
METHOD OPTIMIZATION FOR ISOLATION AND RECRYSTALLIZATION OF COMMERCIAL CURCUMIN EXTRACT: TLC AND COLUMN CHROMATOGRAPHY

Zlatko Lozanovski

Higher Medical School, St. Kliment Ohridski University - Bitola, RN Macedonia
zlatko.lozanovski@uklo.edu.mk

Tatjana Nestorovska

Higher Medical School, St. Kliment Ohridski University - Bitola, RN Macedonia
tatjana.nestorovska@uklo.edu.mk

Angelka Jankulovska

Higher Medical School, St. Kliment Ohridski University - Bitola, RN Macedonia
angelka.jankulovska@uklo.edu.mk

Daniela Petkovska

Higher Medical School, St. Kliment Ohridski University - Bitola, RN Macedonia
daniela.petkovska@uklo.edu.mk

Denis Arsovski

Higher Medical School, St. Kliment Ohridski University - Bitola, RN Macedonia
denis.arsovski@uklo.edu.mk

Abstract: Curcumin is an active component of the rhizome perennial plant turmeric (*Curcuma longa*) which belongs to the ginger family (fam. Zingiberaceae). Depending on the origin and the country where it grows, turmeric contains from 2% to 6% curcuminoids. The dominant component is curcumin (CUR), followed by demotoxicurcumin (DMCUR) and bisdemotoxicurcumin (BDMCUR). In the literature there is no simple reproducible method for obtaining curcumin on a microscale, therefore we optimized a procedure for the purification of curcumin from a mixture with other curcuminoids. The best method of purification is by a cross-precipitation combination of 10:1 (V/V) 2-propanol/acetone, finalized by gradient-elution column chromatography 99:1 (V/V) dichloromethane/methanol, 97:3 (V/V) dichloromethane/methanol and 95:5 (V/V) dichloromethane/methanol. The purity of the products can be checked by TLC and the key is the choice of a solvent that should move the products with an R_f value above 0.3. For this purpose, 97:3 (V/V) dichloromethane/methanol was most suitable. Although spots on silica gel plates can be seen with the eye, they are best visualized with a UV lamp at a wavelength of 254 nm or 366 nm.

Keywords: curcumin; bisdemotoxicurcumin; demotoxicurcumin; purification; TLC.

ОПТИМИЗАЦИЈА НА МЕТОДА ЗА ИЗОЛАЦИЈА И ПРЕКРИСТАЛИЗАЦИЈА НА КОМЕРЦИЈАЛЕН ЕКСТРАКТ ОД КУРКУМИН: ТЕНКОСЛОЈНА И КОЛОНСКА ХРОМАТОГРАФИЈА

Златко Лозановски

Висока Медицинска школа, Универзитет „Св. Климент Охридски“ Битола, Р. С. Македонија
zlatko.lozanovski@uklo.edu.mk

Денис Арсовски

Висока Медицинска школа, Универзитет „Св. Климент Охридски“ Битола, Р. С. Македонија
denis.arsovski@uklo.edu.mk

Даниела Петковска

Висока Медицинска школа, Универзитет „Св. Климент Охридски“ Битола, Р. С. Македонија
daniela.petkovska@uklo.edu.mk

Анѓелка Јанкуловска

Висока Медицинска школа, Универзитет „Св. Климент Охридски“ Битола, Р. С. Македонија
angelka.jankulovska@uklo.edu.mk

Татјана Несторовска

Висока Медицинска школа, Универзитет „Св. Климент Охридски“ Битола, Р. С. Македонија
tatjana.nestorovska@uklo.edu.mk

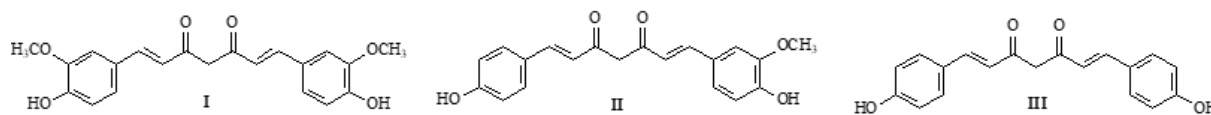
Резиме: Куркуминот претставува активна компонента на ризомското повеќегодишно растение куркума (*Curcuma longa*) која припаѓа на фамилијата на ѓумбир (*fam. Zingiberaceae*). Во зависност од потеклото и земјата во која растат начинот куркума содржи од 2% до 9% куркуминоиди. Доминантна компонента е куркуминот (CUR), потоа деметоксикуркумин (DMCUR) и бисдеметоксикуркумин (BDMCUR). Бидејќи во литературата нема репродуцибилна метода за добивање на куркумин на микроскала, се потрудивме да оптимизираме постапка за пречистување на куркумин од смеса со други куркуминоиди. Најдобар начин за пречистување е со комбинација на прекристализација од 10:1 (V/V) пропан-2-ол/ацетон, проследено со хроматографија во колона со градиентно елуирање и тоа 99:1 (V/V) дихлорометан/метанол. 97:3 (V/V) дихлорометан/метанол и на крај со 95:5 (V/V) дихлорометан/метанол. Чистотата на производите може да се провери со TLC за што клучен е изборот на растворувач кој треба да ги придвижи продуктите со R_f вредност над 0,3. За таа цел како најпогоден растворувач беше избран 97:3 (V/V) дихлорометан/метанол. Петната на силика гел плочките иако можат да се видат со голо око сепак е добро да се визуелизираат со ултравиолетова ламба на бранова должина од 254 nm или 366 nm.

Клучни зборови: куркумин; бисдеметоксикуркумин; деметоксикуркумин; изолација; TLC.

1. ВОВЕД

Во ризомот на растението куркума, вкупната содржина на куркуминоиди варира помеѓу 2 - 9% во кои само куркуминот доминира со приближно 70% што го прави да биде главна компонента во куркумата (Abdul et al., 2016; Bagchi et al., 2012; Tanaka et al., 2008). Комерцијално достапниот суров куркумин содржи типично околу 17% деметоксикуркумин (DMC) и 3% бисдеметоксикуркумин (BDMC) (Heffernan et al., 2017). Куркумата (*Curcuma longa* L.) покрај тоа што содржи куркуминоиди исто така содржи и 2-4% есенцијални масла, 2-3% неисправливи компоненти како и и компоненти како што се тумерон, атлантон и зингиберон. Покрај маслата куркумата се состои и од шеќери, протеини и разни смоли (Revathy et al., 2011). Постојат бројни студии за богатиот фармаколошки профил на куркуминот и неговите аналози (Lozanovski et al., 2023). Квалитетот на куркумата денес се цени според процентот на застапеност на куркуминоиди. Во литературата кога се наведени студии за биолошка активност многу ретко се наведува дали се користи чист куркумин (CUR) или смеса добиена од природно потекло кое ги содржи сите три куркуминоиди, слика 1. До денес нема едноставен и ефикасен начин за изолација на чист (CUR) од смесата која се добива од ризомот на *Curcuma Longa* L.

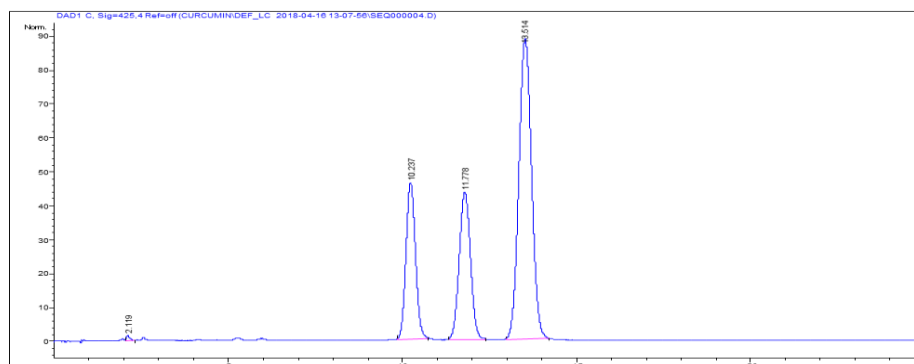
Слика 1. Структурни формули на куркумин I (CUR), деметоксикуркумин II (DMCUR) и бисдеметоксикуркумин III (BDMCUR).



Извор: Автор

Тенкослојната хроматографија (TLC) е првенствена алатка за брза квалитативна анализа која е многу ефикасна и погодна за оваа цел (Revathy et al., 2011; Anderson et al., 2000). При хроматографските раздвојувања како мобилна фаза се користат - разни комбинации на растворувачи: дихлорометан, хлороформ, метанол, оцетна киселина, етил ацетат и хексан. Иако е можна HPLC анализа на комерцијален и екстрахиран куркумин, слика 2 (Priyadarsini et al., 2014) едноставноста и економичноста на TLC за нас беше решавачки фактор во изборот на методата.

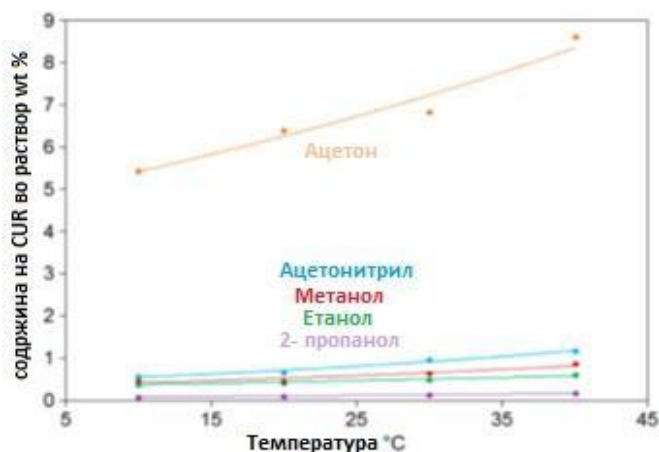
Слика 2. Хроматограм на комерцијален примерок од куркума на 425 nm. Првиот пик е од бисдеметоксикуркумин, после него се елуира деметоксикуркумин и на крај најмалку поларниот куркумин.



Извор: (Priyadarsini et al., 2014)

Almeida и неговите соработници развиле комбинација од систем на растворувачи при што утврдиле дека комбинацијата 99:1 (V/V) дихлорметан: метанол придонела за најдобро раздвојување со посакувани R_f вредности (Péret-Almeida et al., 2005). Horosanskaia и соработниците (Horosanskaia et al., 2020) ја испитувале растворливоста и нуклеацијата на чистиот CUR и во присуство на неговите два главни деривати, DMCUR (II) и BDMCUR (III) при што било увидено дека дека најпогодни растворувачи (пред се поради нивната мала токсичност) се ацетон, ацетонитрил, метанол, етанол и пропан-2-ол, слика 3.

Слика 3. Растворливост на комерцијален куркумин во ацетон, ацетонитрил, метанол, етанол и пропан-2-ол, симболите ги претставуваат експерименталните податоци, фитуваниите прави се дадени само за полесна визуелизација.



Извор: (Horosanskaia et al., 2020)

2. МАТЕРИЈАЛИ И МЕТОДИ

Куркумин (смеса од трите изомерни форми, куркумин, деметокси куркумин и бисдеметокси куркумин) и силикагел (230-400 mesh ASTM) беа набавени од Merck. Етил ацетат е набавен од VWR Chemicals, пропан-2-ол набавен од Fluka, дихлорметан и ацетон од Fisher Chemical, додека метанол и етанол беа набавени од Алкалоид АД Скопје. Сите хемикалии беа користени без дополнителни прочистувања.

Изолација на куркумин со тенкослојна хроматографија

Анализите со тенкослојна хроматографија беа изведена со силика гел плочки набавени од Merck (60 F₂₅₄, 250 μ m), со флуоресцентен индикатор. На долниот крај од плочката кој треба да биде потопен во растворувачот се нанесува примерокот со помош на многу тенки капилари. Нанесените дамки беа во максимален дијаметар од 1 mm. Растворувачот кој се додава во садот треба да биде во слој од 0,5 cm, да не ја допира почетната

линија со дамките и истиот при воспоставување на системот треба да патува нагоре до фронтот на плочката што од прилика изнесува 0,5 cm пред врвот. TLC плочката беше визуелизирана на бранова должина од 254 nm или 366 nm користејќи ултравиолетова ламба и комора за визуелизација Camag.

Хроматографија во колона

Флеш хроматографијата беше изведена согласно литературата (Still et al., 1978) односно во стаклена колона со внатрешен дијаметар 3,5 cm и должина 55 cm, на дното беше поставен памук а над слојот со памук се постави слој од песок. Во тенок млаз се додаде претходно изваган сув силикагел 30 g (230-400 mesh ASTM) набавен од Merck. Комерцијално набавениот куркумин (Merck) 600 mg го растворивме во испарлив растворувач и тоа во однос 99:1 (V/V) дихлорметан: метанол. Со оглед на тоа што беше отежната неговата растворливост кон растворот додадовме уште 1 g силикагел и 5 mL метанол при што растворот го испарувавме на водена бања 10 минути и сувиот прашкаст остаток го додадовме на врвот на колоната тапкајќи го се со цел новиот слој добро да слегне (dry loading column). На крај додадовме слој од песок (напомена: горниот и долниот слој песок беа дебели околу 0,5 cm) се со цел заштита од разнесување на површинскиот слој кога ќе се додава растворувачот, сето ова беше проследено со тапкање за да добро слегнат сите слоеви и да се истисне што е можно повеќе од заробениот воздух помеѓу слоевите. Како растворувач согласно на литературата и претходните испитувања со TLC избравме комбинација од растворувачи кој ќе го придвижи продуктот со R_f од околу 0,3 односно беше подготвен 500 mL раствор од комбинација на 99:1 (V/V) дихлорметан: метанол (Péret-Almeida et al., 2005). Растворувачот беше додаван континуирано на врвот од колоната не дозволувајќи слојот да остане сув. Протоколот во колоната беше засилен со Reciprotog пумпа со слаб воздушен притисок (5-15 psi, 0,35-1,2 bar), и нагоден да биде една капка во минута. На крајот од колоната беа подготвени епрувети кои можат да соберат елуат односно дискретни фракции од по 10 mL. Колоната беше градиентно елуирана три пати и тоа најпрво со 500 mL раствор на 99:1 (V/V) дихлорметан: метанол (на овој начин беа елуирани 44 епрувети) потоа со 300 mL 97:3 (V/V) дихлорметан: метанол (беа елуирани 31 епрувети) и на крај беа елуирани 30 епрувети со 200 mL раствор 95:5 (V/V) дихлорметан: метанол. Содржината на елуатот односно чистотата на фракциите беше проверена со TLC метода а беа одредени и бројот на компоненти (и нивните R_f вредности) на секоја фракција. Епруветите во кои беа собирани засебните фракции ги промивме со метанол и претуриравме во колби соодветно за секоја фракција. Колбите со фракциите ги загревавме на водена бања се со цел да испари растворувачот и ги оставивме 12 часа во дигестор на собна температура. На крај ги одвагавме добиените продукти и беше пресметан принос.

Преципитација на комерцијален куркумин

Во три ерленмаери ставивме по 250 mg комерцијално достапен куркумин од Merck. Како растворувач во првиот ерленмаер ставивме 4 mL 10:1 (V/V) пропан-2-ол:ацетон, во вториот ерленмаер 4 mL 50:50 (V/V) пропан-2-ол:ацетон и во третиот ерленмаер 4 mL 8,2:1 (V/V) изобутанол: ацетон. Ерленмаерите ги загревавме на водена бања по 60 минути на крај ги затворивме со соодветен капак и ги оставивме во дигестор на собна температура 12 часа а потоа и 60 минути во мразова бања.

3. РЕЗУЛТАТИ И ДИСКУСИЈА

Имајќи го во предвид истражувањето на Almeida и соработниците, комерцијално достапната смеса на куркуминоиди (10 mg) ја растворивме во 3 mL 1:1 (V/V) метанол: дихлорметан и притоа вака растворениот куркумин беше користен во понатамошните анализи при испитувањето за соодветен растворувач за TLC, со што беа подготвени повеќе комбинации на растворувачи и нивни соодноси соодветно: 97:3 (V/V) хлороформ: метанол, 95:5 (V/V) хлороформ: метанол, 97:3 (V/V) дихлорметан: метанол, 95:5 (V/V) дихлорметан: метанол, 99:1 (V/V) дихлорметан: метанол, дихлорметан, хлороформ и 80:15:5 (V/V) хлороформ : бензен : метанол 80:15:5 (V/V). Водевме сметка, согласно литературата, R_f вредностите на сите фракции да бидат со вредност повисока од 0,3 за да се постигне добра сепарација помеѓу компонентите (Péret-Almeida et al., 2005), Табела 1.

Табела 1. Комбинација на растворувачи при сепарација на куркуминоиди со TLC (силика гел) и нивни R_f вредности.

TLC мобилна фаза		R_f		
Растворувач	Сооднос (V/V)	CUR	DMCUR	BDMCUR
Хлороформ : метанол	(97:3)	0,56	0,32	0,18
Хлороформ : метанол	(95:5)	0,70	0,46	0,30
Дихлорометан : метанол	(97:3)	0,74	0,38	0,22
Дихлорометан : метанол	(95:5)	0,74	0,54	0,39
Дихлорометан : метанол	(99:1)	0,56	0,31	0,25
Дихлорометан	100%	/	/	/
Хлороформ	100%	0,15	0,07	/
Хлороформ : бензен : метанол	(80:15:5)	0,583	0,40	0,30

Извор: Автор

Согласно на добиените R_f вредности се утврди дека чистиот дихлорметан не е соодветен за раздвојување на компонентите, и потребно е мало количество на пополарен растворувач како метанол. Исто така увидовме дека комбинациите на хлороформ со метанол и бензен не понудија задоволвачки резултати при што оптимална сепарација беше постигната со 97:3 (V/V) дихлорметан: метанол. Флеш хроматографијата беше изведена согласно литературата (Still et al., 1978). На крајот од колоната поставивме епрувети кои можат да соберат елуат односно дискретни фракции од по 10 mL. Колоната беше градиентно елуирана три пати и тоа најпрво со раствор на 99:1 (V/V) дихлорометан: метанол потоа со 97:3 (V/V) дихлорометан: метанол и на крај со раствор 95:5 (V/V) дихлорометан: метанол. Содржината на елуатот односно чистотата на фракциите беше проверена со TLC, а беа одредени и R_f вредностите на секоја фракција, Табела 2.

Табела 2. TLC фракции на присутни куркуминоиди градиентно елуирани со 99:1 → 99:5 (V/V) дихлорометан/метанол.

Фракција	Вкупен волумен (mL)	Присутен куркуминоид
1-4	40	/
5-9	50	CUR (320 mg)
10-33	240	CUR, DMCUR, BDMCUR
34-43	100	DMCUR, BDMCUR
44-58	150	BDMCUR
59-108	500	/

Извор: Автор

Засебните фракции (5-9; 10-33; 34-43 и 44-58) во кои се наоѓаат продукти согласно TLC добиените податоци беа собрани во 4 засебни колби. Воедно епруветите во кои соодветно беа собирани погоре наведените фракции беа промиени со метанол и вака подготвените колби ги загревавме на водена бања се со цел да испари растворувачот и ги оставивме 12 часа во дигестор на собна температура. На крај ги одвагавме добиените продукти и резултатите се покажани во Табела 3, беше констатиран и губиток од 54 mg односно 9%.

Табела 3. Табеларен приказ на принос на продукти по испарување на мобилната фаза од соодветните фракции.

Фракција	Вкупен волумен (mL)	Присутен куркуминоид	Маса/Принос*
5-9	50	CUR	(320 mg, 53%)
10-33	240	CUR, DMCUR, BDMCUR	142 mg (24%)
34-43	100	DMCUR, BDMCUR	66 mg (11%)
44-58	150	BDMCUR	18 mg (3%)

* губиток 54 mg (9%)

Извор: Автор

Од претходни испитувања беше утврдено дека смесата содржи 63 % (m/m) куркумин и дека големиот удел на другите куркумини го отежнува пречистувањето со хроматографија во колона. Од слика 3 може да се види дека растворливоста на куркуминот се зголемува со зголемување на температурата во сите растворувачи. Во споредба со ацетонот, куркуминот значително помалку се раствора во другите растворувачи (помалку од 1 m/m %, освен во ацетонитрил на 40 °C), при што и експериментално утврдивме дека ацетонот е соодветен растворувач за ладна кристализација, додека ацетонитрил, метанол, етанол, пропан-2-ол и водата согласно литературата се сметаат за потенцијални анти (контра) растворувачи (Carvalho et al., 2015). Во нашето истражување со комерцијално достапниот куркумин се завележа дека најдобро растворање има со 10:1 (V/V) пропан-2-ол: ацетон. Сите ерленмаери ги загревавме на водена бања по 60 минути и во сите загревајќи постепено во неколку порции со оглед на слабата растворливост на куркуминот додававме вишок на растворувач и ацетон. Крајните количества на растворувачи и приносите се дадени во Табела 4.

Табела 4. Комбинации на растворувач со комерцијално достапен куркумин (Merck), нивен сооднос и принос.

Примерок/маса	Растворувач	Сооднос/волумен	Принос
1 (250 mg)	2-пропанол/ ацетон	10:1	64%
2 (250 mg)	2-пропанол/ ацетон	50:50	26%
3 (250 mg)	изобутанол/ ацетон	8,2:1	53%

Извор: Автор

Вака третираните ерленмаери (во водена бања се до целосно растворување на растворувачите) на крај ги затворивме со соодветен капак и оставивме во дигестор на собна температура 12 часа. Следниот ден ерленмаерите ги ставивме 60 минути во мраз, при што во вториот ерленмаер беа евидентни игличести кристали, во третиот ерленмаер топчести кристали, а во првиот не беа забележани кристали.

4. ЗАКЛУЧОК

Бидејќи во литературата нема репродуцибилна метода за добивање на куркумин на микроскала, се потрудивме да оптимизираме постапка за пречистување на куркумин од смеса со други куркуминоиди. Увидовме дека најдобар начин за пречистување е со комбинација на прекрстализација од 10:1 (V/V) пропан-2-ол/ацетон, проследено со хроматографија во колона односно градиентното елуирање и тоа најпрво со раствор на 99:1 (V/V) дихлорометан: метанол потоа со 97:3 (V/V) дихлорометан: метанол и на крај со раствор 95:5 (V/V) дихлорометан: метанол. Чистотата на добиените продукти лесно може да се провери/потврди со тенкослојна хроматографија каде беше клучен изборот на растворувач. Утврдивме дека чистиот дихлорометан не е соодветен за раздвојување на компонентите и е потребно мало количество на пополарен растворувач како метанол. Оптималната сепарација ја постигнавме со 97:3 (V/V) дихлорометан: метанол кој го придвижи продуктот со R_f поголема од 0,3. Петната на силика гел плочките иако можеа да се видат со голо око сепак е добро да се визуелизираат со ултравиолетова ламба SAMAG на бранова должина од 254 nm или 366 nm. Треба да се внимава кога се употребува комерцијален „куркумин“ бидејќи начесто е смеса од 3 куркуминоиди, а не чист куркумин.

ЛИТЕРАТУРА

- Abdul, R., Hatifah, P. L., Ratna, W., & Muhammad, K. (2016). Use of thin layer chromatography and FTIR spectroscopy along with multivariate calibration for analysis of individual curcuminoid in turmeric (*Curcuma longa* Linn) powder. *International Journal of Clinical Pharmacology Research*, 8, 419–424.
- Anderson, A. M., Mitchell, M. S., & Mohan, R. S. (2000). Isolation of Curcumin from Turmeric. *Journal of Chemical Education*, 77(3), 359. <https://doi.org/10.1021/ed077p359>.
- Bagchi, A. (2012). Extraction of Curcumin. *IOSR Journal of Environmental Science, Toxicology and Food Technology*, 1(3), 1–16.
- Carvalho, D. de M., Takeuchi, K. P., Geraldine, R. M., Moura, C. J. de, & Torres, M. C. L. (2015). Production, solubility and antioxidant activity of curcumin nanosuspension. *Food Science and Technology*, 35(1), 115–119. DOI: [10.1590/1678-457X.6515](https://doi.org/10.1590/1678-457X.6515).
- Heffernan, C., Ukrainczyk, M., Gamidi, R. K., Hodnett, B. K., & Rasmuson, Å. C. (2017). Extraction and Purification of Curcuminoids from Crude Curcumin by a Combination of Crystallization and Chromatography. *Organic Process Research & Development*, 21(6), 821–826. <https://doi.org/10.1021/acs.oprd.6b00347>.

- Horosanskaia, E., Yuan, L., Seidel-Morgenstern, A., & Lorenz, H. (2020). Purification of curcumin from ternary extract-similar mixtures of curcuminoids in a single crystallization step. *Crystals*, 10(3), 206. <https://doi.org/10.3390/cryst10030206>.
- Lozanovski Z, Todorovska I, Dragarska K, Bogdanov J. (2023). Synthesis of Symmetrical Monocarbonyl Analogs of Curcumin Containing a 2-Bromobenzylidene Moiety and Spectrophotometric Assessment of Their Reactivity with 2-(Dimethylamino)ethanethiol. *Chemistry Proceedings*. 14(1):7. <https://doi.org/10.3390/ecsoc-27-16084>.
- Péret-Almeida, L., Cherubino, A. P. F., Alves, R. J., Dufossé, L., & Glória, M. B. A. (2005). Separation and determination of the physico-chemical characteristics of curcumin, demethoxycurcumin and bisdemethoxycurcumin. *Food Research International*, 38(8), 1039–1044. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2005.02.021>.
- Priyadarsini, K. I. (2014). The chemistry of curcumin: from extraction to therapeutic agent. *Molecules*, 19(12), 20091–20112. DOI: [10.3390/molecules191220091](https://doi.org/10.3390/molecules191220091).
- Revathy, S., Elumalai, S., & Antony, M. B. (2011). Isolation, purification and identification of curcuminoids from turmeric (*Curcuma longa* L.) by column chromatography. *Journal of Experimental Sciences*, 2(7), 21–25.
- Still, W. C., Kahn, M., & Mitra, A. (1978). Rapid chromatographic technique for preparative separations with moderate resolution. *The Journal of Organic Chemistry*, 43(14), 2923–2925.
- Tanaka, K., Kuba, Y., Sasaki, T., Hiwatashi, F., & Komatsu, K. (2008). Quantitation of curcuminoids in curcuma rhizome by near-infrared spectroscopic analysis. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56(19), 8787–8792. doi: 10.1021/jf801338e.
- <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC8490651/> 2024
- <https://pubs.acs.org/doi/10.1021/acsomega.3c04205>, 2024
- https://www.researchgate.net/publication/284801265_Isolation_purification_and_identification_of_curcuminoids_from_turmeric_Curcuma_longa_L_by_column_chromatography 2024