ hóa thân nước, giúp tăng khả năng phân bố của curcumin trong cơ thể, đặc biệt là curcumin bị giải phóng chậm hơn, không bị chuyển hóa ở dạ dày và gan, do đó giúp tăng sinh khả dụng.[3] Các chế phẩm chứa curcumin lưu hành ngày càng nhiều trên thị trường. Để phát huy những ưu điểm của dạng bào chế đặc biệt này, các chế phẩm cần phải đảm bảo kích

thước hạt phù hợp (1 – 100 nm), ổn định trong quá trình bảo quản. Hiện nay được diễn chưa có chuyên luận quy định về chế phẩm chứa hoạt chất dưới dạng tiểu phân nano nói chung và hoạt chất nanocurcumin nói riêng. Do đó, trong phạm vi đề tài tốt nghiệp cao học này, “*Xây dựng tiêu chuẩn cơ sở viên nang mềm chứa nanocurcumin*” là mục tiêu cần đạt được. Đồng thời có áp dụng để kiểm tra chế phẩm lưu hành trên thị trường hiện nay.

2. Nguyên vật liệu và phương pháp nghiên cứu

2.1 Nguyên liệu

- Bột nghệ nguyên liệu điều chế nanocurcumin dạng liposom (số lô KH/CL/E006/13, 95% curcuminoid)
- Viên nang mềm CLINOVA chứa curcumin toàn phần 15,0 mg và các tá dược Sáp ong trắng, Dầu cọ, Lecithin, Dầu đậu nành.
- Chế phẩm viên nang mềm CLINOVA chứa hoạt chất là các curcuminoid dạng nanoliposom. Mỗi viên nang mềm có chứa 250 mg nanocurcumin 6% (kl/kl) (tương ứng 15 mg curcuminoid dạng nano) và một số tá dược: sáp ong trắng, dầu cọ, lecithin, dầu đậu nành.

Chất chuẩn:

Curcumin I, SKS: 00003927, HL: 99,26 % (ChromaDex, USA).

Hóa chất, dung môi:

Acetonitril, Methanol, Nước cất 2 lần, Acid acetic băng, Kalidihydro phosphat, Natri hydroxyd, Chloroform, Benzen, Dichloromethan, Ethylacetat (tinh khiết phân tích).

Trang thiết bị:

Máy quang phổ Hồng ngoại Thermo scientific iS50, Máy DSC, Máy NMR AVANCE 500, Máy đo khối phổ 910 TQ-FTMS.

2.2 Phương pháp nghiên cứu

Phân lập các curcumin từ bột nghệ nguyên liệu bằng sắc ký cột với hệ dung môi CHCl_3 -MeOH có độ phân cực tăng dần. [4]

Xác định các đặc tính:

- Màu sắc và độ tan. [4]
- Độ tinh khiết [4]: phương pháp sắc ký lớp mỏng (với ba hệ dung môi có độ phân cực khác nhau), phương pháp quét nhiệt vi sai và phương pháp sắc ký lỏng (theo phần trăm diện tích pic)
- Điều kiện sắc ký [5]
 - Đầu dò: PDA2998, $\lambda = 420 \text{ nm}$
 - Cột: Luna® 5 μm C18, 100 Ao
 - Pha động: Acid acetic 2 % - Acetonitril (55:45)
 - Thể tích tiêm: 10 μL
 - Tốc độ dòng: 1 mL/phút
 - Nhiệt độ cột: 25 oC

• Xác định cấu trúc: [6]

• Phổ hồng ngoại

• Phổ khối

• $^1\text{H-NMR}$ and $^{13}\text{C-NMR}$

Xây dựng và thẩm định quy trình định lượng đồng thời 3 curcumin. Áp dụng điều kiện sắc ký trong phương pháp thử độ tinh khiết.

Đo kích thước hạt: pha loãng dung dịch thuốc khoảng 100 lần rồi đo kích thước hạt bằng máy Zetasizer của Malvern [7]

Thử độ hòa tan: thử độ hòa tan trong môi trường đệm phosphat pH 6,8 (pha theo ĐDVN IV)

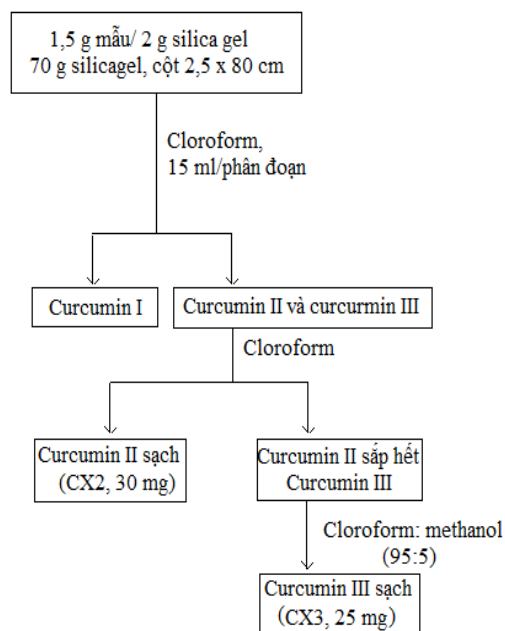
Xác định các chỉ tiêu kỹ thuật cần thiết cho chế phẩm chứa nanocurcumin liposom. Các tiêu chuẩn này được thiết lập dựa trên các kết quả phân tích của quy trình định tính, định lượng, thử độ hòa tan và xác định kích thước hạt.

3. Kết quả và bàn luận**3.1 Phân lập**

Phân lập curcumin từ bột nghệ nguyên liệu bằng sắc ký cột với hệ dung môi CHCl_3 -MeOH có độ phân cực tăng dần

Tiến hành sắc ký cột hỗn hợp 3 curcumin bằng phương pháp sắc ký cột cổ điển với pha động có độ phân cực tăng dần. Lập lại quy trình phân lập 2 lần. Gộp và trộn đều sản phẩm phân lập thu được tổng cộng 60 mg CX2 (hiệu suất 2,0 %), 50 mg CX3 (hiệu suất 1,67 %). Methanol giúp

curcumin II và III ra nhanh hơn, dung môi này cũng làm cho các tạp màu lẫn vào phân đoạn curcumin II và curcumin III. Vì vậy, methanol được dung chủ yếu vào giai đoạn tách curcumin III.

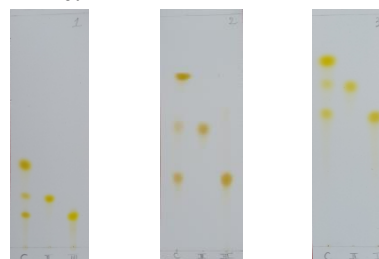


Sơ đồ 1 Quy trình phân lập CX2, CX3 từ bột nghệ

3.2 Xác định các đặc tính của CX2 và CX3**3.2.1 Độ tan**

CX2 là tinh thể dạng bột, màu đỏ cam, ít tan trong cloroform, tan trong methanol và dimethylsulfoxid.

CX3 là tinh thể dạng bột, màu vàng nhạt, ít tan trong cloroform, tan trong methanol và dimethylsulfoxid.

3.2.2 Độ tinh khiết

(1) (2) (3)
Sắc ký lớp mỏng CX2 và CX3

Tinh khiết sắc ký lớp mỏng. Tiến hành sắc ký CX2 và CX3 với ba hệ dung môi có độ phân cực khác nhau.

(1): Benzen-Cloroform-Methanol (25:70:5)

(2): Cloroform – Acid aceticbăng (90:10)

(3): Dicloromethan-Ethyl acetat-Methanol (95:5:5)

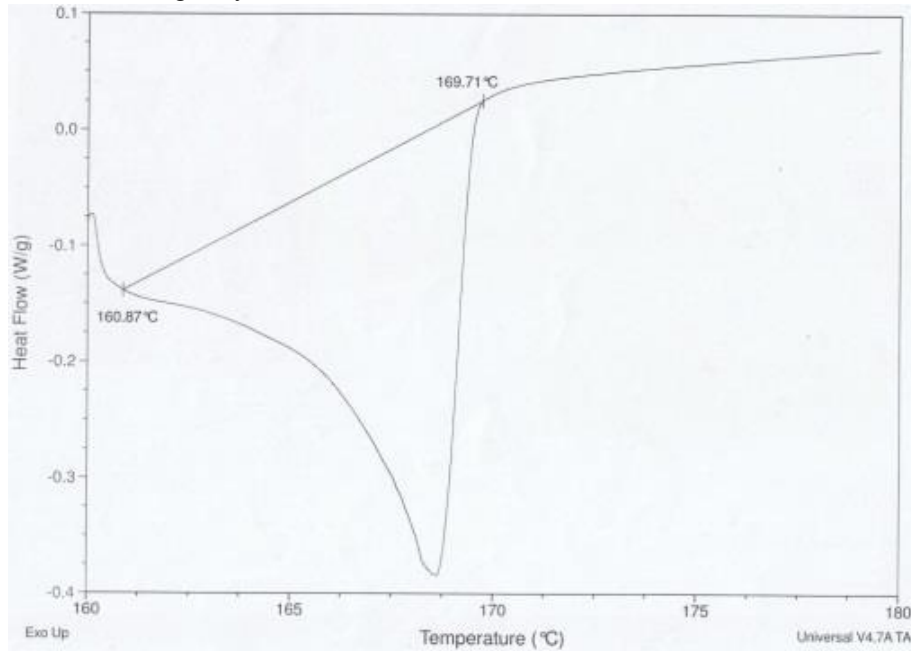
Phát hiện bằng mắt thường.

CX2 và CX3 cho một vết trên bản mỏng. Vậy chất phân lập được đạt độ tinh khiết sắc ký lớp mỏng.

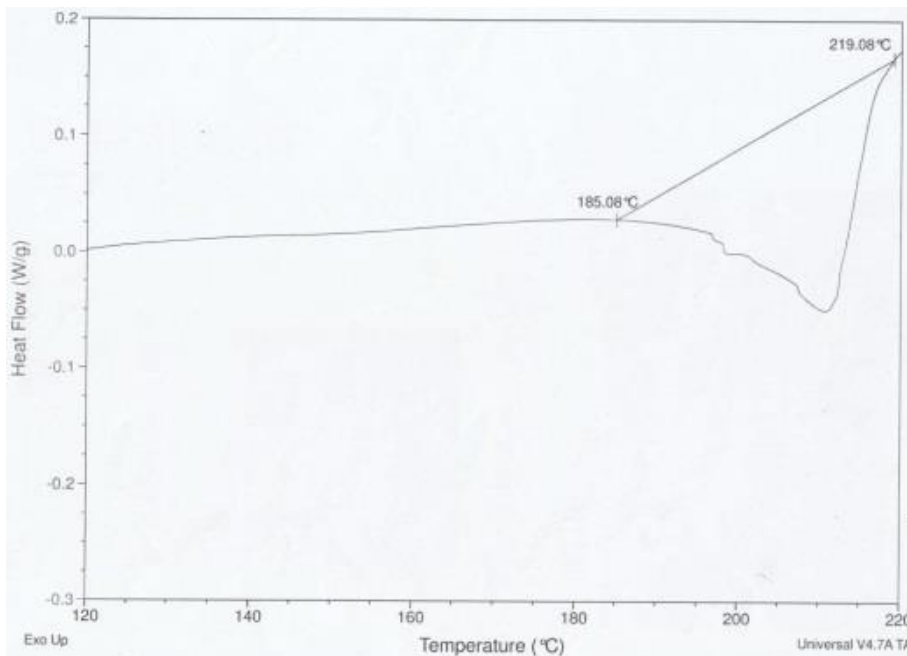
Xác định độ tinh khiết bằng kỹ thuật quét nhiệt vi sai

Xác định nhiệt độ nóng chảy và độ tinh khiết của chất phân lập bằng quét nhiệt vi sai-DSC. Curcumin II và Curcumin III tinh khiết có nhiệt độ nóng chảy lần lượt là 172 °C và

222 °C. Dựa vào đó, bằng kỹ thuật DSC xác định nhiệt độ nóng chảy của CX2 và CX3 lần lượt là 169,71 °C và 219,08 °C, với độ tinh khiết lần lượt là 99,45 % và 98,30 %.



a)



b)

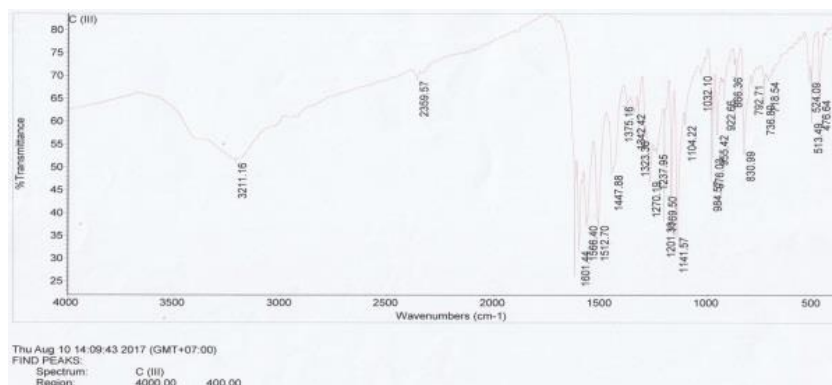
Hình 1 Phổ DSC của CX2 (a) và CX3 (b)

3.2.3 Xác định cấu trúc bằng phương pháp phổ

Phổ hồng ngoại

Phổ IR của CX2 và CX3 có các dao động đặc trưng tương tự nhau vì có các nhóm chức giống nhau của nhóm O-H

(3331,0 cm^{-1}), C=O (1625 cm^{-1}), C=C anken (1602 cm^{-1}), C=C aren (1573 cm^{-1}), C-H aren thế para (826 cm^{-1}). Riêng CX3 không cho đỉnh hấp thụ của liên kết C-H alkan (3000-2800 cm^{-1})

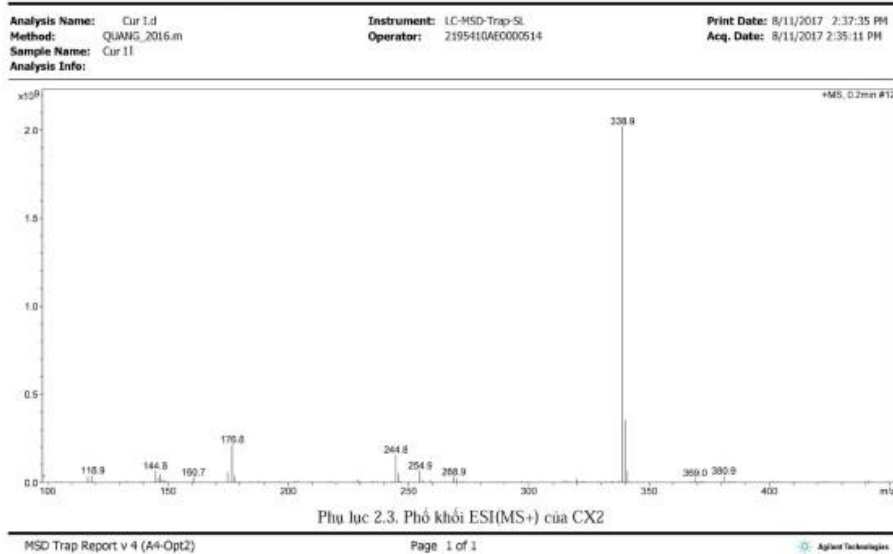


Hình 2 Phổ IR của CX3

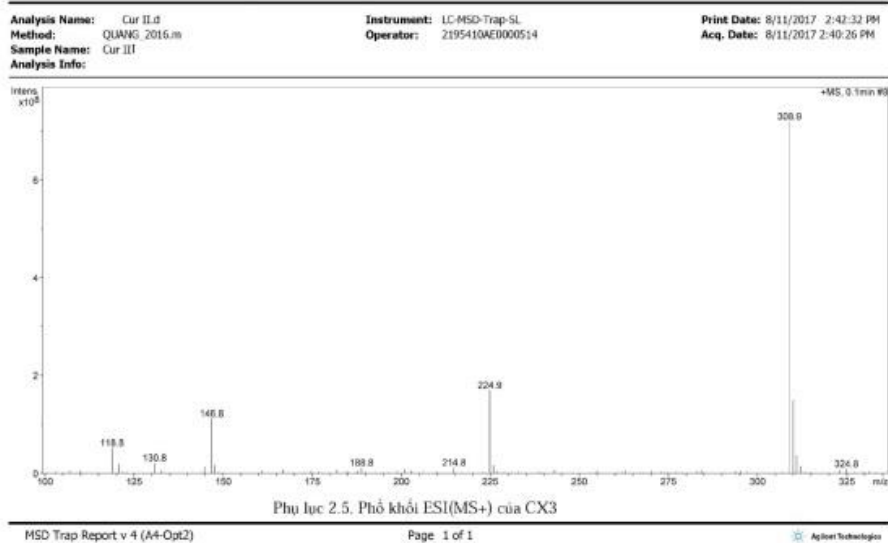
Phổ khối

Khối lượng phân tử của CX2 và CX3 lần lượt là 338,9 đ.v.C và 308,9 đ.v.C

Display Report - Selected Window Selected Analysis



Display Report - Selected Window Selected Analysis



Hình 3 Phổ khối ESI MS⁺ của CX2 (trái, M = 338,9), của CX3 (phải, M = 308,9)

Phổ khối ESI⁺ của CX2 và CX3 cho các pic cơ bản lần lượt là 338,9 và 308,9 gần với số khối của curcumin II và curcumin III.

Phổ cộng hưởng từ hạt nhân

Bảng 1: Phổ ¹H-NMR (DMSO, 500 MHz) của CX2, CX3 so với TLTK (200 MHz, DMSO)

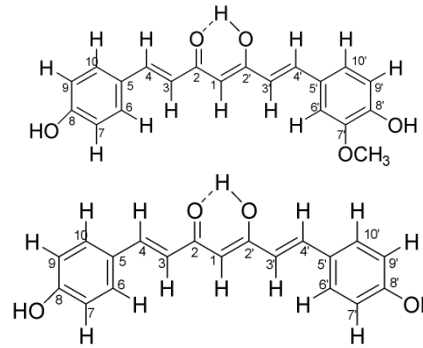
Vị trí	CX2 (ppm; j Hz)	Curcumin II [6]	CX3 (ppm; j Hz)	Curcumin III [6]
OCH ₃	3,836 (s)	3,82		
1	6,048 (s)	6,02	6,047 (s)	5,99 (s)
3	6,682 (d; 16 Hz)	6,67 (d; 15 Hz)	6,682 (d; 16 Hz)	6,67 (d; 15,8 Hz)
3'	6,749 (d; 16 Hz)	6,67 (d; 15 Hz)		
9'; 9'	6,815 (d; 7,5 Hz)	6,81 (d; 8 Hz)		
7	6,828 (d; 1,5 Hz)	N/A	6,818 (d; 8,5 Hz)	6,91 (d; 8,5 Hz)
7'				
10	7,140 (dd; 8; 2 Hz)	6,91 (d; 8 Hz)		
10'	7,315 (dd; 8; 2 Hz)	7,13 (dd; 8 Hz)	7,558 (d; 8,5 Hz)	7,57 (d; 8,5 Hz)
6, 6'	7,561 (dd; 8; 4 Hz)	7,31 (d, 2 Hz)		
4	7,537 (d; 16 Hz)	7,53 (d, 15 Hz)	7,539 (d; 16 Hz)	7,61 (d; 15,8 Hz)
4'	7,545 (d, 16 Hz)	7,53 (d, 15 Hz)		
8, 8'			10,066	

Bảng 2 Phổ ¹³C-NMR (DMSO, 125 MHz) của CX2, CX3 so với TLTK (200 MHz, DMSO)

Vị trí	CX2	Curcumin II [6]	Vị trí	CX3	Curcumin III [6]
	55,69	55,7			
1	100,85	100,9	1	100,90	100,9
6	111,27	111,2	7; 7'; 9; 9'	115,93	115,9
9	115,68	115,7	3; 3'	120,83	121,1
9'; 7	115,90	115,7 / 115,9	5; 5'	125,86	126,8
3	120,83	120,8	6; 6'; 10; 10'	130,31	130,0
3'	121,04	121,1	4; 4'	140,36	140,1
10, 10'	123,15	123,2 / 123,1	8; 8'	159,78	159,7
5	125,81	125,8	2; 2'	183,21	183,2
5'	126,34	126,4			
6'	130,30	130,4			
4	140,34	140,4			
4'	140,67	140,7			
7'	147,99	148,0			
8	149,34	149,8			
8'	159,78	159,8			
2	183,11*	183,1			
2'	183,25*	183,2			

Dữ liệu phổ UV ($\lambda_{max} = 420 \text{ nm}$), IR và NMR chứng tỏ CX2 tương ứng với Curcumin II có công thức phân tử C₂₀H₁₈O₅. Phổ ¹³C-NMR của CX3 cho thấy mất tín hiệu cộng hưởng ở $\delta = 55,69 \text{ ppm}$ của C Methoxy. Dữ liệu phổ UV, IR và NMR chứng tỏ CX3 tương ứng với curcumin III

có công thức phân tử C₁₉H₁₆O₄. Cấu tạo của curcumin II và III như sau



Công thức cấu tạo của demethoxy curcumin và bisdemethoxy curcumin

Phổ ¹H-NMR của CX2: ba proton methoxy, một proton alken, bốn proton của bốn C lai hoá *sp*² cấu hình *trans*, bảy proton nhân thơm. Phổ ¹³C-NMR của CX2 có 18 tín hiệu cộng hưởng của 20 carbon, một carbon methoxy, một C_β của nhóm diketon, bốn C lai hoá *sp*², hai nhóm carbonyl, các C lai hoá *sp*² nằm trong vùng dịch chuyển hoá học của nhân thơm. Kết quả dữ liệu phổ IR, MS và NMR của CX2 hoàn toàn phù hợp với cấu trúc của curcumin II [6].

Phổ ¹H-NMR của CX3: không có tín hiệu của proton methoxy, một proton alken, bốn proton của bốn C lai hoá *sp*² cấu hình *trans*, bốn proton nhân thơm, bốn proton nhân thơm, hai proton nhóm hydroxyl. Phổ ¹³C-NMR của CX3: có 8 tín hiệu cộng hưởng của 19 carbon, một C_β của nhóm Diketon, hai C nhóm carbonyl, các C lai hoá *sp*² nằm trong vùng dịch chuyển hoá học của nhân thơm và alken có cùng môi trường hoá học (hay có sự đối xứng trong phân tử) nên tín hiệu tăng gấp đôi hay gấp bốn so với tín hiệu của C của nhóm diketon ở $\delta = 100,90 \text{ ppm}$. Kết quả dữ liệu phổ IR, MS và NMR của CX3 hoàn toàn phù hợp với cấu trúc của curcumin II [6].

3.3 Thẩm định quy trình định lượng đồng thời curcumin I, curcumin II, curcumin III

3.3.1 Tính tương thích hệ thống

Tiêm 6 lần mỗi dung dịch chuẩn curcumin I 20 µg/ml, curcumin II 20 µg/ml, curcumin III 20 µg/ml vào hệ thống sắc ký lỏng. Ghi nhận các thông số thời gian lưu (t_R), diện tích đỉnh (S), hệ số bất đối (As), hệ số dung lượng (k'), số đĩa lý thuyết (N) của 6 lần tiêm để tính kết quả phân tích tính tương thích hệ thống.

Tính tương thích hệ thống HPLC khi phân tích ba curcumin đạt yêu cầu để thẩm định quy trình phân tích với các giá trị % RSD, hệ số đối xứng, số đĩa lý thuyết, hệ số dung lượng đạt theo tiêu chuẩn chấp nhận.

3.3.2 Tính đặc hiệu

Tiêm các dung dịch mẫu Trắng, BI (curcumin I 20 µg/ml), BII (curcumin II 20 µg/ml), BIII (curcumin III 20 µg/ml), D (20 µg/ml của mỗi curcumin), mẫu Thử và mẫu Thử thêm

chuẩn. Trên sắc ký đồ mẫu thử, pic curcumin I, curcumin II, curcumin III có thời gian lưu lần lượt khoảng 22,601 phút, 20,97 phút, 18,75 phút, trùng với thời gian lưu pic của curcumin I, curcumin II, curcumin III trong dung dịch chuẩn. Mẫu trắng không có pic ở vị trí này.

3.3.3 Độ chính xác

Phân tích 6 dung dịch mẫu thử khác nhau nhưng có nồng độ giống nhau. Dựa vào kết quả phân tích, ghi nhận các thông số cho mỗi curcumin: thời gian lưu (t_R), diện tích pic (S). Hàm lượng viên trong 6 lần định lượng có kết quả lặp lại, vậy quy trình có tính chính xác.

3.3.4 Tính tuyến tính

Tiêm các dung dịch chuẩn chung của curcumin I, curcumin II, curcumin III ở 6 mức nồng độ 5, 10, 20, 25, 100, 200 $\mu\text{g/ml}$. Ghi nhận diện tích pic. Vẽ đường biểu diễn sự phụ thuộc diện tích pic theo nồng độ. Đường tuyến tính của ba curcumin có hệ số tương quan $R^2 \geq 0,995$.

3.3.5 Độ đúng

Thêm vào các dung dịch chuẩn curcumin ở 3 mức nồng độ 100 %, 120 %, 150 % lượng curcumin trong mẫu thử. Tính độ phục hồi, tỉ lệ phần trăm lượng chuẩn phát hiện được so với lượng thực tế cho vào. Độ phục hồi của curcumin I, curcumin II, curcumin III từ 94 – 105 %. Quy trình có độ phục hồi tốt.

Quy trình định lượng sử dụng chuẩn curcumin I (USP) và curcumin II, curcumin III phân lập được. Kết quả cho thấy quy trình đạt tính phù hợp hệ thống, đặc hiệu, độ chính xác, tính tuyến tính và độ đúng. Có thể áp dụng quy trình để định lượng đã thẩm định trên chế phẩm chứa curcumin liposom (M. Hasan và cộng sự, 2013).

3.4 Định tính và định lượng curcumin trong chế phẩm

3.4.1 Định tính

Theo sắc ký đồ mẫu thử, có 3 pic ứng với thời gian lưu của 3 curcumin trong mẫu chuẩn. Vậy mẫu thử có chứa curcumin I, curcumin II, curcumin III.

3.4.2 Định lượng

Hàm lượng curcumin toàn phần là 121,39 % so với hàm lượng ghi trên nhãn.

3.5 Độ hòa tan

So sánh độ hòa tan ở 30 phút, 45 phút, 60 phút. Ở thời điểm 30 phút, viên giải phóng trên 70% hoạt chất, tiến hành đo độ hòa tan của 6 viên. Tất cả đều giải phóng trên 70 % hoạt chất.

3.6 Kích thước hạt

Chế phẩm có kích thước hạt trung bình 14,54 nm và PDI < 0,2.

Một sản phẩm tốt phải có kích thước hạt nhỏ nanomet, đồng đều và bền trong quá trình bào chế. Kết quả đo kích thước hạt trên chế phẩm cho thấy, hạt nanocurcumin có kích thước trung bình là 14,54 nm, PDI < 0,2.

3.7 Yêu cầu chất lượng

Hình thức: viên nang mềm màu vàng, bề mặt viên lạnh lặn, không mùi không vị, Độ đồng đều khối lượng: $\pm 7,5$ % khối lượng trung bình viên

Độ hòa tan: ít nhất 70 % lượng curcumin toàn phần so với lượng ghi trên nhãn được hòa tan trong thời gian không quá 30 phút

Định tính: sắc ký đồ dung dịch chế phẩm có 3 pic với thời gian lưu tương ứng thời gian lưu của curcumin I, II, III chuẩn.

Định lượng: hàm lượng curcumin toàn phần không thấp hơn lượng ghi trên nhãn

4. Kết luận và đề xuất

Chúng tôi đã đạt được mục tiêu đề ra với các kết quả sau:

Đã phân lập được CX2 (xác định là curcumin II), CX3 (xác định là curcumin III) có nhiệt độ nóng chảy lần lượt là 169,71 °C và 219,08 °C với độ tinh khiết lần lượt là 99,45 % và 98,30 % bằng kỹ thuật DSC. Việc phân lập curcumin II, curcumin III bằng SK cột đơn giản và có thể áp dụng trên quy mô điều chế để thiết lập chất đối chiếu.

Đã xây dựng và thẩm định quy trình định lượng đồng thời các curcuminoid và ứng dụng trên chế phẩm chứa nanocurcumin liposom. Quy trình định lượng được xây dựng chủ yếu bằng phương pháp SKLHNC với đầu dò PDA. Các điều kiện sắc ký được chọn dựa vào 4 tiêu chí là thành phần dung môi đơn giản, an toàn; cột sắc ký phổ biến; thời gian lưu < 30 phút và độ phân giải giữa các pic curcumin > 2. Việc thẩm định quy trình thực hiện theo hướng dẫn thường quy.

Thử độ hòa tan viên nang mềm nanocurcumin liposom trong môi trường đệm phosphate pH 6,8.

Xác định kích thước hạt của dung dịch thuốc trong viên nang mềm chứa nanocurcumin dạng liposom bằng thiết bị zetasizer (Malvern).

Xây dựng tiêu chuẩn cơ sở cho chế phẩm chứa nanocurcumin gồm các chỉ tiêu: hình thức, độ đồng đều khối lượng, độ hòa tan, định tính, định lượng.

Tài liệu tham khảo

1. GRAS Notice (GRN) No. 460 (2013), “*Determination of the generally recognized as safe (gras) status of curcumin (curcumin C3 complex ®) as a food ingredient*”, FDA, USA, pp.14–45.
2. Dong Liu (2013), “Engineering nano-curcumin with enhanced solubility and in-vitro anti-cancer bioactivity”, Rutgers, The State University of New Jersey, US, pp 12-40.
3. Yadav Vivek Ramshankar, Sarasija Suresh (2009), “A Sensitive Reversed Phase HPLC Method for the Determination of Curcumin”, *Pharmacognosy margazine*, Al-Ameen college of Pharmacy, 5(17), pp.71-74
4. Trần Thị Ngân, Nguyễn Ngọc Vinh (2013), *Phân lập chất đối chiếu curcuminoid từ nghệ đỏ Rhizoma Curcumae xanthorrhizae*, Kỹ yếu công trình nghiên cứu khoa học 2008-2014, Viện Kiểm nghiệm thuốc Tp Hồ Chí Minh, trang 246-248.
5. L. Péret-Almeida, A.P.F. Cherubino (2005), “Separation and determination of the physico-chemical characteristics of curcumin, demethoxycurcumin and bisdemethoxycurcumin”, *Food Research International*, **38**, 1039–1044.
6. Malvern (2004), Zetasizer Nano Series User Manual, chapter 13 – 15, Malvern Instruments Ltd, UK, pp.193-202.
7. Luciano Brushi Marcos (2015), *Strategies to Modify the Drug Release from Pharmaceutical Systems*, Biomedicine, CRC Press, pp. 56

Establishing technical specifications for softgel capsules containing nanocurcumin

Nguyen Tuong Van¹, Vinh Dinh²

¹Faculty of Pharmacy, Nguyen Tat Thanh University

²Faculty of Pharmacy, University of Medicine and Pharmacy at Ho Chi Minh City

Abstract The aim of this research was to development of technical specification of softgel containing curcumin nanoliposom. Curcumin nanoliposom contains Curcuminoid 15.0 mg in form of nanoliposome and recipients (White bee wax, palm oil, lecithin, soybean oil). The procedure firstly isolate demethoxy curcumin, bisdemethoxy curcumin from *Curcuma longa* powder extract by column chromatography. The mobile phase is CHCl₃-MeOH with mobile phase having increasing polarity. Determine characteristics of isolated demethoxy curcumin, bisdemethoxy curcumin: color, solubility, purity (Thin layer chromatography, Differential Scanning Calorimetry and HPLC), structures (IR, MS, ¹H-NMR and ¹³C-NMR). Using the two curcumin isolated and curcumin (Chromadex, USA) to validate the simultaneous determination of Curcumin, Demethoxy curcumin, Bisdemethoxy curcumin by RP-HPLC method with PDA detector. Establish technical specifications for soft capsules containing nanocurcumin liposome including form, uniformity of weight, solubility test, partical size, identification and assay.

Keywords Turmeric, curcumin, column chromatography, high performance chromatography, particle size