

ĐỊNH LƯỢNG CURCUMINOID TRONG MỘT SỐ SẢN PHẨM THỰC PHẨM CHỨC NĂNG BẰNG PHƯƠNG PHÁP SẮC KÝ LỎNG HIỆU NĂNG CAO (HPLC)

Đến tòa soạn 3-10-2018

Nguyễn Thị Thu Minh, Nguyễn Duy Khánh, Nguyễn Tiến Đạt,
Phạm Văn Cường, Nguyễn Hải Đăng

Trung tâm tiên tiến về Hóa sinh hữu cơ, Viện Hóa sinh biển,
Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam

SUMMARY

Curcuminoid, curcumin, bisdemethoxycurcumin, demethoxycurcumin, HPLC, định lượng.

Curcuminoid, a major component of tumeric Curcuma longa L., consists of three compounds curcumin, demethoxy curcumin and bisdemethoxy curcumin. These substances have been known for various bio-pharmacological activities including anti-tumor, wound healing, and anti-gastrointestinal diseases. There has been increasing presence of curcuminoid in the functional food market. With the current extraction technology, the naturally derived curcuminoid usually contains all three components. In this paper, we developed and validated a method for quantification of curcuminoid in functional foods and applied the evaluation on various background samples. The results show that the method has a linearity of $R^2 \geq 0.9999$, LODs of 7 - 26 ng/mL, LOQs of 20 - 80 ng/mL with good precision and accuracy. Evaluation results of different samples showed that 88.1% of samples contained three components of curcuminoid, 11.9% of samples contained only curcumin. This led to doubts about the presence of synthetic curcumin in the naturally derived health food products.

Key words: Curcuminoid, curcumin, bisdemethoxycurcumin, demethoxycurcumin, HPLC, quantification.

1. ĐẶT VẤN ĐỀ

Curcuminoid tự nhiên được chiết xuất từ củ nghệ bao gồm ba hợp chất thuộc nhóm diarylheptanoid gồm: curcumin (Cur), demethoxycurcumin (DMC), và bisdemethoxycurcumin (BDMC). Trong đó, curcumin là thành phần chiếm hàm lượng cao nhất. Curcumin đã được đánh giá là nhóm chất quý, có nhiều đặc tính sinh học quan trọng như ức chế sự phát triển của khối u, tăng khả năng miễn dịch, kháng viêm, kháng khuẩn, chống oxy hóa mạnh..., nên được sử dụng hỗ trợ điều trị và phòng ngừa nhiều bệnh như tim mạch, viêm khớp, đau dạ dày, hỗ trợ điều trị ung thư [1, 2, 3]. Chính vì những hoạt tính sinh học quý báu như trên mà các sản phẩm thực phẩm chức năng (TPCN) chứa curcuminoid chiết

xuất từ củ nghệ nhận được sự quan tâm của người tiêu dùng. Thị trường TPCN có nguồn gốc từ nghệ phát triển đa dạng với nhiều dòng sản phẩm ở các dạng bào chế khác nhau như tinh bột nghệ, tinh bột curcumin, nanocurcumin dạng viên, dạng thuốc uống... đem lại nhiều sự lựa chọn cho người tiêu dùng. Tuy nhiên, thị trường TPCN nước ta còn khá mới, cơ cấu quản lý thị trường còn chưa chặt chẽ. Sự phát triển nhanh và ồ ạt của các đơn vị sản xuất và cung cấp các sản phẩm có nguồn gốc từ nghệ như hiện nay cũng gây nên sự hoang mang cho người tiêu dùng về chất lượng cũng như nguồn gốc của các sản phẩm đó. Do vậy, việc phân tích định lượng curcuminoid để đánh giá chất lượng của các TPCN có nguồn gốc từ nghệ đã nhận được nhiều quan tâm của

các đơn vị. Đã có nhiều phương pháp để đánh giá chất lượng của curcuminoid được xây dựng và áp dụng thực tiễn. Trước đây, người ta thường sử dụng các phương pháp đo quang để đánh giá hàm lượng curcuminoid tổng [4]. Tuy nhiên phương pháp này không đánh giá được các thành phần. Các nghiên cứu tiếp sau sử dụng phương pháp sắc ký lỏng hiệu năng cao (HPLC) với đầu dò UV, DAD, huỳnh quang, MS... để định lượng 3 thành phần của curcuminoid [5, 6, 7, 8]. Một số phương pháp có khoảng tuyến tính hẹp, hoặc phương pháp không hoàn toàn phù hợp do sử dụng dung môi methanol, hoặc THF. Methanol thường có ảnh hưởng trực tiếp đến khả năng nhận dạng curcumin do tỷ lệ giữa độ nhiễu/tính đặc hiệu không cao. Một số chất đệm như THF sử dụng có thể làm đảo lộn trật tự rửa giải của 3 thành phần trên cột C-18. Vì vậy, chúng tôi thực hiện nghiên cứu này nhằm định lượng curcuminoid bằng phương pháp HPLC và áp dụng đánh giá một số sản phẩm thực phẩm chức năng trên thị trường.

2. PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Nguyên vật liệu và thiết bị nghiên cứu

- Thiết bị và dụng cụ phân tích: Hệ thống HPLC Agilent 1260 Series, detector DAD (Agilent, Santa Clara, USA), cột sắc ký Zorbax SB-C18 (4,6x150mm, 5µm), cột bảo vệ SB-C18, cân phân tích chính xác 0,0001g (Satorius, Đức), máy siêu âm (SH-100, Elma Schmidbauer GmbH, Đức), máy ly tâm (Eppendorf, USA) và các dụng cụ thí nghiệm khác.

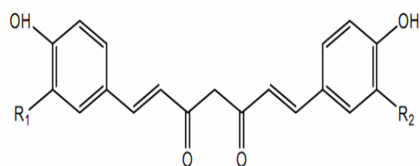
- Hóa chất, nguyên liệu:

+ Chất chuẩn Bisdemethoxycurcumin (98%) (Sigma-Aldrich, USA), Demethoxycurcumin (99,9%) (Sigma-Aldrich, USA) và Curcumin (98%) (Santa-Cruz Biotech, USA).

+ Mẫu thử: các sản phẩm chứa Curcuminoid (BDMC, DMC, Cur).

+ Dung môi: Acetonitril (ACN), methanol đạt tiêu chuẩn dùng cho HPLC (Scharlau, Tây Ban Nha), nước đạt tiêu chuẩn HPLC (MilliQ Ultra Purification system, Merck-Millipore, USA).

+ Hóa chất khác: Acetic acid (Merck, Đức).



$R_1 = R_2 = \text{OCH}_3$: Cur

$R_1 = \text{OCH}_3, R_2 = \text{H}$: DMC

$R_1 = R_2 = \text{H}$: BDMC

Hình 1: Cấu trúc 3 hợp chất thuộc nhóm curcuminoid

2.2. Thử nghiệm

2.1.1 Điều kiện sắc ký

Sau khi tham khảo tài liệu [9, 10, 11] và thử nghiệm các điều kiện với hệ dung môi, cột khác nhau, chúng tôi đã lựa chọn được điều kiện sắc ký để xây dựng và thẩm định phương pháp (Bảng 1).

Bảng 1: Điều kiện sắc ký

Pha động A	H ₂ O (0,1% acetic acid)
Pha động B	ACN
Chương trình Gradient	90%A: 10%B → 100%B trong 45 phút
Tốc độ dòng	0,5 mL/phút
Thể tích tiêm	5 µL
Thời gian chạy	45 phút
Đầu dò DAD	425

2.2.2. Khảo sát khoảng tuyến tính và xây dựng đường chuẩn

Cân chính xác 4mg ($\pm 0,1$ mg) chất chuẩn (BDMC, DMC, Cur) vào bình định mức 5 mL, hòa tan và định mức đến vạch bằng methanol thu được dung dịch chuẩn gốc nồng độ 800 µg/mL. Dãy dung dịch chuẩn BDMC, DMC, Cur được khảo sát có nồng độ sau: 0,5 µg/mL, 1 µg/mL, 2 µg/mL, 4 µg/mL, 10 µg/mL, 20 µg/mL, 40 µg/mL và 100 µg/mL. Phân tích các chuẩn nói trên theo điều kiện sắc ký đã xây dựng, lặp lại 3 lần và xác định phương trình hồi quy tuyến tính dựa vào mối tương quan giữa nồng độ và diện tích peak. Phương trình đường chuẩn có dạng: $y = ax + b$ với yêu cầu hệ số tương quan $R^2 > 0,99$. Trong đó: y là diện tích peak thu được tương ứng với nồng độ chất chuẩn x (µg/mL).

2.2.3. Chuẩn bị mẫu

Mẫu dạng bột thành phẩm, dạng bào chế sau khi được xử lý làm đồng nhất mẫu được cân chính xác 0,5g mẫu, thêm 5 mL dung môi methanol, chiết siêu âm 15 phút, ly tâm 4000v/phút trong 5 phút, hút lấy dịch chiết và lặp lại quy trình chiết 02 lần, thu dịch chiết vào bình định mức 25 mL và định mức đến vạch bằng methanol. Mẫu được lọc qua màng lọc 0,45 μm và cho vào vial 1,5 mL. Tiến hành phân tích trên hệ thống HPLC.

2.2.4. Khảo sát giới hạn phát hiện (LOD) và giới hạn định lượng (LOQ) của phương pháp

Việc xác định LOD, LOQ được thực hiện dựa trên đường chuẩn. Tiến hành phân tích lặp lại 06 lần dung dịch chứa đồng thời 03 chuẩn với nồng độ BDMC 0,5 $\mu\text{g/mL}$, DMC 1,0 $\mu\text{g/mL}$ và Cur 0,5 $\mu\text{g/mL}$, dựa vào hệ số góc của đường chuẩn để tính giá trị LOD, LOQ theo công thức:

$$\text{LOD} = \frac{3,3.SD}{a} \quad \text{LOQ} = \frac{10.SD}{a}$$

Trong đó:

- SD là độ lệch chuẩn được tính theo công

thức:
$$SD = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (x_i - x_{tb})^2}{n-1}}$$

- n là số lần phân tích lặp lại của mỗi nồng độ chuẩn i

- x_i là giá trị nồng độ mẫu tại lần đo thứ i

- x_{tb} là giá trị nồng độ trung bình của n lần đo

- a là hệ số góc của phương trình hồi quy tuyến tính ($y = a.x + b$).

2.2.5. Xác định độ lặp lại và độ tái lập nội bộ và độ không đảm bảo đo của phương pháp

- Xác định độ lặp lại:

Thực hiện phân tích lặp lại 05 lần dung dịch chuẩn BDMC, chuẩn DMC và chuẩn Cur, xác định độ lệch chuẩn tương đối (RSD) của thời gian lưu, diện tích peak của BDMC, DMC và Cur. Giá trị RSD cho phép không vượt quá 2%.

- Độ tái lập nội bộ:

Tiến hành thử nghiệm lặp lại 08 lần thí nghiệm trên mẫu nền có trộn 03 chuẩn BDMC, DMC

và Cur nồng độ 10 $\mu\text{g/mL}$ trong các ngày thí nghiệm khác nhau để xác định độ tái lập nội bộ qua độ lệch chuẩn tương đối RSD. Đối chiếu các giá trị tính được với giá trị RSD% tái lập nội bộ tối đa chấp nhận để đánh giá độ tái lập nội bộ của phương pháp.

- Độ không đảm bảo đo:

Độ không đảm bảo đo được thực hiện theo phương pháp thử nghiệm trên mẫu thực. Chuẩn bị 20 mẫu chứa đồng thời chuẩn BDMC, DMC và Cur với nồng độ 10 $\mu\text{g/mL}$, phân tích theo các ngày khác nhau trên hệ thống HPLC theo phương pháp đã xây dựng, với 2 người thực hiện để xác định hàm lượng theo đường chuẩn, tính giá trị trung bình và SD của kết quả thu được. Độ không đảm bảo đo được xác định theo công thức:

$$U(\%) = t_{\alpha,k} \cdot CV(\%)$$

Trong đó:

- U: Độ không đảm bảo đo tổng (%)

- CV: Hệ số biến thiên của kết quả đo (%)

- $t_{\alpha,k}$: Giá trị t tra bảng với mức ý nghĩa $\alpha = 0,05$; bậc tự do $k = n-1$

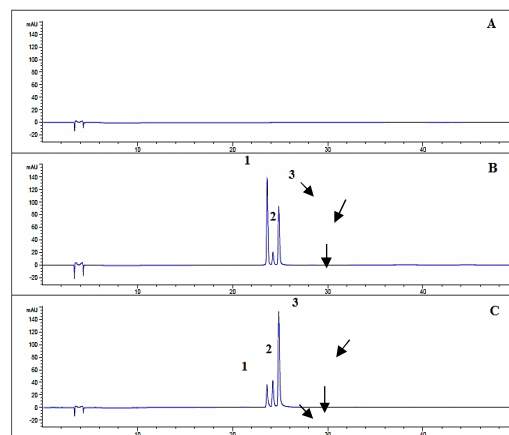
- n: Số lần phân tích lặp lại.

3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1. Thẩm định quy trình định lượng [11]

3.1.1. Độ chọn lọc và tính đặc hiệu

Tiến hành phân tích mẫu trắng, mẫu chuẩn chứa đồng thời 03 chất chuẩn BDMC, DMC và Cur và mẫu thử được sắc ký đồ Hình 2.



Hình 2: Sắc ký đồ UV 425 nm của BDMC (1), DMC (2) và Cur (3) trong mẫu trắng (A), mẫu chuẩn (B) và mẫu thử (C) Trên sắc ký đồ mẫu trắng, tại vị trí tương ứng với thời gian lưu của BDMC, DMC và Cur không xuất hiện peak

như ở mẫu chuẩn. Các peak của 03 chất chuẩn trong mẫu thử tách hoàn toàn khỏi peak tạp. Như vậy, phương pháp có tính chọn lọc tốt và có độ đặc hiệu cao.

3.1.2 Khảo sát khoảng tuyến tính và xây dựng đường chuẩn

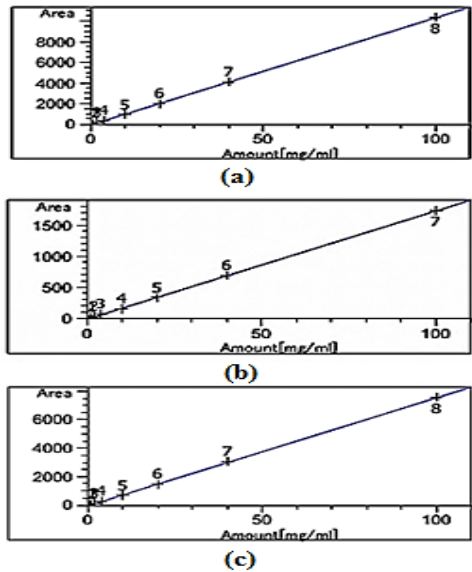
Phân tích các chuẩn nói trên theo điều kiện sắc ký đã xây dựng lặp lại 3 lần và xác định phương trình hồi quy tuyến tính dựa vào diện tích pic tại Bảng 2 như sau:

Bảng 2: Kết quả xây dựng đường chuẩn các chất thuộc nhóm curcuminoid

Chất chuẩn	Phương trình đường chuẩn*	Hệ số tương quan R ²
BDMC	y = 104,27357x – 55,46969	0,99993
DMC	y = 17,48919x – 11,62821	0,99995
Cur	y = 76,20593x – 37,53789	0,99990

*y là diện tích peak thu được tương ứng với nồng độ chất chuẩn x (µg/mL)

Kết quả xây dựng đường chuẩn cho thấy sự tương quan tuyến tính rõ rệt giữa diện tích peak và nồng độ BDMC, DMC và Cur trong khoảng khảo sát với hệ số tương quan R² > 0,999 (Hình 3).



Hình 3: Đường chuẩn định lượng của BDMC (a), DMC (b) và Cur (c)

3.1.3. Kết quả xác định giới hạn phát hiện và giới hạn định lượng của phương pháp

Bảng 3: Giá trị LOD và LOQ của 3 chất chuẩn nhóm curcuminoid

Lần	S _{BDMC}	S _{DMC}	S _{Cur}
1	21,534	15,106	19,674
2	21,700	15,190	18,338
3	21,535	14,830	19,169
4	21,981	15,154	18,981
5	21,411	15,180	19,938
6	21,489	15,001	19,732
SD	0,206	0,139	0,596
LOD (µg/mL)	0,007	0,026	0,026
LOQ (µg/mL)	0,020	0,080	0,078

S là diện tích pic thu được tương ứng với nồng độ của chất chuẩn.

Như vậy, đã xác định được giới hạn phát hiện và giới hạn định lượng của các chất chuẩn Cur (LOD: 26 ng/mL, LOQ: 78 ng/mL), DMC (LOD: 26 ng/mL, LOQ: 80 ng/mL) và BDMC (LOD: 7 ng/mL, LOQ: 20 ng/mL). Kết quả cho thấy phương pháp có độ nhạy cao, đảm bảo yêu cầu thử nghiệm, đánh giá các curcuminoid trong thực phẩm chức năng trên thị trường.

3.1.4. Xác định độ lặp lại và độ tái lập nội bộ và độ không đảm bảo đo của phương pháp

Bảng 4: Kết quả xác định độ không đảm bảo đo của phương pháp

	BDMC	DMC	Cur
$\bar{x}$ (µg/mL)	9,6	10,6	11,0
CV (%)	7,4	2,2	2,7
U (%)	15,5	4,6	5,7

CV (%) là hệ số biến thiên, U (%) là độ không đảm bảo đo.

Bảng 5: Kết quả xác định độ lặp lại của phương pháp

Lần	BDMC		DMC		Cur	
	Rt (min)	S	Rt (min)	S	Rt (min)	S
1	23,595	1006,220	24,207	173,623	24,830	781,378
2	23,590	1020,470	24,200	176,905	24,823	792,452
3	23,591	1035,600	24,201	177,468	24,826	807,439
4	23,597	997,304	24,206	172,260	24,829	777,058
5	23,587	1012,880	24,199	173,331	24,824	794,005
$\bar{x}$	23,592	1014,490	24,203	174,717	24,826	790,466
SD	0,004	14,555	0,004	2,319	0,003	11,905
RSD (%)	0,017	1,435	0,017	1,327	0,012	1,506

Trong đó: S là diện tích pic thu được tương ứng với nồng độ của chất chuẩn, Rt là thời gian lưu của chất chuẩn.

Nhận xét: Các giá trị độ lệch chuẩn tương đối RSD% đều < 2%, như vậy phương pháp định lượng có độ lặp lại cao, đáp ứng yêu cầu định lượng.

Bảng 6: Kết quả xác định độ tái lập nội bộ của phương pháp

Lần	C _{BDMC} (µg/mL)	C _{DMC} (µg/mL)	C _{Cur} (µg/mL)
1	9,586	9,951	10,119
2	10,182	10,592	10,746
3	10,096	10,514	10,689
4	10,318	10,780	10,891
5	10,463	10,812	11,088
6	10,659	11,083	11,318
7	10,246	10,576	10,912
8	9,852	10,205	10,595
$\bar{x}$	10,175	10,564	10,795
SD	0,338	0,356	0,357
RSD(%)	3,322	3,370	3,307

Các giá trị độ lệch chuẩn tương đối RSD% của nồng độ BDMC, DMC, Cur tính được đều nhỏ hơn giá trị RSD% tối đa chấp nhận là 7,3% ở khoảng nồng độ 10 ppm [11], nên phương pháp có độ tái lập nội bộ đạt yêu cầu.

3.2. Xác định hàm lượng Curcuminoid trong các mẫu thực phẩm chức năng

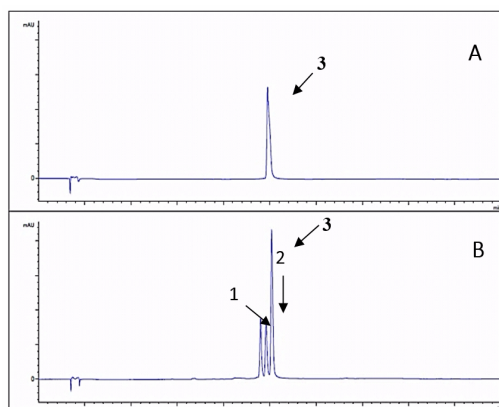
Kết quả phân tích hàm lượng Curcuminoid

(BDMC, DMC và Cur) trong một số mẫu thực phẩm chức năng được phân tích tại Trung tâm tiên tiến về Hóa sinh hữu cơ trong năm 2017 được nêu trong Bảng 7.

Bảng 7: Kết quả định lượng Curcuminoid trong một số mẫu thử nghiệm tại Trung tâm

Mẫu	Dạng mẫu	C _{BDMC} (mg/g)	C _{DMC} (mg/g)	C _{Cur} (mg/g)
1	Bột	KPH	KPH	291,086
2	Cao chiết	0,508	23,494	57,454
3	Bột	11,694	188,684	263,694
4	Bột	2,967	139,874	242,872
5	Bột	8,727	280,790	314,871
6	Viên nang	3,192	55,629	123,606
7	Bột	KPH	KPH	166,57
8	Viên nang	0,181	2,438	6,612
9	Dạng uống	1,445 (mg/mL)	40,271 (mg/mL)	42,734 (mg/mL)
10	Viên nang	KPH	KPH	110,573 (mg)

Nhận xét: Hàm lượng của curcumin luôn cao hơn hai thành phần còn lại của curcuminoid trong các dạng mẫu. Các mẫu dạng bột có hàm lượng curcuminoid cao hơn so với mẫu dạng uống và dạng viên nang.



Hình 4: Sắc ký đồ UV 425 nm của các chất chuẩn trong mẫu thử A (chỉ chứa Cur (3)) và mẫu thử nghiệm B BDMC (1), DMC (2) và Cur (3)

Bảng 8: Tổng hợp kết quả phân tích các mẫu trong năm 2017.

Dạng mẫu	Số lượng	Số mẫu chứa BDMC, DMC, Cur	Số mẫu chỉ có Cur
Bột	26	22	04
Cao chiết	08	08	0
Viên nang	06	05	01
Dạng uống	02	02	0
Tổng	42	37	05
%		88,1	11,9

Trong 42 mẫu thử nghiệm được gửi đến phân tích hàm lượng Curcuminoid tại Trung tâm tiên tiến về Hóa sinh hữu cơ trong năm 2017 có 05 mẫu thử nghiệm chỉ chứa Curcumin mà không có hai thành phần BDMC, DMC. Với các phương pháp tách chiết thông thường bằng dung môi hữu cơ và kết tinh, tinh sạch từ củ nghệ (*C. longa* L.), curcuminoid thu được thường bao gồm 3 thành phần chính như đã nêu, với các tỷ lệ khác nhau. Curcuminoid tự nhiên được sử dụng rộng rãi như một loại phụ gia trong thực phẩm tại nhiều quốc gia trên thế giới. Hơn nữa, curcuminoid cũng được coi là một loại thực phẩm thuốc, là thành phần chính

của nhiều thực phẩm chức năng trên thị trường nhằm hỗ trợ điều trị các bệnh về đường tiêu hóa, tim mạch và ung thư. Curcumin, một thành phần của curcuminoid cũng có thể được tổng hợp từ hóa học từ dầu mỏ. Tuy nhiên, theo tổ chức Lương thực thế giới FAO, curcumin tổng hợp không được phép sử dụng trong thực phẩm [12]. Trong nghiên cứu của chúng tôi, có tới 11,9% số mẫu phân tích chỉ duy nhất có sự xuất hiện của thành phần curcumin mà không có hai thành phần còn lại. Kết quả này làm dấy lên mối lo ngại đã có dấu hiệu sử dụng curcumin tổng hợp trong các sản phẩm thực phẩm chức năng lưu hành trên thị trường Việt Nam.

4. KẾT LUẬN

Curcuminoid là nhóm chất chính được phân lập từ củ nghệ (*Curcuma longa* L.) gồm ba thành phần là curcumin, demethoxy curcumin và bisdemethoxy curcumin. Curcuminoid được biết đến với nhiều công dụng sinh dược học thú vị như ức chế khối u, làm liền sẹo, giảm đau dạ dày... Do vậy, trên thị trường ngày càng xuất hiện nhiều sản phẩm thực phẩm bảo vệ sức khỏe có thành phần curcuminoid. Với công nghệ tách chiết hiện nay, các sản phẩm tự nhiên thu được thường bao gồm cả ba thành phần với tỉ lệ khác nhau. Trong nghiên cứu này, chúng tôi thực hiện xây dựng và thẩm định phương pháp định lượng curcuminoid trong thực phẩm chức năng và áp dụng đánh giá trên các nền mẫu khác nhau. Kết quả cho thấy phương pháp xây dựng có độ tuyến tính cao với $R^2 \geq 0,9999$, giới hạn phát hiện LOD trong khoảng 7 – 26 ng/mL, giới hạn định lượng LOQ trong khoảng 20 – 80 ng/mL, độ chụm, độ đúng và độ không đảm bảo đo đạt yêu cầu. Kết quả đánh giá trên các nền mẫu khác nhau cho thấy có 88,1% số mẫu có đầy đủ ba thành phần của curcuminoid, 11,9% số mẫu chỉ có một thành phần curcumin. Điều này dẫn đến nghi ngờ về sự có mặt của các mẫu curcumin tổng hợp trà trộn trong các sản phẩm thực phẩm bảo vệ sức khỏe có nguồn gốc thiên nhiên.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Chattopadhyay I, Biswas K, Bandyopadhyay

- U, Banerjee RK, *Turmeric and curcumin: Biological actions and medicinal applications*, Current Science, **87(1)**, 44-53 (2004).
2. Suzuki M, Nakamura T, Iyoki S, Fujiwara A, Watanabe Y, Mohri K, et al, *Elucidation of anti-allergic activities of curcumin-related compounds with a special reference to their anti-oxidative activities*, Biological and Pharmaceutical Bulletin **28(8)**, 1438-1443 (2005).
 3. Sa G, Das T, *Anti cancer effects of curcumin: cycle of life and death*, Cell Division, **3(1)**, 14 (2008).
 4. ASTA Method. 18.0 Official *Analytical Methods of the American Spice Trade Association*, 3rd ed.; American Spice Trade Association: Englewood Cliffs, NJ (1985).
 5. Tonnesen, H. H.; Karlsen, J, *High-performance liquid chromatography of curcumin and related compounds*, J. Chromatogr, **259**, 367-371 (1983).
 6. Smith, R.; Witowska, B., *Comparison of detectors for the determination of curcumin in turmeric by high performance liquid chromatography*, Analyst **109**, 259-261 (1984).
 7. Rouseff, R. L., *High-performance liquid chromatographic separation of spectral characterization of the pigments in turmeric and annatto*, J. Food Sci, **53**, 1823-1826 (1988).
 8. He, X. G.; Lin, L. Z.; Lian, L. Z.; Lindernmaier, M, *Liquid chromatography-electrospray mass spectrometric analysis of curcuminoids and sesquiterpenoids in turmeric (Curcuma longa)*, J. Chromatogr. A, **818**, 127-132 (1998).
 9. Jayaprakasha GK, Jagan Mohan Rao L, Sakariah KK., *Improved HPLC method for the determination of curcumin, demethoxycurcumin, and bisdemethoxycurcumin*, J Agric Food Chem, **50(13)**, 3668-3672 (2002).
 10. Osorio-Tobón JF, Carvalho PI, Barbero GF, Nogueira GC, Rostagno MA3 Meireles MA, *Fast analysis of curcuminoids from turmeric (Curcuma longa L.) by high-performance liquid chromatography using a fused-core column*, Food Chem, **200(1)**, 167-174 (2016).
 11. USP 35, Curcuminoids, 1260-1261 (2012).
 12. Ivan Stankovic, *Curcumin: Chemical and technical assessment*. 61st JECFA **8**, 1-8 (2004).