การหาปริมาณเคอร์คิวมินอยด์และน้ำมันหอมระเหยในขมิ้นชันจากแหล่งต่างๆในประเทศไทย

นางสาว สุภิญญา ติ๋วตระกูล

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาเภสัชศาสตรมหาบัณฑิต
ภาควิชาเภสัชเวท
บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
พ.ศ.2536

ISBN 974-582-595-6

ลิขสิทธิ์ของบัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

I 18098204

Curcuminoids and Volatile Oil Determination in Turmeric from Various Locations in Thailand

Miss Supinya Tewtrakul

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements
for the Degree of Master of Science in Pharmacy
Department of Pharmacognosy
Graduate School
Chulalongkorn University
1993

ISBN 974-582-595-6

Thesis Title	Curcuminoids and Volatile Oil Determination in Turmeric from Various Locations in Thailand.
By	Miss Supinya Tewtrakul
Department	Pharmacognosy
Thesis Advisor	Assistant Professor Wanchai De-Eknamkul,Ph.D.
Thesis Co-Advisor	Associate Professor Nijsiri Ruangrungsi,M.Sc.

Accepted by the Graduate School, Chulalongkorn University Partial Fulfillment of the Requirements for the Master's Degree.

Thavorn Vajrabhaya ..... Dean Of Graduate School

(Professor Thavorn Vajrabhaya, Ph.D.)

Thesis Committee

Chaiyo Chaichantipyuth .....Chairman

(Associate Professor Chaiyo Chaichantipyuth,M.Sc.)

Wanchai De-Eknamkul .....Thesis Advisor

(Assistant Professor Wanchai De-Eknamkul,Ph.D.)

Nijsiri Ruangrungsi .....Member

(Associate Professor Nijsiri Ruangrungsi,M.Sc.)

Khanit Suwanborirux .....Member

(Khanit Suwanborirux, Ph.D.)

Y. Pisoo .....Member

(Yingyong Pisooksantivatana,M.Sc.)

พิมพ์ต้นฉบับบทคัดย่อวิทยานิพนธ์ภายในกรอบสีเขียวนี้เพียงแผ่นเดียว

สุภิญญา ติ่วตระกูล : การหาปริมาณเคอร์คิวมินอยด์และน้ำมันหอมระเหยในขมิ้นชันจากแหล่งต่าง ๆ ในประเทศไทย (CURCUMINOIDS AND VOLATILE OIL DETERMINATION IN TURMERIC FROM VARIOUS LOCATIONS IN THAILAND) อ.ที่ปรึกษา : ผศ.ดร.วันชัย ดีเอกนามกูล, อ.ที่ปรึกษาร่วม : รศ.นิจศิริ เรืองรังษี, 134 หน้า. ISBN 974-582-595-6

ผู้วิจัยได้พัฒนาวิธีวิเคราะห์อย่างง่ายเพื่อหาปริมาณเคอร์คิวมินอยด์แต่ละชนิด (curcumin, demethoxycurcumin และ bisdemethoxycurcumin) ในเหง้าขมิ้นชันแห้ง (*Curcuma longa* L. วงศ์ Zingiberaceae) โดยใช้เทคนิค TLC-densitometry ซึ่งเป็นวิธีที่ง่าย สะดวก รวดเร็วและมีความแม่นยำสูง ขมิ้นชันมากกว่า 30 สายพันธุ์จากจังหวัดต่าง ๆ ในประเทศไทยซึ่งปลูกที่แปลงทดลองจังหวัดตาก ตรังและพิจิตรได้ถูกนำมาวิเคราะห์หาปริมาณเคอร์คิวมินอยด์ทั้งสามชนิด ผลการทดลองที่ได้พบว่าขมิ้นชันที่ปลูกที่แปลงทดลองจังหวัดตากให้ปริมาณเคอร์คิวมินอยด์รวมเฉลี่ยสูงที่สุด (9.58% w/w) รองลงมาคือขมิ้นชันจากแปลงทดลองจังหวัดตรัง (8.49% w/w) และพิจิตร (7.42% w/w) สายพันธุ์ขมิ้นชัน 5 สายพันธุ์แรกที่ให้ปริมาณเคอร์คิวมินอยด์รวมสูงกว่าสายพันธุ์อื่นได้แก่ สายพันธุ์ T20 จากจังหวัดพิษณุโลก, T22 จากจังหวัดตาก, T23 จากจังหวัดชัยภูมิ, T31 จากจังหวัดนครพนม และ T37 จากจังหวัดร้อยเอ็ด สำหรับการหาปริมาณน้ำมันหอมระเหยในขมิ้นชันสายพันธุ์ต่าง ๆ พบว่าขมิ้นชันจากแปลงทดลองจังหวัดตากให้ปริมาณน้ำมันหอมระเหยเฉลี่ยสูงสุด (9.69% v/w) รองลงมาคือ ขมิ้นชันจากจังหวัดตรัง (6.97% v/w) และจากจังหวัดพิจิตร (6.69% v/w) ตามลำดับ ขมิ้นชัน 5 สายพันธุ์ที่ให้ปริมาณน้ำมันหอมระเหยสูงกว่าสายพันธุ์อื่น ได้แก่สายพันธุ์ T1 จากพิษณุโลก, T5 จากเชียงราย, T17 จากชุมพร, T22 จากตาก และ T31 จากนครพนม ในแง่ของการวิเคราะห์หาองค์ประกอบของน้ำมันหอมระเหยในเหง้าขมิ้นชันสายพันธุ์ต่าง ๆ โดยใช้เทคนิค GC และ GC-MS พบว่าขมิ้นชันทุกสายพันธุ์มีองค์ประกอบของน้ำมันหอมระเหยที่คล้ายกัน อย่างไรก็ตามขมิ้นชันที่ได้จากแปลงทดลองจังหวัดพิจิตรและตรังยังคงให้ปริมาณของ monoterpenes สูงกว่าขมิ้นชันจากจังหวัดตาก จากผลการวิจัยนี้สรุปได้ว่า สภาวะดินฟ้าอากาศมีอิทธิพลต่อการสร้างปริมาณเคอร์คิวมินอยด์และน้ำมันหอมระเหยในเหง้าขมิ้นชัน โดยที่แปลงทดลองจังหวัดตากจะมีสภาวะดังกล่าวเหมาะสมกว่าที่พิจิตรและตรัง นอกจากนี้ผู้วิจัยได้นำเอาเทคนิคของ TLC-densitometry และ GC มาใช้ในการศึกษาหาองค์ประกอบและปริมาณของเคอร์คิวมินอยด์และน้ำมันหอมระเหยในพืชบางชนิดในวงศ์ Zingiberaceae ผลการวิจัยพบว่าพืชแต่ละชนิดในวงศ์ Zingiberaceae ให้ลักษณะรูปแบบ (finger print) ขององค์ประกอบของเคอร์คิวมินอยด์และน้ำมันหอมระเหยที่เป็นลักษณะเฉพาะของพืชนั้น ๆ

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาควิชา เภสัชเวท ลายมือชื่อนิสิต .....

สาขาวิชา เภสัชเวท ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา .....

ปีการศึกษา 2535 ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม .....

C475244 : MAJOR PHARMACOGNOSY
KEY WORD: CURCUMA SPECIES/CURCUMINOIDS/VOLATILE OIL
SUPINYA TEWTRAKUL : CURCUMINOIDS AND VOLATILE OIL DETERMINATION IN TURMERIC FROM VARIOUS LOCATIONS IN THAILAND. THESIS ADVISOR : ASSIS. PROF. WANCHAI DE-EKNAMKUL, Ph.D. THESIS CO-ADVISOR : ASSO. PROF. NIJSIRI RUANGRUNSI, M.Sc. 134 pp. ISBN 974-582-595-6

A simple, rapid and accurate method of TLC-densitometry was developed to quantitate simultaneously the three curcuminoids (curcumin, demethoxycurcumin and bisdemethoxycurcumin) in the dried turmeric rhizome of *Curcuma longa* L. (Zingiberaceae). More than thirty cultivars of turmeric rhizomes from various provinces in Thailand had been regrown in Tak, Trang and Phichit experimental fields and, after maturation, were collected for quantitative analysis of the three curcuminoid content. The turmeric samples from Tak gave the highest value of average total curcuminoid content (9.58% w/w) followed by those from Trang (8.49% w/w) and Phichit (7.42% w/w) respectively. The top five of high curcuminoid-producing turmeric cultivars were T20 (originally from Phitsanulok), T22 (Tak), T23 (Chaiyaphum), T31 (Nakhon Phanom) and T37 (Roi Et). Quantitative analysis of the volatile oil content in the rhizomes of the same turmeric cultivars showed that the turmeric rhizomes from Tak experimental field, again, gave the highest value of average total volatile oil content (9.69% v/w) followed by those from Trang (6.97% v/w) and Phichit (6.69% v/w), respectively. The top five of high volatile oil containing turmeric cultivars were T1 (originally from Phitsanulok), T5 (Chiang Rai), T17 (Chumphon), T22 (Tak) and T31 (Nakhon Phanom). Analysis in the composition of the volatile oils from various turmeric cultivars by GC and GC-MS showed that all the turmeric rhizomes contained essentially the same volatile oil components. However, the turmeric samples obtained from Phichit and Trang showed relatively higher level of monoterpenes than the samples from Tak. From these results, it was concluded that the climatic and geographical conditions have an influence on the content and composition of curcuminoids and volatile oils in the turmeric rhizomes. The Tak experimental field seemed to be superior to the ones in Trang and Phichit for turmeric cultivation. The TLC-densitometry and GC were also used for studying the composition of curcuminoids and volatile oils in some selected zingiberaceous plants. The results suggested that each species of Zingiberaceae has its own characteristic pattern or "finger print" of curcuminoids and volatile oils.

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาควิชา เภสัชเวท ลายมือชื่อนิสิต .....

สาขาวิชา เภสัชเวท ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา .....

ปีการศึกษา 2535 ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม .....

หอสมุดกลาง สถาบันวิทยบริการ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ACKNOWLEDGEMENTS

The author wishes to express her deepest appreciation and grateful thanks to her advisor, Assistant Professor Dr. Wanchai De-Eknamkul of the Department of Pharmacognosy, Faculty of Pharmaceutical Sciences, Chulalongkorn University, for his helpful guidances, suggestions, keen interest and continual encouragements throughout the course of this work.

The author would like to acknowledge her grateful thanks to Associate Professor Nijsiri Ruangrungsi, Department of Pharmacognosy, Faculty of Pharmaceutical Sciences, Chulalongkorn University, for his helpful suggestions.

The author would also like to thank Mr.Sermsak Raktham.The Head of the Horticultural Research Institute, Department of Agriculture, Thailand, for his kindly provided of turmeric samples.

The author wishes to thank the University Development Commission(UDC) for a scholarship.

Finally, the author would further like to extend her sincere thank to all staff members of the Department of Phamacognosy, and the Research Unit for Herb and Spice Development, Faculty of Pharmaceutical Sciences, Chulalongkorn University, for their kindness and helps.

CONTENTS

Page

ABSTRACT (Thai)..... iv

ABSTRACT (English)..... v

ACKNOWLEDGEMENTS..... vi

CONTENTS..... vii

LIST OF FIGURES..... xi

LIST OF TABLES..... xiv

ABBREVIATIONS..... xvi

CHAPTER I INTRODUCTION..... 1

CHAPTER II HISTORICAL 6

1. Botanical Aspect of *Curcuma longa* Linn..... 6

2. Microscopy of *Curcuma longa* Rhizome..... 9

2.1 Intact Rhizome..... 9

2.2 Powdered Turmeric..... 11

3. Specification of High Quality Turmeric Powder..... 13

4. Chemical Constituents of *Curcuma longa* L..... 14

5. The Uses of *C. longa*..... 16

6. Chemistry, Distribution, and Detection of Diarylheptanoids..... 18

6.1 Chemistry and distribution of Diarylheptanoids... 18

6.2 Detection, Separation and identification of Diarylheptanoids..... 23

7. Structure and Chemical Properties of Diarylheptanoids 27

7.1 Curcumin..... 27

Page

7.2 Demethoxycurcumin..... 28
7.3 Bisdemethoxycurcumin..... 30
8. Biological Activities of Curcuminoids..... 31
8.1 Biological Activities of curcumin..... 31
8.2 Toxicity of curcumin..... 33
8.3 Pharmacokinetics of curcumin..... 34
8.4 Biological Activities of Demethoxycurcumin..... 34
8.5 Biological Activities of Bisdemethoxycurcumin... 35
9. The Proposed Biosynthetic Pathway of Curcuminoids.... 35
10. Chemistry and Biological Activities of Turmeric Oil.. 39
10.1 Chemical Properties of Turmeric Oil..... 39
10.2 Biological Activities of Turmeric Oil..... 41
CHAPTER III MATERIALS AND METHODS..... 42
1. Quantitative Analysis of Turmeric Curcuminoids..... 42
1.1 Plant Material..... 42
1.2 Reagents and Standards..... 42
1.3 Preparation of Standard Solutions..... 43
1.4 Sample Preparation..... 44
1.5 Thin Layer Chromatographic Conditions for Curcuminoid Separation..... 44
1.6 Densitometric Analysis..... 45
1.7 UV-vis Spectrophotometric Analysis..... 45
2. Determination of Turmeric Oil Content and Composition..... 47
2.1 Plant Material..... 47
2.2 Reagents and Apparatus..... 47

Page

2.3 Sample Preparation..... 47
2.4 Volatile Oil Content Determination..... 47
2.5 Gas Chromatographic Conditions..... 49
2.6 GC-MS Conditions..... 49
CHAPTER IV RESULTS..... 51
1. Detection of Curcuminoids in *Curcuma longa*..... 51
1.1 Separation of Curcuminoids by TLC..... 51
1.2 Identification of Each Curcuminoids by ^{1}HNMR.... 52
1.3 TLC-Densitometric Determination of Curcuminoids. 54
1.4 Calibration Curves..... 56
1.5 Sample Preparation..... 57
1.6 Accuracy , Precision and Reproducibility..... 57
2. Curcuminoid in *Curcuma longa*..... 60
2.1 Variation of Curcuminoid Contents in Turmeric Rhizomes of Different Cultivars..... 60
2.2 Ratio of Curcumin:Demethoxycurcumin : Bisdemethoxycurcumin..... 68
3. Volatile Oil in *Curcuma longa*..... 71
3.1 Variation of Volatile Oil Content in Various *Curcuma longa* Rhizomes 71
3.2 High and Low Volatile Oil-Containing Turmeric Cultivars..... 74
3.3 Gas Chromatographic Chromatogram of Turmeric Oil and Component Identification 75
4. Curcuminoids in Selected Zingiberaceons Plants..... 81
5. Volatile Oil Content and Composition in the Rhizomes of Some Selected Zingiberaceous Plants..... 85

Page

5.1 Volatile Oil Content..... 85

5.2 GC Chromatogram of Volatile Oils..... 89

CHAPTER V DISCUSSION..... 92

CONCLUSION..... 100

REFERENCES..... 103

APPENDIX..... 118

VITA..... 134

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

LIST OF FIGURES

FIGURE Page

1. *Curcuma longa* Linn. (Zingiberaceae)..... 7
2. Transverse section of *Curcuma longa* L. rhizome..... 10
3. Powder of *Curcuma longa* L. rhizome..... 12
4. Some diarylheptanoids found in higher plants..... 21
5. Chemical structure of rosocyanin..... 23
6. Fragment ion of curcumin by mass spectrometry..... 25
7. The structure of curcumin..... 27
8. The structure of demethoxycurcumin..... 29
9. The structure of bisdemethoxycurcumin..... 30
10. Biosynthetic pathway of curcumin..... 36
11. Alternative biosynthetic pathway of curcumin..... 38
12. Volatile oil components in turmeric rhizome..... 40
13. Standard curve of the curcumin based on uv-vis spectrophotometric method..... 46
14. Apparatus of volatile oil content determination.... 48
15. ^{1}H NMR spectrum of curcumin(A),demethoxycurcumin (B), and bisdemethoxycurcumin(C)..... 53
16. Absorption spectra of the three curcuminoids (in methanol) by uv-vis spectrophotometer 55
17. TLC chromatogram of the three curcuminoids in methanolic extract of turmeric..... 55

Page

18. Standard curves of the three curcuminoids based on TLC-densitometric method.....

19. Variation in the contents of curcumin,demethoxy-curcumin , bisdemethoxycurcumin and total curcuminoids in various turmeric rhizomes cultivated in Phichit..... 61

20. Variation in the contents of curcumin,demethoxy-curcumin , bisdemethoxycurcumin and total curcuminoids in various turmeric rhizomes cultivated in Trang..... 62

21. Variation in the contents of curcumin,demethoxy-curcumin , bisdemethoxycurcumin and total curcuminoids in various turmeric rhizomes culivated in Tak..... 63

22. Distribution of total curcuminoid contents in various turmeric rhizomes cultivated in Phichit(A), Trang(B) and Tak(C)..... 64

23. Ratio of the three curcuminoid contents in various turmeric rhizomes cultivated in Phichit(A), Trang(B) and Tak(C)..... 70

24. Variation of total volatile oil contents in various turmeric rhizomes cultivated in Phichit(A), Trang(B) and Tak(C)..... 72

25. Distribution of total volatile oil contents in various turmeric rhizomes cultivated in Phichit(A), Trang(B) and Tak(C)..... 73

26. A typical GC chromatogram of turmeric oil..... 76

Page

27. GC chromatograms of turmeric oil obtained from turmeric samples regrown in Phichit(A), Trang(B) and Tak(C)..... 79

28. TLC-chromatogram of crude extract of selected zingiberaceous plants coresponded to the species in Table 13..... 82

29. Total curcuminoid contents obtained from selected zingiberaceous plants 84

30. Each curcuminoid content obtained from selected zingiberaceous plants..... 84

31. Volatile oil contents(%v/w)obtained from selected zingiberaceous plants 87

32. Curcuminoids and volatile oil contents from selected zingiberaceous plants..... 88

33. Mass spectra of volatile oil components compared with authentic materials..... 129

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

LIST OF TABLES

TABLE Page

1. Specification of high quality turmeric powder..... 13
2. Chemical constituents of *Curcuma longa* rhizome..... 14
3. Ultraviolet- visible and fluorescence absorption of some natturally occuring diarylheptanoids..... 26
4. Percentage of each curcuminoid in turmeric rhizome and the percentage of total curcuminoid content..... 58
5. Percentage of each and total curcuminoid in turmeric sample by duplicate TLC- densitometric determination..... 59
6. Turmeric samples containing high curcuminoid contents..... 66
7. Turmeric samples containing low curcuminoid contents..... 66
8. Turmeric samples containing highly variable curcuminoid contents..... 67
9. Turmeric samples containing lowly variable curcuminoid contents..... 68
10. Turmeric samples containing high volatile oil contents 74
11. Turmeric samples containing low volatile oil contents 75
12. Turmeric oil components separated by GC and identified by GC-MS 77

Page

13. Composition of turmeric oil from Phichit, Trang and Tak 80
14. TLC-densitometric chromatogram of the three curcuminoids in selected zingiberaceous plants 82
15. Volatile oil contents (%v/w) of selected zingiberaceous plants..... 86
16. Typical GC chromatogram of selected zingiberaceous plants and percent relative of their volatile oil components..... 91
17. Source and collection number of turmeric cultivars obtained from different provinces in Thailand 119
18. Curcuminoid contents of various turmeric rhizomes cultivated in Phichit.....121
19. Curcuminoid contents of various turmeric rhizomes cultivated in Trang.....123
20. Curcuminoid contents of various turmeric rhizomes cultivated in Tak.....124
21. Volatile oil contents of various turmeric rhizomes cultivated in Phichit, Trang and Tak 126
22. Curcuminoid contents (%w/w) of selected zingiberaceous plants by TLC-densitometry.....128

ABBREVIATIONS

ABS	=	Absorbance
ar	=	Aromatic
em.	=	Emission
ex.	=	Excitation
Fig.	=	Figure
g	=	Gram
GC	=	Gas chromatography
GOT	=	Glutamate oxaloacetate transminase
GPT	=	Glutamate pyruvate transminase
g/kg	=	Gram/kilogram
^{1}HNMR	=	Proton nuclear magnetic resonance
HPLC	=	High performance liquid chromatography
IR	=	Infrared
max	=	Maximum
MHz	=	Megahertz
mg/kg	=	milligram/kilogram
mg/ml	=	milligram/milliliter
mm	=	Millimeter
min	=	Minute
MS	=	Mass spectrometry
MW	=	Molecular weight
m/z	=	Mass to charge ratio
NM,nm	=	Nanometer
NMR	=	Nuclear magnetic resonance
ppm	=	Part per million

Rf	=	Rate of flow in chromatography
RT	=	Retention time
TLC	=	Thin layer chromatography
UV	=	Ultraviolet
UV-vis	=	Ultraviolet-visible
vol	=	Volume
v/w	=	volume/weight
w/w	=	weight/weight
°C	=	Degree celsius
%CV	=	Coefficient variation
%SD	=	Standard deviation
µg	=	Microgram
µl	=	microliter

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย