การพัฒนาวิธีวิเคราะห์หาปริมาณเอเชียติโคไซด์ มาดีคัสโซไซด์ กรดเอเชียติก และกรดมาดีคัสซิก ในผงบัวบกด้วยไฮเพอร์ฟอร์แมนซ์ลิควิดโครมาโตกราฟี

นางสาว บังอร กงทอง

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาเภสัชศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชา เภสัชเคมี ภาควิชา เภสัชเคมี
คณะเภสัชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
ปีการศึกษา 2547
ISBN 974-53-1767-5
ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

DEVELOPMENT OF THE QUANTITATIVE DETERMINATION OF ASIATICOSIDE, MADECASSOSIDE, ASIATIC ACID AND MADECASSIC ACID IN *CENTELLA ASIATICA* (LINN.) URBAN BY HIGH-PERFORMANCE LIQUID CHROMATOGRAPHY

Miss Bungon Kongthong

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements
for the Degree of Master of Science in Pharmacy in Pharmaceutical Chemistry
Department of Pharmaceutical Chemistry
Faculty of Pharmaceutical Sciences
Chulalongkorn University
Academic Year 2004
ISBN 974-17-1767-5

Thesis Title	DEVELOPMENT OF THE QUANTITATIVE DETERMINATION OF ASIATICOSIDE, MADECASSOSIDE, ASIATIC ACID AND MADECASSIC ACID IN *CENTELLA ASIATICA* (LINN.) URBAN BY HIGH-PERFORMANCE LIQUID CHROMATOGRAPHY
By	Miss Bungon Kongthong
Field of study	Pharmaceutical Chemistry
Thesis Advisor	Assistant Professor Chamnan Patarapanich, Ph. D.
Thesis Co-advisor	Associate Professor Suwanna Laungchonlatan

Accepted by the Faculty of Pharmaceutical Sciences, Chulalongkorn University in Partial Fulfillment of the Requirements for the Master 's Degree

Boonyoung Tantisira
.....Dean of the Faculty of Pharmaceutical Sciences
(Associate Professor Boonyoung Tantisira, Ph. D.)

THESIS COMMITTEE

Mitr Pathipvanich
..... Chairman
(Assistant Professor Mitr Pathipvanich, Ph. D.)

.....Thesis Advisor
(Assistant Professor Chamnan Patarapanich, Ph. D.)

Suwanna Laungchonlatan
..... Thesis Co-advisor
(Associate Professor Suwanna Laungchonlatan)

Ekarin Saifah
..... Member
(Associate Professor Ekarin Saifah, Ph. D.)

Walapa Tatong
..... Member
(Walapa Tatong, Ph. D.)

บังอร กงทอง : การพัฒนาวิธีวิเคราะห์หาปริมาณเอเชียติโคไซด์ มาดีคัสโซไซด์ กรดเอเชียติก และกรดมาดีคัสซิก ในผงบัวบกด้วยไฮเพอร์ฟอร์แมนซ์ลิควิดโครมาโตกราฟี. (DEVELOPMENT OF THE QUANTITATIVE DETERMINATION OF ASIATICOSIDE, MADECASSOSIDE, ASIATIC ACID AND MADECASSIC ACID IN *CENTELLA ASIATICA* (LINN.) URBAN BY HIGH-PERFORMANCE LIQUID CHROMATOGRAPHY) อ. ที่ปรึกษา : ผศ. ดร. ชำนาญ ภัตรพานิช อ. ที่ปรึกษาร่วม : รศ. สุวรรณา เหลืองชลธาร 166 หน้า. ISBN 974-53-1767-5.

การศึกษานี้ได้พัฒนาวิธีไฮเพอร์ฟอร์แมนซ์ลิควิดโครมาโตกราฟี สำหรับหาปริมาณ มาดีคัสโซไซด์ เอเชียติโคไซด์ กรดมาดีคาซิก และกรดเอเชียติก โดยระบบประกอบด้วย คอลัมน์ชนิดซี-18 เป็นเฟสคงที่ และเฟสเคลื่อนที่เป็นส่วนผสมของอะเซโตไนไตร์ลต่อฟอสเฟตบัฟเฟอร์ (10 มิลลิโมล พีเอช 7.1) ในอัตราส่วน 29:71 ปรับอัตราการไหล 1 มิลลิลิตรต่อนาที มีเพรดนิโซโลนเป็นสารมาตรฐานภายใน และตรวจวัดด้วยดีเทคเตอร์ชนิดโฟโตไดโอดแอร์เรย์ที่ความยาวคลื่น 210 นาโนเมตร ตัวอย่างสารสกัดบัวบกทำให้สะอาดโดยใช้เทคนิคแยกสกัดด้วยโซลิคเฟสก่อนการวิเคราะห์ นอกจากนี้ยังได้พัฒนาวิธีทินแลโครมาโตกราฟีเพื่อวิเคราะห์มาดีคัสโซไซด์และเอเชียติโคไซด์ โดยใช้แผ่นซิลิกาเจลเป็นเฟสคงที่ และคลอโรฟอร์มต่อเมทานอลต่อน้ำ (30:15:2) เป็นเฟสเคลื่อนที่ การตรวจวัดแผ่นทินแลโดยฉีดพ่นสารละลายแอนโทรนและสแกนด้วยเดนซิโทมิเตอร์ที่ความยาวคลื่น 525 นาโนเมตร ซึ่งวิธีวิเคราะห์ทั้ง 2 วิธีดังกล่าวได้ผ่านการตรวจสอบความใช้ได้ตามข้อกำหนดของไอซีเอช พบว่า เปอร์เซ็นต์รีโคเวอรี อยู่ในช่วง 96–104 และ เปอร์เซ็นต์ความเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ไม่เกิน 3

วิธีที่ได้พัฒนาขึ้นถูกนำมาใช้ในการวิเคราะห์ตัวอย่างพืชบัวบก 22 ตัวอย่างที่เก็บจากแหล่งปลูก 2 แหล่งทุกเดือนตลอดเวลา 1 ปี ผงที่ได้จากการสกัด 5 ตัวอย่าง และผงที่ได้จากการสกัด 2 ตัวอย่างที่ถูกเก็บเพื่อตรวจสอบความคงตัวแบบเร่ง

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาควิชา เภสัชเคมี ลายมือชื่อนิสิต.....

สาขาวิชา เภสัชเคมี ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา.....

ปีการศึกษา 2547 ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม.....

4576575733 : MAJOR PHARMACEUTICAL CHEMISTRY
KEY WORD: *CENTELLA ASIATICA* / HPLC / ASIATICOSIDE / MADECASSOSIDE
BUNGON KONGTHONG : DEVELOPMENT OF THE QUANTITATIVE DETERMINATION OF ASIATICOSIDE, MADECASSOSIDE, ASIATIC ACID AND MADECASSIC ACID IN *CENTELLA ASIATICA* (LINN.) URBAN BY HIGH-HERFORMANCE LIQUID CHROMATOGRAPHY. THESIS ADVISOR : THSIS ADVISOR: ASST. PROF. CHAMNAN PATARAPANICH, Ph. D., THESIS COADVISOR : ASSOC. PROF. SUWANNA LAUNGCHONLATAN, 166 pp. ISBN 974-17-1767-5

A HPLC method was developed to determine madecassoside (MS), asiaticoside (AS), madecassic acid (MA) and asiatic acid (AA) simultaneously. The system comprises of a Hi-Q sil column (C_{18}, 4.6x150 mm, 5micron) as stationary phase, a 29:71 mixture of acetonitrile : phosphate buffer (10mM, pH 7.1) as mobile phase (flow rate 1.0 ml/min), prednisolone (PL) as an internal standard with a photodiode array detector at wavelength 210 nm. Each analyte sample from *Centella asiatica* (CA) extract was cleaned up by using the solid phase extraction techniques prior to inject to the system. Furthermore, thin-layer chromatographic (TLC) method was developed to determine MS and AS by using silica gel plate GF_{254} as stationary phase and chloroform : methanol : water (30:15:2) as developing solvent. The detection of the TLC spot was developed by spraying with anthrone reagent and scanned with densitometer at wavelength 525 nm. These methods were validated following ICH guideline. The percentage recovery were in range 96-104 and percent of RSD were not more than 3.

The developed method was applied to analyze the 22 plant samples collected every month throughout the year from two gardens, five extract powder and two plant extract during the accelerated stability program.

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

Department Pharmaceutical chemistry	Student's signature Bungon Kongthong
Field of study Pharmaceutical chemistry	Advisor's signature
Academic year 2004	Co-advisor's signature Suwanna Laungchonlatan

Acknowledgements

I wish to express my sincerely indebted to my thesis advisor, Assistant Professor Chamnan Ratarapanich, and my thesis co-advisor, Associate Professor Suwanna Laungchonlatan, for their valuable advice, continual guidance, kindness, and understanding throughout my graduate study period. Their scientific open-mindedness encouraged me to successfully complete this unique research. And I would like to thank research grand of government for budget support.

I am sincerely grateful to Assistant Professor Mitr Pathipvanich, Associate Professor Ekarin Saifah and Dr. Walapa Tatong for serving on my committee. Their suggestion and discussion made this thesis more complete.

My great appreciation is extended to Dr. Pornchai Rojsitthisak for his suggestions.

I would like to thank scientists of the department of pharmaceutical chemistry for proving facilities during my study. I also thank to all of my friends for their kind assistance, encouragement and friendship throughout this study.

Finally, I would like to express my appreciation to my dear parent for their love and understanding.

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

CONTENT

Page

ABSTRACT (Thai).....iv

ABSTRACT (English).....v

ACKNOWLEDGEMENTS.....vi

CONTENTS.....vii

LIST OF SCHEME.....ix

LIST OF TABLES.....x

LIST OF FIGURE.....xii

ABBREVIATIONS.....xiv

CHAPTER

I INTRODUCTION.....1

II LITERATURE REVIEW.....5

- Botanical description.....5
- Chemical constituents.....6
- Medicinal and pharmacological activities.....8
- Applications.....21
- Overview of the analytical method.....22

III MATERIALS AND METHODS.....25

- Materials.....25
- Collection of plant sample and storage.....27
- Extraction and Isolation of triterpene glycoside.....28
- Preparation of AS, AA, MS and MA as working standard.....29
- Identification of Triterpene glycoside and its aglycone.....30
- Determination of purity of isolated AS, MS, AA and MA.....34
- Development of analytical method for quantitative determination.....36
- Method validation.....40
- Determination of MS, AS, MA and AA.....56

IV RESULTS AND DISCUSSIONS.....62

- Collection of plant sample and storage.....62

- Extraction and Isolation of triterpene glycoside.....62
- Preparation of AS, AA, MS and MA as working standard.....61
- Identification of Triterpene glycoside and its aglycone.....63
- Determination of purity of isolated AS, MS, AA and MA.....67
- Development of analytical method for quantitative determination.....68
- Method validation.....75
- Determination of MS, AS, MA and AA.....83

V CONCULSION.....86

REFERENCES.....90

APPENDICES.....100

VITAE.....164

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

LIST OF SCHEMES

Scheme		Page
3.1	Extraction and isolation scheme for triterpene glycoside from CA	30
3.2	Scheme of alkaline hydrolysis of glycoside	31

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

LIST OF TABLES

Table		Page
3.1	Preparation of aglycone stock standard solutions for method validation	40
3.2	Preparation of stock mixture standard solutions for method validation	41
3.3	Concentration of working standard solutions	42
3.4	Concentration of additional working standard solutions	43
3.5	Preparation of sample solutions for TLC method validation	52
3.6	Preparation of acid standard solutions for sample analysis	55
3.7	Preparation of stock standard mixture solutions for sample analysis	56
3.8	Concentration of working standard solutions	57
4.1	Collecting times of Guto Kola	98
4.2	Efficiency of extracting solvent for extraction of *Centella asiatica*	98
4.3	Percentage content of extraction of *Centella asiatica* with methanol-water (80 %) at various time	98
4.4	Effect of ratio of organic solvent in buffer on capacity factor	99
4.5	Effect of pH of buffer on capacity factor	99
4.6	Accuracy test of HPLC analytical method	100
4.7	Intra-day precision test of HPLC analytical method	104
4.8	Inter-day precision test of HPLC analytical method	108
4.9	Linearity and range test of HPLC analytical method	112
4.10	System suitability test	113

Table **Page**

4.11 Method validation for TLC analytical method.....115

4.12 Percentage content in whole plant and leaves and stems of *Centella asiatica* by HPLC.....118

4.13 Percentage content of MS and AS in extracted powder by HPLC.....121

4.14 Stability of MS and AS in extracted powder.....121

4.15 Percentage content in whole plant and leaves and stems of *Centella asiatica* by HPLC.....122

5.1 Chromatographic system suitability.....124

5.2 Method validation test of HPLC analytical method.....124

5.3 Data of method validation for Thin-Layer Chromatograph.....125

5.4 Percentage content of MS, AS, MA and AA in whole plant and leaves and stems of *Centella asiatica* by HPLC.....125

5.5 Percentage content of MS, AS, MA and AA in whole plant and leaves and stems of *Centella asiatica* by HPLC.....126

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

LIST OF FIGURE

Figure		Page
2.1	Picture of *Centella asiatica*.....	5
2.2	Some structure of the triterpenoids from CA.....	6
3.1	Picture of CA garden in Nakornpathom province.....	26
3.2	Chromatogram for calculation of Number of theoretical plates.....	49
3.3	Chromatogram for calculation of tailing factor.....	50
3.4	Chromatogram for calculation of resolution.....	51
4.1	TLC chromatogram of reference standard and isolated compounds.....	127
4.2	HPLC chromatogram of reference standard and isolated compounds...	128
4.3	IR spectrum of isolated madecassoside.....	132
4.4	IR spectrum of isolated asiaticoside.....	133
4.5	IR spectrum of isolated madecassic acid.....	134
4.6	IR spectrum of isolated asiatic acid.....	135
4.7	^{1}H-NMR spectrum of isolated madecassoside.....	136
4.8	^{1}H-NMR spectrum of isolated asiaticoside.....	136
4.9	^{1}H-NMR spectrum of isolated madecassic acid.....	137
4.10	^{1}H-NMR spectrum of isolated asiatic acid.....	137
4.11	^{13}C-NMR spectrum of isolated madecassoside.....	138
4.12	^{13}C-NMR spectrum of isolated asiaticoside.....	138
4.13	^{13}C-NMR spectrum of isolated madecassic acid.....	139
4.14	^{13}C-NMR spectrum of isolated asiatic acid.....	139
4.15	Percentage content of extraction of *Centella asiatica* with methanol-water (80 %) at various time.....	140

Figure **Page**

4.16 HPLC chromatogram of sample with /without pretreatment with solid phase extraction.....141

4.17 HPLC chromatogram of standard and extract sample.....142

4.18 3D- HPLC chromatogram of standard and sample.....143

4.19 UV spectrum of each compounds in standard and sample.....144

4.20 HPLC chromatogram of standard solution by using phenyl column.....148

4.21 HPLC chromatogram of standard solution in several of organic solvent in mobile phase.....149

4.22 HPLC chromatogram of standard solution effecting by pH of mobile phase and concentration of buffer in mobile phase.....150

4.23 Color fading diagram in TLC chromatogram.....152

4.24 TLC chromatogram of standard and extract detected by TLC-densitometer.....153

4.25 Linearity and range test of HPLC and TLC analytical methods.....154

4.26 Percentage content of MS, AS, MA and AA in whole plant of *Centella asiatica* by HPLC method.....157

4.27 Percentage content of MS, AS, MA and AA in leaves and stems of *Centella asiatica* by HPLC method.....159

4.28 Percentage content of MS and AS in *Centella asiatica* by TLC analytical method.....161

4.29 Correlation of results of determination of MS and AS in *Centella asiatica* by using HPLC and TLC method.....162

LIST OF ABBREVIATIONS

AA	Asiatic acid
AR	Analytical reagent
AS	Asiaticoside
asym	Asymmetry
°C	Degree Celsius
CA	*Centella asiatica*
cm	Centrimeter
CV	Coefficient of variation
g	Gram
HPLC	High Performance Liquid Chromatography
IR	Infrared
k'	Capacity factor
l	Liter
MA	Madecassic acid
mg	Milligram
ml	Milliliter
mm	Millimeter
mM	Millimolar
min	Minute
m p	Melting point
MS	Madecassoside
M W	Molecular weight
NMR	Nuclear Magnetic Resonance

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

nm	Nanometer
NO.	Number
PL	Prednisolone
SD	Standard deviation
%R	Percent recovery
r^2	Coefficient of determination
RSD	Relative standard deviation
TECA	Titrated extract of *Centella asiatica*
TLC	Thin Layer Chromatography
t_R	Retention time
UV	Ultraviolet
µg	Microgram
µl	Microliter
µm	Micrometer
δ	Chemical shift

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย