

The Identification and Detection of Curcumin and its Constituent Compounds using High-performance Liquid Chromatography (HPLC) Technology, and Determination of the Optimal Conditions for the Developed Analytical Method

Dr. Muhammad Maarouf*

Dr. Tareq Arraj**

Dr. Wissam Zam***

Riham Ahmad Moalla****

(Received 2 / 4 / 2024. Accepted 25 / 6 / 2024)

□ ABSTRACT □

This study aimed to develop a sensitive and accurate analytical method to determine and detect curcumin using high-performance liquid chromatography HPLC. Optimal conditions such as mobile phase, temperature, flow speed, and the maximum wavelength for analysis λ_{\max} were studied. The study was carried out on a standard solution of curcumin with a concentration of (40ppm) and a separation column (C₁₈) was used with specifications (250 × 4.6m.m.5 μ m).

The results showed the optimal conditions were as follows: the flow speed of the mobile phase was (0.8 ml/min) as a mixture of acetonitrile and phosphoric acid (0.1%) in a ratio of (40:60 v/v), the temperature of the separation column was (40 °C), while λ_{\max} was (425nm).

Curcumin showed three peaks with average area (X₁=87279, X₂=881260, X₃=7641952), at average retention time (T₁=6.31, T₂=6.87, T₃=7.50) min with relative standard deviation (RSD%) (0.83, 0.08, 0.01) respectively, the sum of the average areas of the peaks was (X_t=8610491).

The calibration curve for curcumin and its three compounds was characterized by good linearity within a range of concentrations ranging from (0.001-40)ppm. The recoverability R% was calculated and was (99.66%). The limit of quantitative detection LOQ was (0.056 ppb), and the qualitative limit of detection LOD was (0.009 ppb). The results confirm the possibility of adopting this method to determine curcumin and its various compounds.

Keywords: curcumin, high-performance liquid chromatography (HPLC), optimal conditions, non-maximum wavelength λ_{\max} .

Copyright



:Tishreen University journal-Syria, The authors retain the copyright under a CC BY-NC-SA 04

* Professor - Department of Chemistry - Faculty of Science - Tishreen University - Latakia - Syria.

** Assistant Professor - Department of Environmental Chemistry - Higher Institute for Environmental Research - Tishreen University - Latakia - Syria.

*** Assistant Professor - Department of Analytical and Food Chemistry - Faculty of Pharmacy - University of Tartous - Tartous - Syria.

**** PhD student - Department of Chemistry - Faculty of Science - Tishreen University - Latakia - Syria. Rihamahmadmoalla@gmail.com

تحديد وكشف الكركمين والمركبات المكونة له باستخدام تقانة الكروماتوغرافيا السائلة عالية الأداء HPLC، وتحديد الشروط المثلى للطريقة التحليلية المطورة

د. محمد معروف*

د. طارق عراج**

د. وسام زم***

رهام أحمد معلا****

تاريخ الإيداع 2 / 4 / 2024. قُبِلَ للنشر في 25 / 6 / 2024

□ ملخص □


تم في هذه الدراسة تطوير طريقة تحليلية حساسة ودقيقة لتحديد وكشف مركب الكركمين باستخدام الكروماتوغرافيا السائلة عالية الأداء HPLC، وتم التعرف تجريبياً على الشروط المثلى من عمود الفصل، والطور المتحرك، ودرجة الحرارة، وسرعة التدفق وطول الموجة الأعظمي، استخدم محلول عياري للكركمين بتركيز (40ppm) لدراسة الشروط المثلى، وكان عمود الفصل المستخدم الثابت هو العمود (C₁₈) بمواصفات (250×4.6m.m.5μm)، تم الحصول على الشروط المثلى من الطور المتحرك ممثلاً بالمزيج (اسيتونتريل: حمض الفوسفور ذو التركيز 0.1%) بنسبة (40:60 v/v)، و كانت درجة الحرارة لعمود الفصل هي (40° C) ، وسرعة تدفق الطور المتحرك هي (0.8ml/min)، أما طول الموجة الأعظمي للتحليل فكان (425nm).

أظهر الكركمين ثلاث قمم بمتوسط مساحة (X₁=87279, X₂=881260, X₃=7641952)، عند متوسط زمن احتفاظ (T₁=6.31, T₂=6.87, T₃=7.50)min بانحراف معياري نسبي مئوي RSD% (0.83, 0.08, 0.01) على الترتيب ومجموع متوسط مساحات القمم (X_t=8610491).

تميز منحنى المعايرة لمركب الكركمين بمركباته الثلاثة بخطية جيدة ضمن مجال من التراكيز تراوح بين (0.001-40)ppm، وتم حساب الاسترجاعية R% وكانت (99.66%)، أما حد الكشف الكمي فكان LOQ (0.056ppb)، وحد الكشف النوعي LOD (0.009 ppb).

تؤكد نتائج البحث على إمكانية اعتماد هذه الطريقة لتحديد الكركمين بمركباته المختلفة.

الكلمات المفتاحية: الكركمين، الكروماتوغرافيا السائلة عالية الأداء HPLC، الشروط المثلى، طول الموجة الأعظمي λ_{max} .

حقوق النشر : مجلة جامعة تشرين- سورية، يحتفظ المؤلفون بحقوق النشر بموجب الترخيص  CC BY-NC-SA 04

CC BY-NC-SA 04

*أستاذ - قسم الكيمياء- كلية العلوم- جامعة تشرين- اللاذقية - سورية.

** مدرس - قسم الكيمياء البيئية- المعهد العالي لبحوث البيئة- جامعة تشرين - اللاذقية- سورية.

*** مدرس - قسم الكيمياء التحليلية والغذائية - كلية الصيدلة - جامعة طرطوس - طرطوس - سورية.

**** طالبة دكتوراه- قسم الكيمياء- كلية العلوم - جامعة تشرين - اللاذقية- سورية. Rihamahmadmoalla@gmail.com

مقدمة:

يعد الكركم (Turmeric) أحد النباتات المعمرة، كما يسمى أيضاً باسم التوابل الذهبية أو الزعفران الهندي، إذ ينتشر نبات الكركم في جميع أنحاء جنوب قارة آسيا والبلاد الهندية، وتنتمي هذه العُشبة لفصيلة الزنجبيلات، وهو عبارة عن نبات طويل، وتعد مادة الكركمين المادة الفعالة والأهم في الكركم وهي المسؤولة عن ظهوره باللون الأصفر [1,2,3]. يتم استخراج الكركم من النبتة ثم بعد ذلك يسحق حتى يصبح ناعماً، ويتحول لونه إلى الأصفر البني، ويتميز الكركم باحتوائه على مجموعة من الأصباغ والزيوت العطرية وزيوت طيارة مثل الزنجبيرين والأثلاثون، والتيرميرون، بالإضافة إلى بروتينات وسكريات [4].

يعد الكركمين من أهم مركبات الكركم، وجميع مركباته تذوب في الماء، وتتعدد أسماء الكركم من بينها الكركب وعقيد الهند والخرقوم [5]. أما الكركمين المتوفر تجارياً هو خليط من الكركمينويدات (Curcuminoids) الموجودة بشكل طبيعي، وهي الكركمين 77% (CRM) (Curcumin)، و دي ميثوكسي كركمين 18% (De Methoxy Curcumin) (DMC) و بيس دي ميثوكسي كركمين 5% (Bis De Methoxy Curcumin) (BDMC) [3]. تمت دراسة الكركمين على نطاق واسع لخصائصه المضادة للالتهابات، [5-6-7-8] ومضادات الأكسدة، [9] ومضادات الزهايمر، [10] ومضادات الميكروبات، [10-11] ومضادات السرطان، [11-12] سكر الدم، [13] التئام الجروح، [14-15] زيادة المناعة، [16]. كما تم استخدام الكركمين كعلاج بالأعشاب بديلاً عن استخدام الأدوية المضادة للالتهاب غير الستيروئيدية في علاج التهاب المفاصل لدى كبار السن لما تحمله هذه الأدوية من آثار جانبية خطيرة [5-17-18-19].

يصنف الكركم، وهو من التوابل المعروفة بخصائصها الطبية منذ فترة طويلة ، وقد حظي باهتمام من العالم الطبي/العلمي ومن عشاق الطهي، لأنه المصدر الرئيس للكركمين متعدد الفينول. فهو يساعد في تخفيف الحالات الالتهابية، ومتلازمة التمثيل الغذائي، والتهاب المفاصل، والقلق، وفرط شحميات الدم. وقد يساعد أيضاً في إدارة الالتهابات الناتجة عن ممارسة التمارين الرياضية وألم العضلات، وبالتالي تعزيز التعافي والأداء لدى الأشخاص الرياضيين. بالإضافة إلى ذلك، يمكن لجرعة منخفضة نسبياً من المركب أن توفر فوائد صحية للأشخاص الذين لا يعانون من حالات صحية مشخصة. يمكن أن تعزى معظم هذه الفوائد إلى آثاره المضادة للأكسدة والمضادة للالتهابات. إذ يوجد العديد من المكونات التي يمكن أن تزيد من التوافر البيولوجي للكركمين والذي يزيد من امتصاصه ويؤدي إلى الفوائد الصحية المرتبطة به، على سبيل المثال، البيبيرين هو المكون الفعال في الفلفل الأسود، وعندما يتم دمجها في مركب مع الكركمين، فقد ثبت أنه يزيد من التوافر البيولوجي بنسبة 2000%. يوفر الكركمين مع العوامل المعززة فوائد صحية متعددة [19,20,21].

تشير الدراسات المرجعية إلى أهمية استخدام تقنية الكروماتوغرافيا السائلة عالية الأداء HPLC في تحديد مركب الكركمين ومركباته المختلفة، يحتل الكركمين حالياً المركز الأول بين جميع المنتجات الطبية المشتقة من أصل نباتي فهو المنتج الذي يدخل في صناعة 28 مستحضر صيدلاني [19,22]. لاتذوب مركبات الكركمين عملياً في المحاليل الحمضية أو المحاليل المتعادلة، وهي تذوب في الميثانول والإيثانول وثنائي ميثيل سلفوكسيد والأسيتون والاسيتونتريل. [20,24,25] حلل مزيج مكون من مركب الكركمين ومركب سيكلوسبورين (Cyclosporine) الموجودين في شكل كبسولات بتقانة

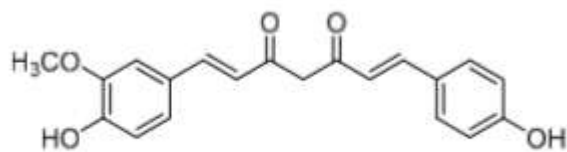
الكرماتوغرافيا السائلة عالية الأداء HPLC بواسطة العمود C_{18} بمواصفات $(150 \times 4.6 \text{ m.m.} 5 \mu\text{m})$ ، استخدم طور متحرك مكون من (اسيتونتريل 50: ماء 10: ميثانول 40)، وكان معدل التدفق (0.5 ml/min) ، عند طول موجة (214 nm) ، حدد زمن الاحتفاظ (3.073 min) لمركب الكركمين و (6.373 min) لمركب السيكلوسبورين، أما خطية المنحني العياري لمركب الكركمين ومركب سيكلوسبورين كانت بين $(8-48 \text{ ppm})$ ، و $(4-24 \text{ ppm})$ على التوالي [6].
حلل مركب الكركمين (CRM) ومركب جيفتينيب (GFT) (Gefitinib) باستخدام تقانة ال HPLC بواسطة العمود C_{18} بمواصفات $(250 \times 4.6 \text{ m.m.} 5 \mu\text{m})$ ، و الطور المتحرك اسيتونتريل وماء محمض بحمض النمل 0.1% بنسبة $(30:70 \text{ v/v})$ ، وبمعدل تدفق للطور المتحرك (0.2 mL/min) ، أما خطية المنحني العياري لمركب ال CRM ومركب ال GFT كانت بين $(10-60 \text{ ppb})$ ، وكان حد الكشف النوعي LOD لمركب ال CRM ومركب ال GFT $(0.38 \pm 0.04 \text{ ppb})$ و $(0.36 \pm 0.02 \text{ ppm})$ على التوالي أما حد الكشف الكمي LOQ لمركب ال CRM ومركب ال GFT $(0.95 \pm 0.10 \text{ ppb})$ و $(0.93 \pm 0.12 \text{ ppb})$ على التوالي [7].

تم تحديد مركب الكركمين باستخدام تقانة ال HPLC بواسطة العمود C_{18} ، واستخدام الاسيتونتريل كمذيب واسيتونتريل وحامض الخل 0.4% كطور متحرك بشكل تدريجي (Gradient)، وبمعدل تدفق للطور المتحرك (1 mL/min) ، عند طول موجة (430 nm) [21] حلل مركب الكركمين في البلازما باستخدام تقانة ال HPLC بواسطة العمود C_{18} بمواصفات $(100 \times 4.6 \text{ m.m.} 5 \mu\text{m})$ ، و الطور المتحرك اسيتونتريل وحامض الخل 5% بنسبة $(75:25, \text{ v/v})$ ، وبمعدل تدفق للطور المتحرك (1 mL/min) ، أما خطية المنحني العياري كانت بين $(1-500 \text{ ppm})$ ، وكان حد الكشف الكمي (1 ppm) [4].

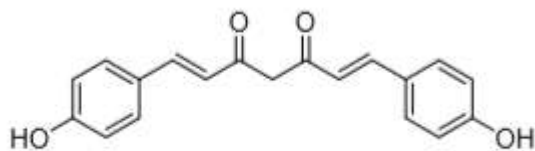
تم دراسة وتحليل الكركمين وفصله إلى مكوناته الثلاثة باستخدام تقانة الكرماتوغرافيا السائلة عالية الأداء، واستخدم عمود C_{18} مواصفات $(250 \times 4.6 \text{ m.m.} 5 \mu\text{m})$ ، و الطور المتحرك اسيتونتريل وحامض الخل 4.08% بنسبة $(49:51, \text{ v/v})$ ، وبمعدل تدفق للطور المتحرك (1.04 mL/min) ، ودرجة حرارة العمود 40°C أما خطية المنحني العياري كانت بين $(0.492-6.890 \text{ ppb})$ ، وكان حد الكشف النوعي وحد الكشف الكمي بين $(0.056 - 0.169 \text{ ppb})$ [3].

تم في هذا البحث تطوير وتحديد الشروط المثلى لتحديد مركب الكركمين بطريقة ال HPLC، وذلك لإيجاد الطريقة الأسهل والأسرع والأقل كلفة اقتصادية ما أمكن.

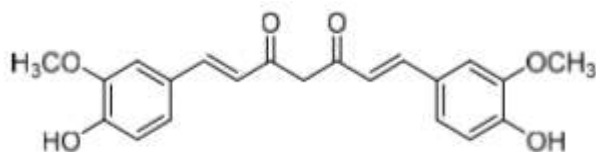
يمثل الشكل (1) البنية الكيميائية لمركب الكركمين بمكوناته الثلاثة (BDMC, DMC, CRM).



2. demethoxycurcumin (DMC)



1. bisdemethoxycurcumin (BMC)



3. curcumin (C)

الشكل(1): البنية الكيميائية لمركب الكركمين بمكوناته الثلاثة

أهمية البحث وأهدافه:

هدف البحث:

يهدف البحث إلى تطوير طريقة مناسبة للتحليل المتزامن لمركبات الكركمين الثلاثة (الكركمين 77% ودي ميتوكسي كركمين 18% وبيس دي ميتوكسي كركمين 5%)، والحصول على مساحة قمة جيدة لكل مركب منهم وزمن الاحتفاظ المناسبين للتحليل ودقة وحساسية التحليل وفق تقانة الكروماتوغرافيا السائلة عالية الأداء HPLC، وتحديد الشروط المثلى (نسب مذيبات الطور المتحرك، درجة حرارة عمود الفصل الكروماتوغرافي، سرعة تدفق الطور المتحرك المثلى، طول الموجة الأعظمي الأمثل λ_{max}) التي تستخدم في تحديد الكركمين باستخدام عمود الفصل C₁₈.

أهمية البحث:

تكمن أهمية البحث في الدور الكبير الذي يؤديه الكركمين بمكوناته الثلاثة كمادة دوائية لمعالجة العديد من الأمراض ومكامة غذائية ينصح باستخدامها لاكتساب المناعة الجسمية للإنسان، لذا كان من الضرورة بمكان إخضاع هذه المادة للمراقبة التحليلية باستخدام الطريقة الأكثر مصداقية والأقل كلفة.

طرائق البحث ومواده:

المحاليل المستخدمة:

- مركب الكركمين (Curcumin) 94%، إنتاج شركة (Sigma – Aldrich).
- مذيبات عضوية نقاوة HPLC-Grade وهي: الأسيتونتريل (Acetonitrile, CH₃CN) 99.8% إنتاج شركة (Merck-Germany)، الميثانول (Methyl Alcohol) 99.88% إنتاج شركة (Merck-Germany).
- حمض الفسفور (H₃PO₄, Phosphoric Acid) نقاوة 99%، إنتاج شركة (Merck-Germany).

الأجهزة والأدوات المستخدمة:

- جهاز الكروماتوغرافيا السائلة عالية الأداء (HPLC) High Performance Liquid Chromatography ، (إنتاج شركة Shimadzu اليابانية) الموجود في مخابر المعهد العالي لبحوث البيئة - جامعة تشرين، والمزود بمضخة ثنائية الطور (LC-20AT)، حاقن آلي (SIL-M20A)، كاشف UV-VIS مع نظام (SPD-M20A) Diod Array Detector ووحدة معالجة (CBM-20A)، عمود التحليل (250×4.6m.m.5µm) C₁₈ (إنتاج شركة Wissenschaftliche Gerätebau الألمانية)، حزمة برمجية (HPLC (LC Solution) (إنتاج شركة Shimadzu).
 - جهاز Ultrasonic Cleaner لنزع الغازات إنتاج شركة Jeken الصينية (PS-40A).
 - ميزان حساس شركة Shimadzu يزن بدقة ± 0.0001 g.
 - فلتر غشائية 0.45µm (Milliporemembrance- filters) إنتاج شركة (Goettingen-Germany Albet).
- طريقة العمل:**

أولاً: تحضير المحاليل العيارية:

حضر محلول عياري أم من مادة الكركمين 40ppm لتحديد الشروط المثلى لفصل وتحديد مركب الكركمين، ولتحضير سلسلة عيارية من أجل التحقق من صلاحية الطريقة مثل منحنى المعايرة، وخطية المنحنى، وتكرارية فصل وتحديد مركب الكركمين، وذلك بحل 26.59mg من الكركمين في كمية مناسبة من الاسيتونتريل وأكمل الحجم حتى 50ml، أخذ 2ml من المحلول السابق وتم تمديده حتى 25ml بالاسيتونتريل.

النتائج والمناقشة:

تحديد الشروط المثلى لفصل وتحديد مركب الكركمين باستخدام تقانة ال HPLC

يتحدد طول الموجة الأعظمي عند تحليل أي مركب بطريقة ال HPLC فهي من الشروط التي تؤثر بشكل ملحوظ على متوسط مساحة قمة أي مركب وتؤثر على حساسية الطريقة، أما تغير نسب الطور المتحرك فيعتبر من الشروط المهمة جداً في تحديد مركب الكركمين، إذ لوحظ تأثير تغير نسب الماء المحمّض بحمض الفوسفور 0.1% في زمن الاحتفاظ ومساحة القمة لمركب الكركمين بسبب قطبيته المتوسطة نسبياً، وكان لدرجة الحرارة دوراً مهماً في تغيير زمن الاحتفاظ نتيجة تأثيرها على لزوجة الطور المتحرك وفعالية الطور الثابت لذلك تم تحليل عينة الكركمين في عدة درجات حرارة، ينخفض زمن الاحتفاظ R_t مع زيادة التدفق إذ تساهم زيادة تدفق الطور المتحرك في زيادة سرعة تمليص مركب الكركمين في العمود الكروماتوغرافي.

1. تحديد طول الموجة الأعظمي λ_{max} الأمثل لتحديد الكركمين:

يعد طول الموجة من الشروط التي تؤثر على متوسط مساحة قمة أي مركب، لذا تم تحليل مركب الكركمين ضمن مجال من الأطوال الموجية المختلفة تتراوح بين (410-450) nm وتحديد متوسط مساحة القمم لكل منها، بعد ذلك تم رسم العلاقة بين متوسط مجموع مساحة القمم وطول الموجة للحصول على طول الموجة الأعظمي λ_{max} .

يظهر الجدول (1) أن طول الموجة 425nm هو الأمثل بمتوسط مساحة القمم للمركبات الثلاثة المكونة لمركب الكركمين ($X_1=115509$, $X_2=1056072$, $X_3=6989454$) وتم اعتماد طول الموجة الأمثل الذي يتم عنده تنفيذ الدراسة الكمية للكركمين.

جدول (1): تأثير تغير طول الموجة في تحديد مركب الكركمين

طول الموجة λ (nm)	مساحة القمة Area** \bar{x}	SD	RSD%	حد الثقة*** $CI = \pm \frac{t \times SD}{\sqrt{n}}$	متوسط زمن الاحتفاظ Rt(min)*
410	$X_1=108524$	907.12	0.83	2253.43	$T_1=6.53$
	$X_2=981254$	817.31	0.08	2030.31	$T_2=7.18$
	$X_3=5721478$	816.49	0.01	2028.29	$T_3=7.91$
	$X_4=6811256$				
420	$X_1=112102$	163.29	0.14	405.65	$T_1=6.53$
	$X_2=1042089$	210.65	0.02	523.29	$T_2=7.18$
	$X_3=6881871$	301.28	0.01	748.43	$T_3=7.91$
	$X_4=8036062$				
425	$X_1=115509$	100.42	0.08	249.47	$T_1=6.53$
	$X_2=1056072$	262.09	0.02	651.08	$T_2=7.18$
	$X_3=6989454$	262.09	0.01	651.08	$T_3=7.91$
	$X_t=8161035$				
430	$X_1=112514$	372.32	0.33	924.90	$T_1=6.53$
	$X_2=1021458$	533.98	0.05	1326.50	$T_2=7.18$
	$X_3=6914257$	533.98	0.01	1326.50	$T_3=7.91$
	$X_4=8048229$				
440	$X_1=101478$	362.52	0.35	900.56	$T_1=6.53$
	$X_2=921214$	271.89	0.02	675.42	$T_2=7.18$
	$X_3=5612475$	120.02	0.01	298.15	$T_3=7.91$
	$X_4=6635167$				
450	$X_1=89475$	120.02	0.13	298.15	$T_1=6.53$
	$X_2=715488$	209.83	0.02	521.27	$T_2=7.18$
	$X_3=3157859$	209.83	0.01	521.27	$T_3=7.91$
	$X_4=3962822$				

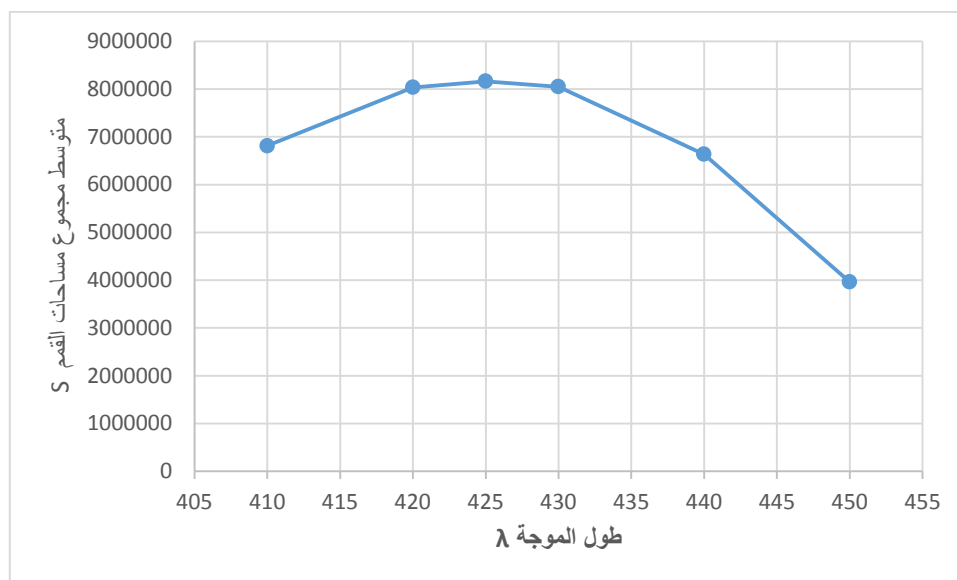
T:25° C, Column (C₁₈), Flow: 1 ml/min

*: متوسط زمن احتفاظ المركب لأربع مكررات لكل تركيز.

** \bar{x} : متوسط مساحة قمة المركب لأربع مكررات لكل تركيز.

***: حد الثقة عند مستوى ثقة 95%.

يبين الشكل (2) العلاقة $S=f(\lambda)$ والتي تظهر بأن متوسط مجموع مساحات القمم الكروماتوغرافية الأعظم يوافق طول موجة $\lambda_{max}=425nm$.



الشكل(2): العلاقة بين طول الموجة المقاسة مع متوسط مجموع مساحات القمم

2. النسبة المثلى للطور المتحرك:

تحديدت مكونات الطور المتحرك من مذيب الالاسيتونتريل والماء المحمض بحمض الفوسفور بتركيز 0.1 %، حققت عينة من محلول الكركمين العياري (40 ppm) وهو تركيز يقع ضمن مجال الخطية حسب الشكل (8,b)، عند طول موجة 425 nm ودرجة حرارة 25° C وتدفق باستخدام العمود الكروماتوغرافي C₁₈ بهدف تحديد تأثير نسب الطور المتحرك [ASN/H₃PO₄(0.1%)] الموافق لظهور قمم مركب الكركمين.

يبين الجدول (2) اختلاف واضح في زمن الاحتفاظ ومساحة القمم الكروماتوغرافية لمركب الكركمين عند التركيز 40ppm، حيث تم البدء بطور متحرك مكون من حمض الفوسفور (H₃PO₄(0.1%) والالاسيتونتريل ASN (10:90 v/v)، لم تظهر أي قمة لمركب الكركمين أي أنه لم يتم التمليص من الطور الثابت اللاقطبي وهذا بسبب قطبية الطور المتحرك المرتفعة نسبياً حيث يتم تخفيض قطبية الطور المتحرك وذلك لتناسب العينة المدروسة (مركب الكركمين)، وذلك بتخفيض نسبة حمض الفوسفور (0.1%) إلى 65%، ظهرت لدينا قمة لمركب الكركمين حيث تم تمليصه من الطور الثابت اللاقطبي الموجود في العمود C₁₈، ولكن كان زمن الاحتفاظ كبير (62.95) دقيقة وهو زمن عالٍ جداً غير مرغوب به في التحليل، وظهرت لدينا ثلاثة قمم لمركب الكركمين عند نسبة الطور المتحرك (35:65 v/v) من ASN/H₃PO₄(0.1%) وأيضاً كان الزمن عالٍ جداً كما في الشكل (3)، وهذا يعني بأنه يجب الاستمرار في تخفيض قطبية الطور المتحرك لتصبح الألفة أكبر بينه وبين مركب الكركمين، والذي يعتبر مركباً ذو قطبية ضعيفة.

تم تسجيل أفضل متوسط زمن احتفاظ (3.48) دقيقة، ومتوسط مساحة (8612329.5) عند استخدام نسبة الطور المتحرك (85:15 v/v) ASN/H₃PO₄(0.1%) كما في الشكل (4) (b)، ولكن هذه النسبة أخرجت مركبات الكركمين معاً في قمة واحدة دون فصلها فكان لا بد من تغيير هذه النسب وذلك لفصل المركبات عن بعضها البعض. تم فصل القمم عن بعضها البعض عند مجموعة من نسب الطور المتحرك [(35:65 v/v) (50:50 v/v) و(60:40 v/v)] من ASN/H₃PO₄(0.1%) على الترتيب وتم اعتماد نسبة الطور المتحرك (60:40 v/v)

ASN/H₃PO₄(0.1%) لأن قمم مركب الكركمين هي الأفضل من حيث متوسط مساحة وتمايز القمم ودقة الفصل وزمن الاحتفاظ الأقل (T₃=7.91، T₂=7.18، T₁=6.53) دقيقة كما في الشكل (4)(a).

جدول (2): تأثير نسب الطور المتحرك في تحديد مركب الكركمين

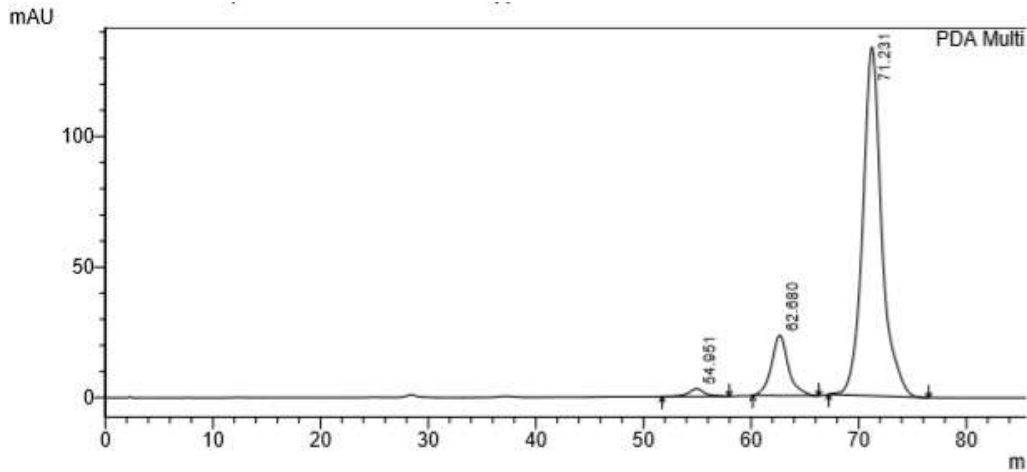
الطور المتحرك (Mobile Phase)	زمن الاحتفاظ Rt(min)*	متوسط مساحة القمة Area** ± RSD%			
		مساحة القمة Area** \bar{x}	SD	RSD%	حد الثقة*** $CI = \pm \frac{t \times SD}{\sqrt{n}}$
ASN/H ₃ PO ₄ (0.1%) (10:90 v/v)	-				-
ASN/H ₃ PO ₄ (0.1%) (25:75 v/v)	-				-
ASN/H ₃ PO ₄ (0.1%) (30:70 v/v)	66.85	11266.5	182.57	1.62	290.51
ASN/H ₃ PO ₄ (0.1%) (35:65 v/v)	T ₁ =54.95	X ₁ =80447.5	163.29	0.14	405.65
	T ₂ =62.68	X ₂ =673812	210.65	0.02	523.29
	T ₃ =71.23	X ₃ =4371222	301.28	0.01	748.43
		X _t =5125481.5			
ASN/H ₃ PO ₄ (0.1%) (50:50 v/v)	T ₁ =10.53	X ₁ =85945	100.42	0.08	249.47
	T ₂ =11.88	X ₂ =882802	262.09	0.02	651.08
	T ₃ =13.40	X ₃ =5990228	262.09	0.01	651.08
		X _t =6958975			
ASN/H ₃ PO ₄ (0.1%) (60:40 v/v)	T ₁ =6.53	X ₁ =87279	907.12	0.83	2253.43
	T ₂ =7.18	X ₂ =881260	817.31	0.08	2030.31
	T ₃ =7.91	X ₃ =7641952	816.49	0.01	2028.29
		X _t =8610491			
ASN/H ₃ PO ₄ (0.1%) (70:30 v/v)	3.15	4616576	907.12	0.83	2253.43
ASN/H ₃ PO ₄ (0.1%) (80:20 v/v)	3.01	4922073.5	817.31	0.08	2030.31
ASN/H ₃ PO ₄ (0.1%) (85:15 v/v)	3.48	8612329.5	816.49	0.01	2028.29
ASN/H ₃ PO ₄ (0.1%) (90:10 v/v)	2.91	4854849	262.09	0.01	651.08

T:25° C, Column (C 18), λ_{cur} = 425 nm, Flow: 1 ml/min

*: متوسط زمن احتفاظ المركب لأربع مكررات لكل تركيز.

** \bar{x} : متوسط مساحة قمة المركب لأربع مكررات لكل تركيز.

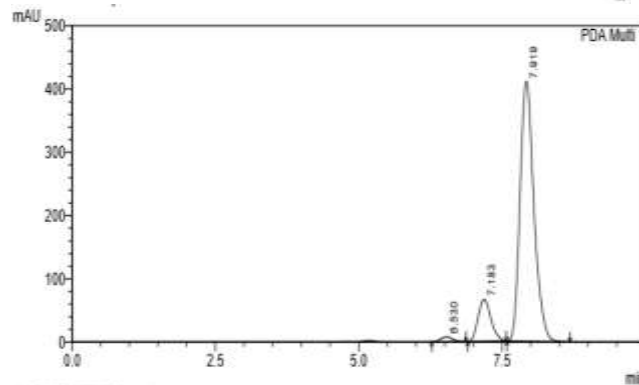
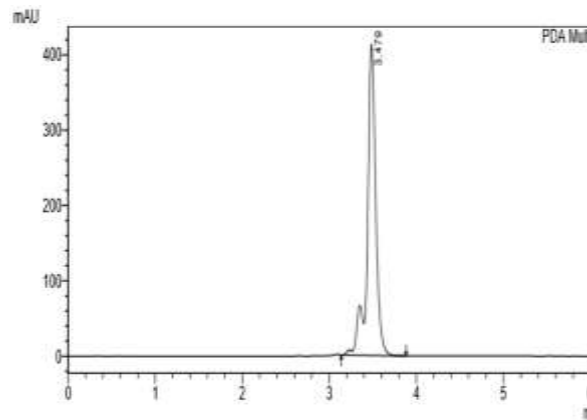
***: حد الثقة عند مستوى ثقة 95%.



الشكل (3): الكروماتوغرام الناتج عن تحليل الكركمين بطريقة ال HPLC ويحوي ثلاث قمم لمركبات الكركمين

عند نسبة الطور المتحرك (35:65 v/v) من ASN/H3PO4(0.1%)

يظهر الشكل (3) (a) ثلاث قمم لمركب الكركمين، حيث مركب الكركمين هو المكون ذو النسبة الأكبر 77% ولذلك تعتبر القمة ذو المساحة الأكبر عائدة لمركب الكركمين.



الشكل (4): (a) الكروماتوغرام الناتج عن تحليل الكركمين

بطريقة ال HPLC ويحوي ثلاث قمم لمركبات الكركمين

عند نسبة الطور المتحرك (60:40 v/v)

الشكل (4): (b) الكروماتوغرام الناتج عن تحليل الكركمين

بطريقة ال HPLC ويحوي قمة واحدة لمركبات الكركمين معاً عند

نسبة الطور المتحرك (85:15 v/v) من ASN/H3PO4(0.1%)

ASN/H3PO4(0.1%)

3. درجة الحرارة المثلى لفرن عمود الفصل الكروماتوغرافي:

نظراً لدور درجة الحرارة في تغيير زمن الاحتفاظ نتيجة تأثيرها على لزوجة الطور المتحرك وفعالية الطور الصلب تم تحليل عينة الكركمين في درجات حرارة عدة بدءاً من الدرجة 25°C إلى الدرجة 40°C. حصل تغير طفيف في مساحات قمم المركبات المكونة للكركمين مع تغير درجة حرارة فرن العمود، إذ لاحظ ازدياد مجموع مساحات قمم المركبات المكونة للكركمين زيادة طفيفة من (8634231) في درجة حرارة 25°C إلى (8673859) في درجة حرارة 40°C بانحراف معياري نسبي مثوي كما هو موضح في الجدول (3). بينما انخفض متوسط زمن الاحتفاظ لمركب الكركمين من 8.52 دقيقة في درجة حرارة 25°C إلى 7.85 دقيقة في درجة حرارة 40°C بانحراف معياري نسبي مثوي كما هو موضح بالجدول (3).

جدول (3) تأثير درجة حرارة فرن العمود في متوسط زمن الاحتفاظ ومساحة قمة مركب الكركمين 40 ppm

درجة حرارة العمود	مساحة القمة Area** \bar{x}	SD	RSD%	حد الثقة*** $CI = \pm \frac{t \times SD}{\sqrt{n}}$	متوسط زمن الاحتفاظ Rt(min)*
C 25	X ₁ =117343	120.02	0.13	298.15	T ₁ =7.19
	X ₂ =1098443	209.83	0.02	521.27	T ₂ =7.82
	X ₃ =7418545	209.83	0.01	521.27	T ₃ =8.52
	X ₄ =8634231				
C 30	X ₁ =118550	163.29	0.14	405.65	T ₁ =7.19
	X ₁ =1098444	210.65	0.02	523.29	T ₂ =7.82
	X ₂ =7418547	301.28	0.01	748.43	T ₃ =8.52
	X ₃ =8635441				
C 35	X ₁ =118454	100.42	0.08	249.47	T ₁ =6.66
	X ₂ =1098454	262.09	0.02	651.08	T ₂ =7.29
	X ₃ =7418547	262.09	0.01	651.08	T ₃ =8.00
	X ₄ =8635455				
C 40	X ₁ =120835	372.32	0.33	924.90	T ₁ =6.50
	X ₂ =1111590	533.98	0.05	1326.50	T ₂ =7.14
	X ₃ =7441433	533.98	0.01	1326.50	T ₃ =7.85
	X ₄ =8673859				

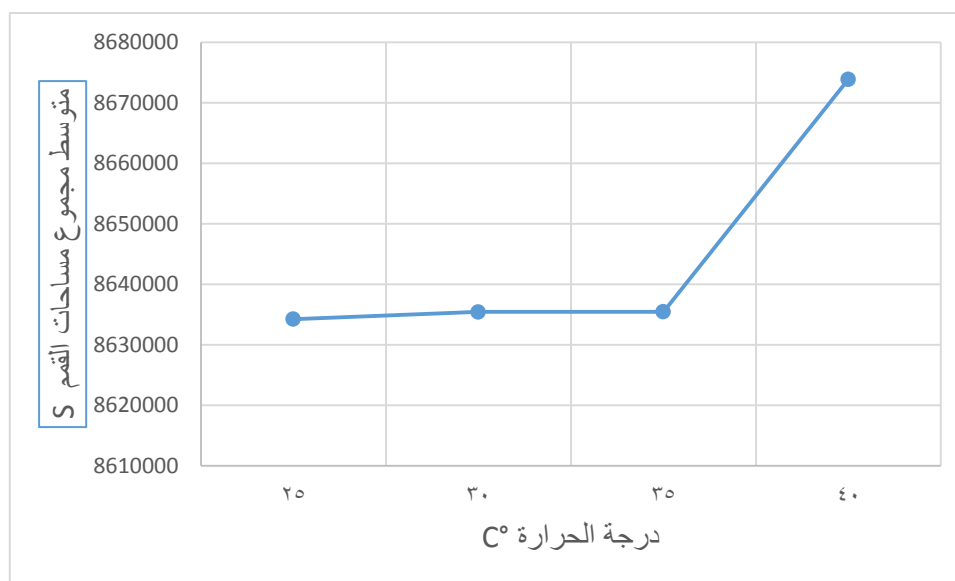
Column (C 18), $\lambda_{cur} = 425 \text{ nm}$, [ASN/H₃PO₄(0.1%) (60:40 v/v) Flow: 1ml/min

*: متوسط زمن احتفاظ المركب لأربع مكررات لكل تركيز.

** \bar{x} : متوسط مساحة قمة المركب لأربع مكررات لكل تركيز.

***: حد الثقة عند مستوى ثقة 95%

يظهر الشكل (5) المتمثل بالعلاقة $S=f(C^\circ)$ بأن درجة الحرارة المثالية هي $40^\circ C$.



الشكل(5): العلاقة بين حرارة فرن العمود مع متوسط مجموع مساحات القمم

4. التدفق الأمثل للطور المتحرك:

حققت عينة من محلول عياري لمركب الكركمين ذو التركيز 40 ppm، وتم تغيير تدفق الطور المتحرك في عمود الفصل الكروماتوغرافي (C_{18}) ضمن مجال محدد يتراوح بين 0.6–1.5ml/min بحسب نسبة الطور المتحرك المعتمدة. بلغ أعلى متوسط زمن احتفاظ للمركبات الثلاثة المكونة للكركمين ($T_1=7.13, T_2=7.95, T_3=8.15$) min عند تدفق الطور المتحرك 0.6ml/min، وأقل متوسط زمن احتفاظ لمركب الكركمين ($T_1=4.62, T_2=5.14, T_3=5.72$) min عند تدفق الطور المتحرك 1.5ml/min، حيث أن زمن الاحتفاظ Rt ينخفض مع زيادة التدفق إذ يساهم زيادة تدفق الطور المتحرك في زيادة تمليص مركب الكركمين في العمود الكروماتوغرافي. بينت النتائج المدرجة في الجدول (4) تغير في مساحة القمم بتغير تدفق الطور المتحرك، وسجل أفضل متوسط مساحة القمم للمركبات الثلاثة المكونة لمركب الكركمين 40ppm ($X_1=115209, X_2=1036062, X_3=6919353$) في التدفق 0.8ml/min، وبالتالي تم الحصول على أفضل فصل وأفضل شكل للقمم، كما هو موضحاً في الشكل (6).

جدول (4): تأثير تغير تدفق الطور المتحرك في تحديد مركب الكركمين

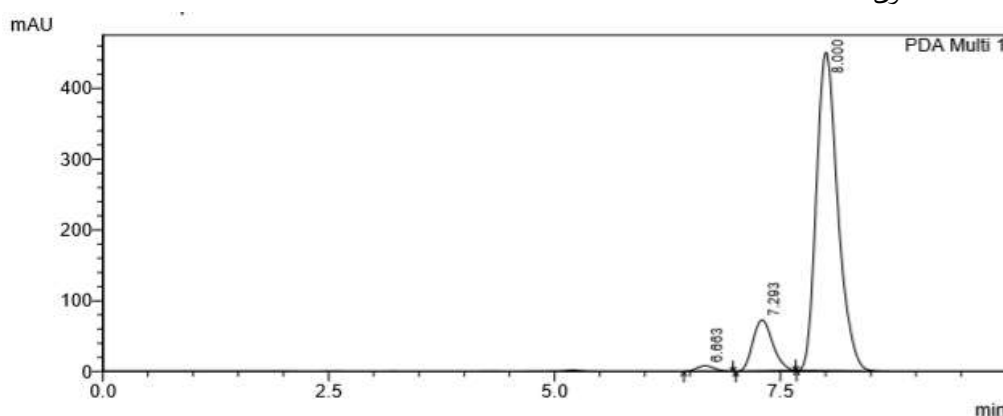
تدفق الطور المتحرك (ml/min)	مساحة القمة Area** \bar{x}	SD	RSD%	حد الثقة*** $CI = \pm \frac{t \times SD}{\sqrt{n}}$	متوسط زمن الاحتفاظ Rt(min)*
0.6	$X_1=112101$	73.5	0.06	182.58	$T_1=7.13$
	$X_2=1012122$	78.5	0	195	$T_2=7.95$
	$X_3=6907857$	74	0	183.82	$T_3=8.15$
	$X_4=8032080$				
0.8	$X_1=115209$	128.5	0.11	319.21	$T_1=6.63$

	X ₂ =1036062	129	0.01	320.45	T ₂ =7.29
	X ₃ =6919353	111	0	275.74	T ₃ =8.00
	X_t=8070624				
1	X ₁ =103912	55.5	0.04	137.87	T ₁ =6.23
	X ₂ =997657	66.5	0	165.19	T ₂ =6.89
	X ₃ =6895698	72.5	0	180.1	T ₃ =7.43
	X _t =7997267				
1.2	X ₁ =105542	222	0.21	551.48	T ₁ =5.82
	X ₂ =996670	73.5	0	182.58	T ₂ =6.46
	X ₃ =6759626	277.5	0	689.35	T ₃ =7.10
	X _t =7861838				
1.5	X ₁ =82700	166.5	0.20	413.61	T ₁ =4.62
	X ₂ =789391	111.5	0.01	276.98	T ₂ =5.14
	X ₃ =5431173	166	0	412.36	T ₃ =5.72
	X _t =6303264				
T:40° C, Column (C 18), λ _{cur} = 425 nm, [ASN/H ₃ PO ₄ (0.1%) (60:40 v/v)					

*: متوسط زمن احتفاظ المكب لأربع مكررات لكل تركيز.

** \bar{x} : متوسط مساحة قمة المركب لأربع مكررات لكل تركيز.

***: حد الثقة عند مستوى ثقة 95%



الشكل (6): كروماتوغرام مركب الكركمين 40ppm عند التدفق 0.8ml/min.

سجلت في الجدول (5) الشروط المثلى لفصل مركب الكركمين باستخدام عمود الفصل الكروماتوغرافي C₁₈ وفق تقانة HPLC:

جدول (5): الشروط المثلى لتحليل الكركمين

الشروط المثلى		مركبات الكركمين	
نسب الطور المتحرك	ASN/H ₃ PO ₄ (0.1%) (60:40 v/v)	مساحة القمة	R _t (min)
درجة الحرارة	40° C	X _(BDMC) =87279	T ₁ =6.31
تدفق الطور المتحرك	0.8 ml/min	X _(DMC) =881260	T ₂ =6.87
طول الموجة الأمثل	λ _{max} = 425nm	X _(CRM) =7641952	T ₃ =7.50
		X _t =8610491	

التحقق من صلاحية الطريقة:

تم التحقق من صلاحية الطريقة وذلك من خلال:

1. تكرارية فصل وتحديد مركب الكركمين:

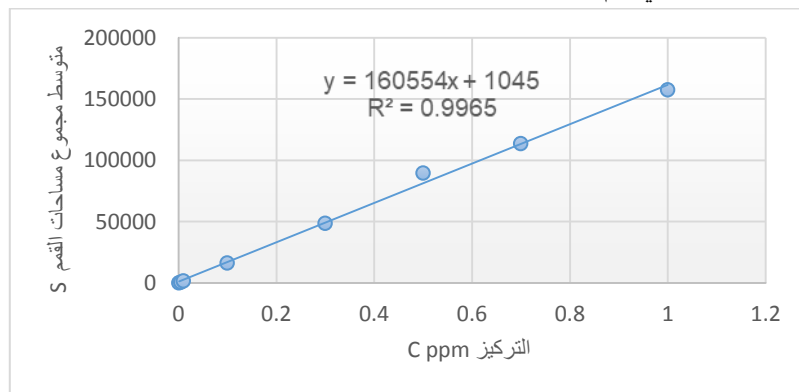
طبقت تكرارية فصل المركبات المكونة للكركمين وفق الشروط التحليلية المثلى في الجدول (5)، تم حقن سلسلة محاليل عيارية بتركيز (10,24,40) ppm في عمود الفصل الكروماتوغرافي (C₁₈)، ثم حسب متوسط مساحات قمم المركبات المكونة للكركمين والانحراف المعياري والانحراف المعياري النسبي المئوي لها وحد الثقة. يوضح الجدول (6) نتائج التكرارية لمركب الكركمين المدروس، حيث بلغ متوسط مساحات قمم المركبات المكونة للكركمين (2168373, 5231674, 8498316) لكل تركيز على التوالي.

جدول (6): تكرارية فصل وتحديد مركب الكركمين

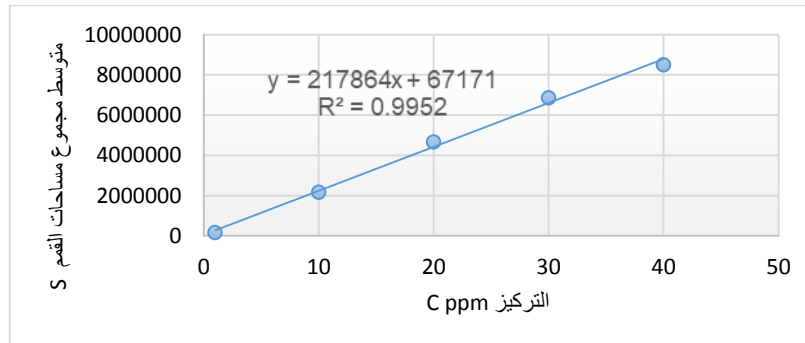
التركيز ppm	متوسط مساحة القمم Area	SD	$CI = \pm \frac{t \times SD}{\sqrt{n}}$	RSD%	1	2	3	4	5	6	7	8
10	X ₁ =	192.72	178.24	0.61	31638	31138	31438	31438	31438	31438	31738	31238
	X ₂ =	213.81	197.74	0.07	281857	281457	281057	281457	281457	281457	281457	281457
	X ₃ =	13150.9	12162.48	0.70	1846885	1854895	1850890	1887590	1850890	1850890	1850891	1850889
	X _t =	2168373	192.72	0.61	31638	31138	31438	31438	31438	31438	31738	31238
24	X ₁ =	260	240.46	0.34	75419	75549	75679	75159	75029	74899	75289	75289
	X ₂ =	53.45	49.43	0	677196	677196	677296	677096	677196	677196	677196	677196
	X ₃ =	1290.84	1193.83	0.02	4478109	4477029	4480269	4481349	4479189	4479189	4479189	4479189
	X _t =	1249.11	1155.23	0.02	5231674	5230724	5229774	5233244	5233604	5231414	5231284	5231674
40	X ₁ =	758.93	701.89	0.82	91698	92948	92698	93948	92124	93548	92823	93548
	X ₂ =	170.084	157.30	0.02	1842192	1841967	1841967	1842192	1841742	1841967	1841967	1841742
	X ₃ =	669.71	619.38	0.01	6563526	6564571	6564571	6563526	6562481	6563526	6563526	6563526
	X _t =	1139.99	1054.32	0.02	8497416	8499486	8499236	8499666	8496347	8499041	8498316	8498816

T:40° C, Column (C 18), λ_{cur} = 425 nm, [ASN/H₃PO₄(0.1%) (60:40 v/v)]. Flow: 0.8 ml/min, n=8

2. المنحني العياري وتحديد المجال الخطي لتحليل الكركمين بطريقة الـ HPLC وفق الشروط المثلى:
تم إنشاء منحني عياري لمركب الكركمين عند تراكيز مختلفة (0.001, 0.005, 0.01, 0.1, 0.3, 0.5, 0.7, 1) ppm ثم قيس مساحة القمم الكروماتوغرافية الموافق لكل تركيز وحسب متوسط مساحات قمم المركبات المكونة للكركمين ومن ثم رسم المنحني العياري وفق العلاقة $S=f(C)$ الشكل (7,a)، و تم حقن سلسلة محاليل عياريّة بتركيز (1, 10, 20, 30, 40) ppm في عمود الفصل الكروماتوغرافي (C_{18}) الشكل (7,b).
درست خطية المنحني العياري لمركب الكركمين عند طول الموجة $\lambda_{max}=425nm$.
يوضح الشكل (7,a) والشكل (7,b) أن هذه العلاقة هي علاقة خطية، وكانت العلاقة طردية بين التركيز ومساحة قمة الامتصاص ومن خلال هذا المنحني يتم حساب تراكيز مجهولة من محلول الكركمين.



الشكل (7,a): المنحني العياري لمركب الكركمين



الشكل (7,b): المنحني العياري لمركب الكركمين

3. الاسترجاعية R%:

تم اختبار صحة الطريقة، وحقن ثلاثة تراكيز مختلفة وبثلاثة مكررات لكل تركيز ثم تعويضها في معادلة المنحني العياري لحساب تركيز الكركمين المقاس (التركيز العملي)، ثم حسبت نسب الاسترجاعية R%.

$$R\% = \frac{\text{تركيز الكركمين المقاس}}{\text{تركيز الكركمين المحقون}} \times 100$$

يبين الجدول (7) النتائج التي تم التوصل إليها عند حساب R%، وتؤكد هذه النتائج إمكانية تطبيق الطريقة المقترحة تحليلياً.

جدول (7): نسبة الاسترجاع لمركب الكركمين لكل تركيز مستخدم ومتوسط الاسترجاع

y = 217864x + 67171								
التركيز النظري ppm	Y	التركيز العملي ppm	R%	R% ± SD	الوسطي	RSD%		
10	2237096.4	9.96	99.6	99.63±1257.82	99.4±9909.03	0.06		
10	2239275	9.97	99.7					
10	2237096.4	9.96	99.6					
24	5258870.1	23.83	99.3	99.3±6655.89		99.4±9909.03	0.13	
24	5254512.8	23.81	99.2					
24	5267584.7	23.87	99.4					
40	8694585.4	39.6	99	99.2±21786.4			99.4±9909.03	0.25
40	8738158.2	39.8	99.5					
40	8716371.8	39.7	99.3					

Y: مساحة قمة الامتصاص، x: التركيز (mg/l)، R%: نسبة الاسترجاع، SD: الانحراف المعياري، n=3، RSD%: الانحراف المعياري المثوي

4. تقدير حد الكشف النوعي LOD وحد الكشف الكمي LOQ:

تم تقدير حد الكشف النوعي (LOD) وحد الكشف الكمي (LOQ) وذلك بأخذ قيم تقابل ارتفاع التشويش لجهاز ال HPLC وتعويضها في العلاقات:

$$(3) \dots\dots\dots LOD = \frac{3SD}{a}$$

$$(4) \dots\dots\dots LOQ = \frac{10SD}{a}$$

حيث: SD هي الانحراف المعياري، a ميل المنحني العياري

يبين النتائج المدرجة في الجدول (8) قيم ارتفاع التشويش، ومتوسطها والانحراف المعياري ومن ثم حساب قيم LOD

و LOQ حسب المعادلة (3) (4) باستخدام ميل المنحني العياري a

جدول (8): قيم LOD و LOQ لمركب الكركمين المدروس

المركب	ارتفاع التشويش	\bar{x}	SD	a	LOD	LOQ
الكركمين	2.415	3.003	0.503	160403	0.009 ppb	0.056 ppb
	2.950					
	3.644					

الاستنتاجات والتوصيات:

1. يمكن تحليل مركب الكركمين بمكوناته الثلاثة وفق طريقة ال HPLC باستخدام شروط مثلى (نسب الطور المتحرك: (60:40v/v) ASN/H3PO4(0.1%)، درجة الحرارة 40°C، تدفق الطور المتحرك 0.8 ml/min، و طول الموجة الأمثل $\lambda_{max} = 425nm$)، للحصول على أفضل مساحة للقمم الكروماتوغرافية وفق زمن احتفاظ مناسب.

2. عند تغير نسب الطور المتحرك من حيث القطبية يتغير زمن احتفاظ مركب الكركمين بشكل ملحوظ، وهذا يعني بأنه يجب الاستمرار في تخفيض قطبية الطور المتحرك لتصبح الألفة أكبر بينه وبين مركب الكركمين، تم الوصول إلى أفضل زمن احتفاظ للمركبات الثلاثة المكونة لمركب الكركمين. ($T_1=6.31$, $T_2=6.87$, $T_3=7.50$).
3. أن مركب الكركمين هو الأكثر وجوداً بالمقارنة مع مركبي الذي ميتوكسي كركمين وال بيس دي ميتوكسي كركمين وذلك حسب قيم مساحات قمم المركبات الثلاثة.
4. تميزت الطريقة بدقة عالية من خلال القيمة المنخفضة للانحراف المعياري ($RSD \leq 1$)، وبلغت الاسترجاعية القيم ($R\% \pm SD = 99.4 \pm 9909.03$) مشيرة إلى صحة تحليل عالية، تمكنا من اعتماد هذه الشروط من تحليل الكركمين بطريقة ال HPLC.
5. يوصى باستخدام هذه الطريقة لتحديد وكشف الكركمين والمركبات المكونة له باستخدام تقانة الكروماتوغرافيا السائلة عالية الأداء HPLC، وفق الشروط المثلى للطريقة التحليلية المطورة.
6. الاهتمام في تحليل الأدوية والمشاركات الدوائية الجديدة وموادها الفعالة وتطوير طرق التحليل الكيميائي، لما لها من أهمية في تحديد نسب هذه المركبات بدقة في المزائج المحضرة.

References:

- [1] In-Cheng Chao, Chun-Ming Wang, Shao-Ping Li, Li-Gen Lin ID, Wen-Cai Ye and Qing-Wen Zhang. Simultaneous Quantification of Three Curcuminoids and Three Volatile Components of *Curcuma longa* Using Pressurized Liquid Extraction and High-Performance Liquid Chromatography. *Molecules* 2018; 23, 1568; doi:10.3390.
- [2] Zhou, Y.Q.; Wang, C.M.; Wang, R.B.; Lin, L.G.; Yin, Z.Q.; Hu, H.; Zhang, Q.W. Preparative separation of four sesquiterpenoids from *Curcuma longa* by high-speed counter-current chromatography. *Sep. Sci. Technol.* 2017,52, 497-503.
- [3] Niken K. Prabaningdyah, Sugeng Riyanto, Abdul Rohman, Chairany Siregar. Application of HPLC and response surface methodology for simultaneous determination of curcumin and desmethoxy curcumin in *Curcuma* syrup formulation. *Journal of Applied Pharmaceutical Science.* 2017; Vol. 7 (12), pp. 058-064.
- [4] Ji Li, Yunyun Jiang, Jun Wen, Guorong Fan, Yutian Wua and Chuan Zhanga. 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.* 2009; 23: 1201–1207.
- [5] Adamczak, A. Ożarowski, M., & Karpiński, T. M. (2020). Curcumin, a Natural Antimicrobial Agent with Strain-Specific Activity. *Pharmaceuticals (Basel, Switzerland)*, 13(7). <https://doi.org/10.3390/ph13070153>
- [6] NEHA DESAI, MUNIRA MOMIN, UPASANA SINGH, TABASSUM KHAN, ATUL SHERJE. ANALYTICAL METHOD DEVELOPMENT AND VALIDATION FOR SIMULTANEOUS ESTIMATION OF CURCUMIN AND CYCLOSPORINE BY RP-HPLC. 2018; *Int J Pharm Pharm Sci*, Vol 11, Issue 2, 26-33 23: 1201–1207.
- [7] SAVALE, S. SIMULTANEOUS ESTIMATION OF CURCUMIN AND GEFITINIB IN BULK BY USING RP-HPLC TECHNIQUE WITH PDA DETECTOR. 2018; *Hygeia.J.D.Med.*10 (1) 1-8.
- [8] Hemachaudhary.H. Development And Validation Of RP-HPLC Method For Simultaneous Estimation Of Diclofenac Diethylamine And Curcumin In Transdermal Gels. *Journal Of Liquid Chromatography & Related Technologies*, 2012;35:174-187.

- [9] Meng, F.C.; Zhou, Y.Q.; Ren, D.; Li, T.; Lu, J.J.; Wang, R.B.; Wang, C.M.; Lin, L.G.; Zhang, X.Q.; Ye, W.C.; et al. Turmeric: A review of its chemical composition, quality control, bioactivity, and pharmaceutical application. In Handbook of Food Bioengineering; Alexandru, M.G., Alina, M.H., Eds.; Academic Press: Cambridge, MA, USA, 2018; pp. 299–350.
- [10] Gul, P.; Bakht, J. Antimicrobial activity of turmeric extract and its potential use in food industry. *J. Food Sci. Technol.* 2015, 52, 2272–2279.
- [11] Jin, C.; Kong, W.J.; Luo, Y.; Wang, J.B.; Wang, H.T.; Li, Q.M.; Xiao, X.H. Development and validation of HPLC method for quality control of *Curcuma longa* Linn.: Fast simultaneous quantitation of three curcuminoids. *J. Pharm. Biomed.* 2010, 53, 43–49.
- [12] Devaraj S, Ismail S, Ramanathan S, Yam MF. Investigation of Antioxidant and Hepatoprotective Activity of Standardized *Curcuma xanthorrhiza* Rhizome in Carbon Tetrachloride-Induced Hepatic Damaged Rats. *The Sci. World J.*, Volume 2014; Article ID 353128. 8 pages. <http://dx.doi.org/10.1155/2014/353128>
- [13] Korany, M.A., Haggag, R.S., Ragab, M.A.A., dan Elmallah, O.A. A validated stability-indicating HPLC method for simultaneous determination of Silymarin and Curcumin in various dosage forms. *Arabian Journal of Chemistry* Volume 10, Supplement 2, May 2017; S1711-S1725
- [14] Nihayati E, Wardiyati T, Retnowati R, Soemarno. The curcumin content of temula wak (*Curcuma xanthorrhiza* Roxb.) rhizome as affected by N. K and micronutrients B. Fe. Zn. *Agrivita*, 2013;35(3): 218-226.
- [15] Rohman A, Sudjadi, Ramadhani D, Nugroho A. Analysis of Curcumin in *Curcuma longa* and *Curcuma xanthorrhiza* Using FTIR Spectroscopy and Chemometrics. *Res. J. Med. Plant*, 2015;9: 179–186.
- [16] Rukayadi Y, Hwang JK. In vitro activity of xanthorrhizol isolated from the rhizome of Javanese turmeric (*Curcuma xanthorrhiza* Roxb.) against *Candida albicans* biofilms. *Phytother Res.*, 2013;27:1061– 1066.
- [17] Syed HK, Liew KB, Loh GOK, Peh KK. Stability indicating HPLC–UV method for detection of curcumin in *Curcuma longa* extract and emulsion formulation. *Food Chem.*, 2015;170: 321–326.
- [18] Chatawatee, B., Chokpaisarn, J., Yusuf, M., Waehama, F., Kunworarath, N., Kongsuwan, C., & Salaemae, M. Effectiveness of knee acupressure along with herbal knee poultice for knee osteoarthritis treatment: A pilot pre-post clinical study. *Journal of Herbal Medicine*, (2022), 32. <https://doi.org/10.1016/j.hermed.2021.100498>
- [19] Susan J. Hewlings ID and Douglas S. Kalman. Curcumin: A Review of Its' Effects on Human Health Foods 2017, 6, 92; doi:10.3390/foods6100092.
- [20] Panigrahi S, Hirlekar R. A new stability-indicating RP-HPLC method for determination of curcumin: an application to the nanoparticulate formulation. *Int J Pharm Pharm Sci* 2016; 8:149-55.
- [21] In-Cheng Chao, Chun-Ming Wang, Shao-Ping Li, Li-Gen Lin ID, Wen-Cai Ye and Qing-Wen Zhang R. Simultaneous Quantification of Three Curcuminoids and Three Volatile Components of *Curcuma longa* Using Pressurized Liquid Extraction and High-Performance Liquid Chromatography. MDPI, *Molecules* 2018, 23, 1568; doi:10.3390/molecules23071568.
- [22] Sharma S, Saraogi GK, Kumar V. Development of spectrophotometric methods for simultaneous determination of artesunate and curcumin in a liposomal formulation. *Int J Appl Pharm* 2015; 7:18-21.

- [23] Dong WK, Abid MY, Dong XL, John OK, Chul SY, Kwan HC, et al. Development of RP-HPLC method for simultaneous determination of docetaxel and curcumin in rat plasma: validation and stability. *Asian J Pharm Sci* 2017; 12:105-13. 7.
- [24] Tejavathi DH, Sujatha BH, Kannan R. Estimation of curcuminoids in *Curcuma karnatakensis* (white turmeric)-an endemic taxon. *Asian J Pharm Clin Res* 2017; 10:360-3.
- [25] What role do immunomodulators have in assessing response to curcumin as an add-on therapy for patients with ulcerative colitis? *Clin Gastroenterol Hepatol* 2016; 14:912–9.