

울금색소 추출물의 항균성과 물질분리 동정

¹한신영 · 최석철

부산대학교 생활환경대학 의류학과
(2001. 9. 3. 접수/2001. 11. 26. 채택)

Antibacterial Activity and Identification of the Active Compound from Turmeric Extract

¹Shin Young Han and Suk Chul Choi

Dept. of Clothing and Textiles, Pusan National University, Pusan 609-735, Korea

(Received September 3, 2001/Accepted November 26, 2001)

Abstract—To identify the antimicrobial activity of turmeric and its active compound turmeric was fractionated into four groups dichloromethane extract, hexane fraction, methanol soluble fraction and residue's extract. They were tested for antibacterial activity against *E. coli* and *S. aureus* and the methanol soluble fraction was found to be the most active fraction. Compound I, II and III were isolated from TLC and silica gel column chromatography in the methanol soluble fraction. These compounds were analyzed by ¹H-NMR and ¹³C-NMR spectra and identified as curcumin I, II and III. They were also tested for antimicrobial activity against *E. coli* and *S. aureus*. Curcumin I was the most active curcuminoids due to the phenolic and methoxyl(OCH₃) moiety in the same molecular structure.

Keywords : antimicrobial activity, curcumin I, curcumin II, curcumin III, methoxyl(OCH₃) moiety

1. 서 론

울금은 다년생 식물로 키가 60~100cm에 짧은 줄기와 타원형의 잎사귀를 가진 식물이다. 꽃은 노랗고 10~15cm의 이삭모양으로 모여있으며 꽃자루는 15cm 정도이며, 뽕죽한 잎꼭지로 싸여있고 꽃이 피면 밝은 녹색의 포엽(苞葉)은 보라색으로 바뀐다. 울금은 일차적인 뿌리줄기로 구성되어 있는데 이들 모양은 달걀모양, 타원형, 서양배 모양이라 구근 혹은 둥근 turmeric 이라고 명명된다¹⁾. 울금의 활성성분인 curcumin[(E,E)-1,7-bis(4-

hydroxy-3-methoxyphenyl)-1,6-heptadiene-3,5-one]은 turmeric의 뿌리의 1.5~2%의 무게에 해당되고, 그 구조는 diarylheptanoid로 1910년에 처음으로 밝혀졌는데 이것은 콜레스테롤 수치를 감소시키며 발암 물질을 억제시키는 항암성, 항돌연변이성, 항종양성 등의 약학적으로 유용한 성분을 가지고 있고 간을 보호하는 기능을 가지며, 담즙분비를 촉진시키고 *in vivo*에서뿐만 아니라 *in vitro*에서도 혈소판 응집을 저지한다²⁾.

울금의 생리적 기능에 관한 연구로는 Thosiya 등³⁾은 silica gel chromatography에서 분리한 curcuminoids의 항산화작용에 대해 보고하였고 Geoffrey 등⁴⁾은 에틸아세테이트로 추출한 울금으로부터 얻은 분획물의 생리적 기능에 대한 연구와

¹Corresponding author. Tel. : +82-51-510-1719 ; Fax. : +82-51-583-5975 ; e-mail : hansy@netian.com

NMR분석을 통해 물질을 분리 동정하였으며 silica gel column chromatography를 이용하여 분리한 울금 분획물들의 항균효과에 대한 연구가 있다⁵⁾. Andrew 등⁶⁾은 dichloromethane으로 추출한 울금으로부터 TLC를 이용하여 curcumin성분을 분리하였고, Russel 등⁷⁾은 HPLC를 이용하여 curcumin이 keto-enol tautomerism으로 존재하고 있고 enol form은 curcumin이 분자간, 분자내에서 수소결합을 할 수 있도록 해주며 금속과 복합체를 이룬다는 것을 밝혔다.

울금 추출물과 그 염색포의 항균성에 관해서는 전보⁸⁾에서 보고하였다. 따라서 울금의 항균활성에 영향을 주는 물질과 그 구조를 밝히기 위해서 본 연구에서는 여러 가지 용매를 이용하여 분획한 울금의 분획물들의 항균활성 실험을 실시하였고 이들 분획물 가운데 가장 높은 항균활성을 나타낸 분획물을 TLC와 column chromatography로 물질을 분리하여 C^{13} -NMR, H^1 -NMR을 이용하여 항균활성에 영향을 주는 물질을 동정하였다.

2. 재료 및 실험방법

2.1 실험재료 및 시약

2.1.1 재료

부산광역시 약재상에서 건조시킨 중국산 울금을 구입하여 분쇄하여 사용하였다.

2.1.2 시약

추출용 시약, column chromatography, TLC 전용 용매는 1급 시약을 사용하였다. Silica gel column chromatography용 silica gel은 Kiesel gel 60(Merck, Art. 7734)을 사용하였고, TLC(Thin Layer Chromatography) plate는 Kiesel gel 60F₂₅₄(Precoated, Merck, Art. 5735)를 사용하였으며, spray reagent는 50% H_2SO_4 를 사용하였다. NMR 측정시 사용한 용매는 DMSO- d_6 (Merck, deuterium degree 99.95%)을 사용하였다.

2.2 울금 추출물의 제조 및 분리 동정

2.2.1 추출 및 분획

건조시켜 분쇄한 울금 200g에 dichloromethane를 첨가하고 4시간 shaking한 다음 evaporating하여 추출한 dichloromethane extract(dichloromethane ext.) 14.5g을 n-Hexane : methanol(1:1) 혼합용매로 분획하여 hexane soluble fraction(hexane fr.) 6.8g과 methanol soluble fraction(methanol fr.) 7.7g

를 얻었고, dichloromethane ext.를 제조하고 남은 잔사 180g를 methanol로 추출하여 methanol extract(methanol ext.)을 얻었다(Fig. 1).

2.2.2 항균성 물질의 분리

각 용매에 대한 울금 분획물의 *E. coli*와 *S. aureus*에 대한 항균활성이 가장 높게 나타난 methanol fr.을 silica gel에 흡착시켜 dichloromethane로 충분히 현탁시킨 후 고정된 column에 충전하여 같은 용매로 씻어 내려 subfraction을 얻었다. 각 subfraction들의 항균활성 물질을 확인하기 위하여 CH_2Cl_2 : MeOH(30 : 1) 혼합용매로 TLC를 수행하여 3개의 화합물을 분리하여 compound I, II, III를 얻었다(Fig. 1).

2.2.3 NMR 분석과 동정

Varian Unity(300 MHz, 75.5 MHz)와 Bruker DRX(300 MHz, 75.5MHz) 그리고 JEOL(JNM-ECP 400 MHz)로 1H -NMR, ^{13}C -NMR spectrum을 측정하였으며, DMSO- d_6 (Merck, deuterium degree 99.95%)을 용매로 사용하였다. 화학적 이동치(chemical shift)는 내부표준물질로 tetramethylsilane(TMS)를 사용하여 ppm단위로 나타내었다.

2.3 항균성 시험

2.3.1 시험균

균주는 한국과학기술연구원 유전공학 연구소 유전자은행(Korean Collection for Type Cultures)으로부터 분양을 받아 사용하였다. *Escherichia coli* KCTC 1039(*E. coli*)와 *Staphylococcus aureus* KCTC 1928(*S. aureus*)를 사용하였다.

2.3.2 배지

균주는 37°C에서 12시간 배양하고 50% glycerol을 1 : 1로 혼합하여 -75°C에서 보관하면서 사용하였고, Nutrient 액체배지 및 고체배지를 항균실험용 배지로 사용하였다.

2.3.3 항균력 시험

항균력을 액체배지희석법으로 측정하였다. Nutrient 액체배지 10ml에 접종하여 3회 계대배양한 균주를 18~24시간 배양하여 균주를 활성화시킨 후, 배지에 희석하여 OD₆₀₀ 0.1로 조정하고(2.5×10^7 CFU/ml) 100 μ l를 액체 배지(10ml)가 들어 있는 시험관에 접종하였다. 적당한 농도의 색소추출물을 100 μ l첨가하여 세균류를 37°C에서 24시간 정치배양한 다음, spectrophotometer를 사용하여 600nm

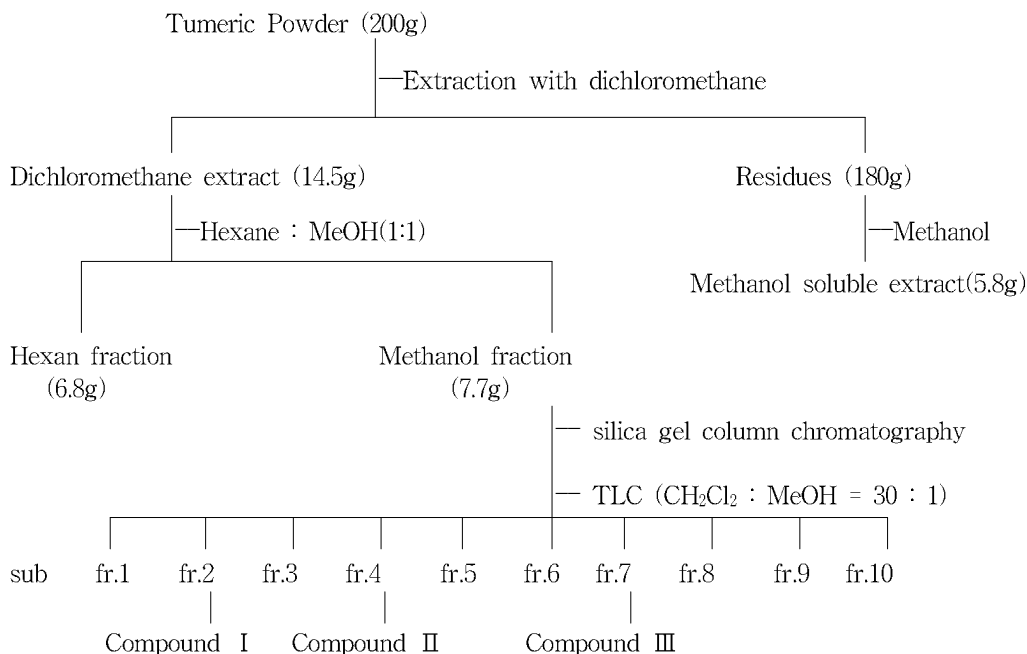


Fig. 1. The procedure for the solvent fractionation of tumeric.

에서 흡광도로 증식도를 측정하였다.

2.4 통계처리

대조군과 각 시료로부터 얻은 실험결과로부터 ANOVA를 구한 후, Duncans's multiple range test를 이용하여 통계분석 하였다.

3. 결과 및 고찰

3.1 울금 분획물의 항균성

울금의 각 용매별 분획물의 항균활성을 알아보기 위해서 *E. coli*와 *S. aureus*에 대한 성장억제 효과를 관찰하였다. OD값은 배지의 혼탁도(turbidity)를 나타내는 것으로 균주의 성장이 활발할수록 OD값이 커지게 되는데 이 값이 낮아진다는 것은 균주의 성장이 억제되었다는 것을 의미한다. 각 분획물들의 농도가 높아질수록 OD값이 낮아졌는데, 1%의 농도에서 dichloromethane ext., hexane fr., methanol fr과 methanol ext.는 *E. coli*에 대해서 각각 52%, 38%, 64%, 42%의 성장을 억제시켰고(Table1), *S. aureus*에 대해서는 55%, 12%, 71%, 62%의 성장억제효과를 나타내어(Table 2) 이들 분획물 가운데 methanol fr.이 *E. coli*와 *S. aureus*에 대해 항균활성이 가장 높다는

것을 알 수 있었다.

3.2 항균 활성 물질의 분리 및 동정

3.2.1 항균활성 물질 분리

가장 높은 항균 활성을 나타낸 methanol fr.으로부터 silica gel column chromatography를 실시하여 이들을 TLC상에 전개하여 비슷한 Rf치를 보이는 fraction들을 묶어 compound I, II, III로 분리하였고 이들의 수율은 각각 1.1%, 0.7%, 1.5%였다. 각 compound들의 항균활성 시험을 실시한 결과 농도가 높아질수록 각 compound의 항균력이 높아졌다. *E. coli*에 대하여 compound I은 0.5% 농도에서 72%, 1%의 농도에서 97%의 항균활성을 나타내었고, compound II는 0.5%의 농도에서 50%, 1%의 농도에서 81%의 높은 항균활성을 보였지만 compound III은 항균활성을 거의 나타내지 않았다(Table 3). *S. aureus*에 대해서는 compound I은 0.5%의 농도에서 82%, 1%의 농도에서 99%의 항균력을 보였고, compound II에서는 0.5%의 농도에서 62%, 1%의 농도에서 75%의 높은 항균활성을 나타낸 반면, compound III에서는 57%의 항균활성을 보였으므로(Table 4) compound I과 compound II가 울금의 항균활성에 관여하는 물질로 사려된다.

Table 1. Antimicrobial activities of fractionated samples from tumeric on the growth of *E. coli*

| Sample | OD ₆₀₀ | | |
|--|-------------------------------|-------------------------------|-------------------------------|
| | 0.25% ¹⁾ | 0.5% | 1.0% |
| Control | 0.894±0.02 ^a | 0.894±0.02 ^b | 0.894±0.02 ^b |
| CH ₂ Cl ₂ ext. ²⁾ | 0.905±0.013 ^a (-) | 0.586±0.008 ^d (34) | 0.425±0.016 ^d (52) |
| Hexane fr. ³⁾ | 0.895±0.006 ^a (-) | 0.708±0.025 ^a (21) | 0.551±0.007 ^a (38) |
| MeOH fr. | 0.770±0.026 ^b (14) | 0.505±0.004 ^e (44) | 0.325±0.018 ^e (64) |
| Residues' MeOH ext. | 0.909±0.011 ^a (-) | 0.677±0.019 ^c (24) | 0.518±0.018 ^c (42) |

¹⁾Concentration of samples²⁾Extract³⁾Fraction

Parantheses indicate the inhibition rates(%)

^{a-e}Means with the different letters in the same column are significantly different(p <0.05) by Duncan's multiple range test**Table 2.** Antimicrobial activities of fractionated samples from tumeric on the growth of *S. aureus*

| Sample | OD ₆₀₀ | | |
|--|-------------------------------|-------------------------------|-------------------------------|
| | 0.25% ¹⁾ | 0.5% | 1.0% |
| Control | 0.589±0.007 ^b | 0.589±0.007 ^b | 0.589±0.007 ^b |
| CH ₂ Cl ₂ ext. ²⁾ | 0.572±0.006 ^d (3) | 0.521±0.003 ^d (11) | 0.267±0.009 ^d (55) |
| Hexane fr. ³⁾ | 0.586±0.005 ^a (-) | 0.565±0.003 ^a (4) | 0.519±0.009 ^a (12) |
| MeOH fr. | 0.497±0.015 ^e (16) | 0.304±0.001 ^e (48) | 0.171±0.008 ^e (71) |
| Residues' MeOH ext. | 0.584±0.005 ^c (1) | 0.533±0.004 ^c (10) | 0.221±0.027 ^c (62) |

¹⁾Concentration of samples²⁾Extract³⁾Fraction

Parantheses indicate the inhibition rates(%)

^{a-e}Means with the different letters in the same column are significantly different(p <0.05) by Duncan's multiple range test

3.2.2 올금 methanol fraction 물질 동정

3.2.2.1 compound I

Compound I 은 주황색 분말로 vanillin 황산 시약에 의하여 적색으로 발색된다. ¹H-NMR spectrum은 완전히 일치된 대칭구조의 spectrum이 관찰되었다. aromatic ring에서 ABX type(δ7.28, δ6.83, δ7.12)와 2개의 olefinic proton이 서로 trans-coupling하는 proton signal(δ7.55, δ6.65)이 관찰되었고, aliphatic region에서 methoxyl기에 기인한 3H분의 proton signal(δ8.86)이 2개 관찰되었다. δ5.92에 저자장으로 shift하고 있는 1H

분의 proton signal이 관찰되었다. ¹³C-NMR spectrum에서는 sp² carbon peak (δ112.02, δ116.89, δ124.27, δ141.86, δ122.77)와 sp² quaternary carbon peak(δ128.64, δ149.21, δ150.45)가 관찰되었고, δ56.77에 methoxyl기에 기인한 carbon signal이 관찰되었다. 그리고 ketone에 기인한 signal(δ184.96)과 δ102.13에 저자장 shift되어 있는 methylene carbon signal이 관찰되었다. 따라서 이 화합물은 문헌³⁾에 소개된 spectra data와 비교하여 curcumin으로 결론지었다.

Table 3. Antimicrobial activity of compound isolated from methanol fraction on the growth of *E. coli*

| Sample | OD ₆₀₀ | | |
|--------------|-------------------------------|-------------------------------|-------------------------------|
| | 0.25% ¹⁾ | 0.5% | 1.0% |
| Control | 0.934±0.020 ^a | 0.934±0.020 ^a | 0.934±0.020 ^a |
| Compound I | 0.623±0.007 ^c (33) | 0.257±0.010 ^f (72) | 0.025±0.012 ^c (97) |
| Compound II | 0.786±0.009 ^b (16) | 0.468±0.011 ^b (50) | 0.175±0.023 ^b (81) |
| Compound III | 0.921±0.016 ^a (1) | 0.865±0.023 ^a (7) | 0.739±0.016 ^a (21) |

¹⁾Concentration of extract

Parantheses indicate the inhibition rates(%)

^{a-c}Means with the different letters in the same column are significantly different(p <0.05) by Duncan's multiple range test

Table 4. Antimicrobial activity of fractionated samples from tumeric on the growth of *S. aureus*

| Sample | OD ₆₀₀ | | |
|--------------|-------------------------------|-------------------------------|-------------------------------|
| | 0.25% ¹⁾ | 0.5% | 1.0% |
| Control | 0.640±0.008 ^a | 0.640±0.008 ^a | 0.640±0.008 ^a |
| Compound I | 0.386±0.017 ^c (40) | 0.112±0.008 ^e (82) | 0.004±0.003 ^c (99) |
| Compound II | 0.477±0.009 ^b (26) | 0.245±0.019 ^b (62) | 0.160±0.020 ^b (75) |
| Compound III | 0.467±0.011 ^a (27) | 0.341±0.013 ^a (47) | 0.276±0.014 ^a (57) |

¹⁾Concentration of extract

Parantheses indicate the inhibition rates(%)

^{a-c}Means with the different letters in the same column are significantly different(p <0.05) by Duncan's multiple range test

3.2.2.2 compound II

Compound II의 ¹H-NMR spectrum에서는 aliphatic region에서 methoxy기기에 기인한 3H분의 proton signal(δ3.86)이 관찰되고, aromatic ring에서 ABX type(δ7.28, δ6.83, δ7.11)와 A₂B₂ type의 proton (δ7.51, δ6.85)의 peak pattern이 동시에 관찰되었다. 2개의 olefinic proton이 서로 trans-coupling하는 proton signal(δ7.56, δ6.66)이 관찰되고 δ5.92에 저자장으로 shift하고 있는 1H분의 proton signal이 관찰되었다. ¹³C-NMR spectrum에서 sp² carbon signal이 δ11.96, δ116.68, δ124.32, δ122.51, δ141.50 & δ117.25, δ131.42, δ141.85, δ122.73와 sp² quaternary carbon signal이 δ128.63, δ149.23, δ150.47 & δ128.16, δ110.96에 나타났고, δ56.77에 methoxy기가 기인한 carbon signal이 관찰되었

다. 그리고 ketone에 기인한 2개의 signal(δ185.01, δ184.92)과 δ102.17에 저자장 shift되어 있는 methylene carbon signal이 관찰되었다. 따라서, 이 화합물은 문헌³⁾에 소개된 spectra data와 비교하여 demethoxycurcumin으로 결론지었다.

3.2.2.3 compound III

Compound III의 ¹H-NMR spectrum은 완전히 일치된 대칭구조의 spectrum이 관찰되었다. aromatic ring에서 A₂B₂ type의 proton(δ7.51, δ6.85)의 peak pattern과 2개의 olefinic proton이 서로 trans-coupling하는 proton signal(δ7.56, δ6.61)과 δ5.92에 저자장으로 shift하고 있는 1H분의 proton signal이 관찰되었다. ¹³C-NMR spectrum에서 sp² carbon peak(δ117.24, δ131.42, δ141.50, δ122.49)와 sp² quaternary carbon peak (δ128.16, δ117.24, δ160.91)가 나타났고, ketone에 기인한 signal(δ

184.96)과 δ 102.22에 저자장 shift되어 있는 methylene carbon signal이 관찰되었다. 따라서 이 화합물은 문헌¹¹⁾에 소개된 spectra data와 비교하여 bisdemethoxycurcumin으로 결론지었다.

3.2.3 항균활성물질 동정

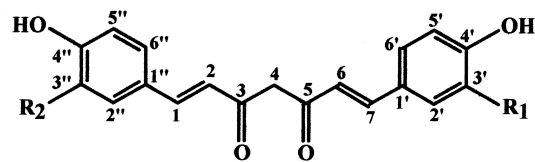
울금 methanol fr.으로부터 silica gel column chromatography를 실시하여 TLC 상에 전개하여 분리한 compound I, II, III를 ¹³C-NMR, ¹H-NMR 분석을 실시한 결과, curcumin, demethoxycurcumin, bisdemethoxycurcumin으로 동정되었고^{3,9)} 구조식은 Fig. 2와 같다. Compound I, II, III는 phenol기를 갖고 있고 Table 3과 Table 4에서 나타난 항균력 시험 결과에서 *E. coli*와 *S. aureus*에 대한 compound I와 compound II의 항균력이 높게 나타난 반면 compound III는 항균활성이 낮게 나타났는데 이는 compound I과 compound II에는 methoxyl

Table 5. ¹H-NMR Chemical shifts(100 MHz, DMSO-d₆) of curcumin I, II and III

| Proton | I | II | III |
|------------------|---------------------|----------------------|----------------------|
| 1 | 7.55(16) | 7.56(16) | 7.56(16) |
| 2 | 6.65(16) | 6.66(16) | 6.61(16) |
| 3 | | | |
| 4 | 5.92(s) | 5.92(s) | 5.92(s) |
| 5 | | | |
| 6 | 7.55(16) | 7.55(16) | 6.61(16) |
| 7 | 6.65(16) | 6.60(16) | 7.56(16) |
| 1' | | | |
| 2' | 7.28(2.0) | 7.28(1.7) | 7.51(8.5) |
| 3' | | | 6.85(8.5) |
| 4' | | | 6.85(8.5) |
| 5' | 6.83(8.3) | 6.83(8.5) | 7.51(8.5) |
| 6' | 7.12 (2.0 & 8.3) | 7.11 (1.7 & 8.5) | |
| 1'' | | | |
| 2'' | 7.28(2.0) | 7.51 (1H, d, 8.5) | 7.51 (1H, d, 8.5) |
| 3'' | | 6.85 | 6.85 |
| 4'' | | (1H, d, 8.5) | (1H, d, 8.5) |
| 5'' | 6.83(8.3) | 6.85 (1H, d, 8.5) | 6.85 (1H, d, 8.5) |
| 6'' | 7.12 (2.0 & 8.3) | 7.51 (1H, d, 8.5) | 7.51 (1H, d, 8.5) |
| OCH ₃ | 3.86(×2) | 3.86 | |

Table 6. ¹³C-NMR Chemical shifts(100 MHz, DMSO-d₆) of curcumin I, II and III

| Carbon | I | II | III |
|------------------|-----------|--------|--------|
| 1 | 141.86 | 141.85 | 141.50 |
| 2 | 122.77 | 122.73 | 122.49 |
| 3 | 184.96 | 185.01 | 184.96 |
| 4 | 102.13 | 102.17 | 102.22 |
| 5 | 184.96 | 184.92 | 184.96 |
| 6 | 122.77 | 122.51 | 122.49 |
| 7 | 141.86 | 141.50 | 141.50 |
| 1' | 128.64 | 128.63 | 128.16 |
| 2' | 112.02 | 111.96 | 131.42 |
| 3' | 149.21 | 149.23 | 117.24 |
| 4' | 150.45 | 150.47 | 160.91 |
| 5' | 116.69 | 116.68 | 117.24 |
| 6' | 124.27 | 124.32 | 131.42 |
| 1'' | 128.64 | 128.16 | 128.16 |
| 2'' | 112.02 | 131.42 | 131.42 |
| 3'' | 149.21 | 117.25 | 117.24 |
| 4'' | 150.45 | 160.96 | 160.91 |
| 5'' | 116.69 | 117.25 | 117.24 |
| 6'' | 124.27 | 131.42 | 131.42 |
| OCH ₃ | 56.77(×2) | 56.77 | |



R₁=R₂=OMe ; Curcumin I
 R₁=OMe , R₂=H ; Curcumin II
 R₁=R₂=H ; Curcumin III

Fig. 2. The structure of Curcumin I, II, III.

(OCH₃)기와 phenol기가 함께 존재하여 항균활성을 상승시키는데 비해 compound III에서는 methoxyl (OCH₃)기가 존재하지 않기 때문이라고 사려된다. 또한 compound I의 항균력이 compound II보다 높게 나타난 것은 methoxyl(OCH₃)기가 compound I에 1개 더 존재하고, 따라서 OCH₃기가 울금의 항균활성을 높이는 역할을 한다고 생각된다.

4. 결 론

울금 추출물의 항균활성에 관여하는 물질을 분리 동정하기 위하여 울금을 유기용매로 분획하여 항균성 실험을 통해서 각 분획물의 항균활성을 시험하였고, silica gel column chromatography와 TLC를 실시하여 얻은 compound I, II, III를 NMR분석하여 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. 유기용매로 분획한 울금의 항균활성 시험에서 dichloromethane ext., hexane fr.과 methanol fr.가운데 methanol fr.이 *E. coli*에 대해 64%, *S. aureus*에 대해 71%로 가장 높은 성장억제효과를 나타내었다.
2. 가장 높은 항균활성을 보인 methanol fr.으로부터 column chromatography와 TLC를 실시하여 얻은 compound I, II, III의 항균성 시험 결과 compound I이 가장 높은 항균활성을 보였다.
3. Compound I, II, III를 NMR분석한 결과 curcumin I, II, III(curcumin, demethoxycurcumin, bisdemethoxycurcumin)으로 동정되었으며 compound I이 가장 높은 항균력을 보인 것은 methoxyl(OCH₃)기가 항균활성에 관여하기 때문이라 생각된다.

참고문헌

1. Paolo Scartezzini and Ester Speroni, Review on Some of Indian traditional medicine with antioxidant activity, *J. Ethnopharmacology*, **71**, 23-43(2000).
2. Govindarajan, V. S., Tumeric-Chemistry, Technology, and Quality, *CRC Crit. Rev. Food Sci. Nutr.*, **12**, 199-201(1980).
3. Thosiya Masuda, Junko Isobe, Akiko Jito, and Nobuji Nakatani, *Phytochemistry*, Antioxidative curcuminoids from Rhizomes of *Curcuma Xanthorrhiza*, **31**, 3645-3647(1992).
4. Geoffrey N. Roth, Amitahb Chandra, and Muraleedharan, Novel Bioactivities of *Curcuma longa* Constituents, *J. Natural Products*, **61**, 542-545(1998).
5. Negi, P. S., Jayaprakasha, G. K., Jagan Mohan Rao, L. and Sakariah, K. K., Antibacterial Activity of Tumeric Oil : A Byproduct from Curcumin, *J. Agric. Food Chem.* **47**, 4297-4300(1999).
6. Andrew M. Anderson, Matthew S. Mitchell, and Ram S. Mohan, Isolation of Curcumin from Tumeric, *J. Chem. Ed.*, **77**, 359-360(2000).
7. Russell L. Rouseff, High Performance Liquid Chromatographic Separation and Spectral Characterization of the Pigments in Tumeric and Annatto, *J. Food Science*, **53**, 1823-1826(1988).
8. Shin Young Han and Suk Chul Choi, Antibacterial Characteristics of Extracts of Yellow Natural Dyes, *J. Korean Soc. Dyers and Finishers*, **12**, 43-50(2000).
9. Kyung-soo Chun, Yeowon Sohn, Ho-shik Kim, Ok-hee Kim, Kwang-kyun Park, Jong-min Lee, Jee-woo Lee, Ji-youn Lee, Aree Moon, Sang-sup Lee and Young-joon Such, Anti-tumor promoting potential of naturally occurring diarylheptanoids structurally related to curcumin, *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, **428**, 49-58(1999).