

การแยก การทำให้บริสุทธิ์ และการวิเคราะห์หาปริมาณของเอเชียติโคไซด์ มาติคัลไซไซด์ กรดเอเชียติก และกรด
มาติคัลซิกในบวบกสายพันธุ์ต่างๆ

นาย ปฐม ไสมวงศ์

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาเภสัชศาสตรมหาบัณฑิต

สาขาวิชาเภสัชเคมี ภาควิชาเภสัชเคมี

คณะเภสัชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ปีการศึกษา 2549

ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ISOLATION, PURIFICATION AND QUANTITATIVE DETERMINATION OF
ASIATICOSIDE, MADECASSOSIDE, ASIATIC ACID AND MADECASSIC ACID IN
VARIETIES OF CENTELLA ASIATICA (L.) URB.

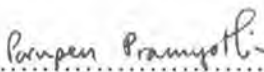
Mr. Pathom Somwong

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements
for the Degree of Master of Science in Pharmacy Program in Pharmaceutical Chemistry
Department of Pharmaceutical Chemistry
Faculty of Pharmaceutical Sciences
Chulalongkorn University
Academic Year 2006
Copyright of Chulalongkorn University

492121

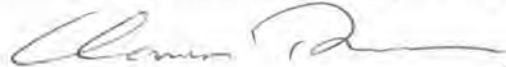
Thesis Title	ISOLATION, PURIFICATION AND QUANTITATIVE DETERMINATION OF ASIATICOSIDE, MADECASSOSIDE, ASIATIC ACID AND MADECASSIC ACID IN VARIETIES OF CENTELLA ASIATICA (L.) URB.
By	Mr. Pathom Somwong
Field of study	Pharmaceutical Chemistry
Thesis Advisor	Assistant Professor Chamnan Patarapanich, Ph. D.
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

.....Dean of the Faculty of Pharmaceutical Sciences
(Associate Professor Pornpen Pramyothin, Ph. D.)


THESIS COMMITTEE

.....Chairman
(Associate Professor Darawan Tanyavutti)

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

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

.....Member
(Assistant Professor Pornchai Rojsitthisak, Ph. D.)

.....Member
(Piya Chalermglin, Ph. D.)

Acknowledgements

I wish to express my sincerely indebted to my thesis advisor, Assistant Professor Dr. Chamnan Patarapanich, and my thesis co-advisor, Associate Professor Suwanna Laungchonlatan, for their support, valuable advice, continual guidance, kindness, and understanding throughout my graduate study period.

I am sincerely grateful to Assistant Professor Dr. Mitr Pathipvanich, Head of the Department of Pharmaceutical Chemistry for his valuable advice, kindness during my graduate study and I also would like to thank the staffs of the Department of Pharmaceutical Chemistry for their facilities and helpfulness.

I also would like to thank Associate Professor Darawan Tanyavutti, Assistant Professor Dr. Pornchai Rojsitthisak and Dr. Piya Chalermnglin for their kind suggestion and discussion to complete this thesis.

My great appreciation is extended to Miss Jirapan Sritongkul and Mr. Niyom Chaeukerd for their kindness cooperation and supplying *Centella asiatica* (L.) Urb. samples from Thailand Institute of Scientific and Technological Research and Nakhon Si Thammarat province throughout my study.

I also thank to all of my friends for their kind assistance, helpfulness and friendship throughout this study.

With deepest love and appreciation, I would like to thank my parent and my sister for their understanding, encouragement and constantly support during my study.

ปฐุม โสมวงศ์ : การแยก การทำให้บริสุทธิ์ และการวิเคราะห์หาปริมาณของเอเชียติโคไซด์
มาตีคัสโซไซด์ กรดเอเชียติก และกรดมาตีคัสซิกในบัวบกสายพันธุ์ต่างๆ

(ISOLATION, PURIFICATION AND QUANTITATIVE
DETERMINATION OF ASIATICOSIDE, MADECASSOSIDE, ASIATIC
ACID AND MADECASSIC ACID IN VARIETIES OF CENTELLA

ASIATICA (L.) URB.) อ. ที่ปรึกษา : ผศ. ดร. ชำนาญ ภัทรพานิช, อ. ที่ปรึกษา

ร่วม : รศ. สุวรรณมา เหลืองชลธาร, 130 หน้า.

การศึกษานี้ได้พัฒนาวิธีการแยกสารเอเชียติโคไซด์ และมาตีคัสโซไซด์จากสารสกัดบัวบกด้วย
วิธีการตกผลึกแยกส่วน ซึ่งหลังจากทำให้บริสุทธิ์ได้สารสำคัญทั้งสองในปริมาณร้อยละของการกลับคืน
เท่ากับ 78 และ 67 โดยลำดับ จากนั้นทำปฏิกิริยาอัลคาไลไนโอไดรไลซิสสารสำคัญทั้งสองเพื่อเตรียม
สารสำคัญอีกสองชนิดคือกรดเอเชียติก และกรดมาตีคัสซิก ซึ่งหลังจากทำให้บริสุทธิ์ได้สารทั้งสองใน
ปริมาณร้อยละของการกลับคืนเท่ากับ 89.6 และ 63.1 โดยลำดับ และได้พิสูจน์เอกลักษณ์สารสำคัญที่
ได้ด้วยวิธีสเปกโตรสโกปีเปรียบเทียบกับสารมาตรฐาน

ศึกษาวิธีสกัดสารสำคัญเอเชียติโคไซด์ มาตีคัสโซไซด์ กรดเอเชียติก และกรดมาตีคัสซิกจากผง
พืชบัวบกโดยเปรียบเทียบวิธีสกัดแบบรีฟลักซ์ วิธีสกัดด้วยคลื่นอัลตราโซนิก และวิธีสกัดด้วยคลื่น
ไมโครเวฟ ซึ่งพบว่าวิธีสกัดด้วยคลื่นอัลตราโซนิกและคลื่นไมโครเวฟสามารถลดระยะเวลาในการสกัด
และเป็นวิธีที่มีประสิทธิภาพ

การวิเคราะห์หาปริมาณสารสำคัญทั้ง 4 ชนิดจากตัวอย่างผงพืชบัวบกที่เก็บจากหลายแหล่งใน
ประเทศไทยด้วยวิธีไฮเพอร์ฟอร์แมนซิลิคิวดีโครมาโตกราฟี ไซโคลลัมน์ซี -18 เป็นวัฏภาคหนึ่งและส่วนผสม
ของอะเซโตไนไตรล์ต่อฟอสเฟลลัฟเฟอร์ (10 มิลลิโมล พีเอช 7.1) ในอัตราส่วน 29:71 เป็นวัฏภาค
เคลื่อนที่และตรวจวัดด้วยไฟโตไดโอดอะเรย์ที่มีความยาวคลื่น 210 นาโนเมตร พบปริมาณเอเชียติโคไซด์
สูงสุด 3.47 เปอร์เซ็นต์ (ระยอง) มาตีคัสโซไซด์สูงสุด 5.48 เปอร์เซ็นต์ (พิษณุโลก) กรดเอเชียติกสูงสุด
0.39 เปอร์เซ็นต์ (ตราด) และกรดมาตีคัสซิกสูงสุด 0.91 เปอร์เซ็นต์ (เชียงใหม่) นอกจากนี้ได้ศึกษาหา
ปริมาณสารสำคัญในรอบปีจากบัวบกที่เก็บจากจังหวัดนครปฐม อุบลราชธานี และนครศรีธรรมราช จาก
การศึกษาพบว่าบัวบกจากจังหวัดนครปฐม และนครศรีธรรมราชที่เก็บในช่วงเดือนพฤษภาคมมีปริมาณ
สารกลัยโคไซด์สูงสุด ส่วนบัวบกจากจังหวัดอุบลราชธานีพบว่าให้ปริมาณสารสูงสุดในช่วงเดือนมีนาคม
จากข้อมูลที่ได้ในการศึกษานี้สามารถนำไปใช้ในการคัดเลือกสายพันธุ์บัวบก และวางแผนการ
เพาะปลูกเพื่อให้ได้ซึ่งปริมาณสารสำคัญไตรเทอร์ปีนสูงสุด

ภาควิชา...เภสัชเคมี..... ลายมือชื่อนิติ.....

สาขาวิชา...เภสัชเคมี..... ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา.....

ปีการศึกษา...2549..... ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม.....

ปฐุม โสมวงศ์
อ. ชำนาญ ภัทรพานิช
รศ. สุวรรณมา เหลืองชลธาร

477 65759 33 : MAJOR PHARMACEUTICAL CHEMISTRY
 KEY WORD : CENTELLA ASIATICA/ ISOLATION/ ASIATICOSIDE/
 MADECASSOSIDE/ ASIATIC ACID/ MADECASSIC ACID

PATHOM SOMWONG: ISOLATION, PURIFICATION AND QUANTITATIVE
 DETERMINATION OF ASIATICOSIDE, MADECASSOSIDE, ASIATIC ACID
 AND MADECASSIC ACID IN VARIETIES OF CENTELLA ASIATICA (L.)
 URB. THESIS ADVISOR : ASST. PROF. CHAMNAN PATARAPANICH,
 Ph.D., THESIS COADVISOR : ASSOC. PROF. SUWANNA
 LAUNGCHONLATAN, 130 pp.

The fractional crystallization method was developed to isolate and purify asiaticoside (AS) and madecassoside (MS) from the extract of *Centella asiatica* (CA); The maximum percentage recoveries of AS and MS were 78 and 67, respectively. AS and MS were subjected to alkali hydrolysis to yield asiatic acid (AA) and madecassic acid (MA) with percentage recoveries 89.6 and 63.1, respectively. The pure isolated substances were identified by the spectroscopic method compared to reference substances.

A comparative study of three extraction methods: refluxing, ultrasonic-assisted extraction (UAE) and microwave-assisted extraction (MAE) has been investigated in order to determine the time to achieve maximum content of asiaticoside, madecassoside, asiatic acid and madecassic acid in CA. Both UAE and MAE were found significantly decreased in total extraction time and were more effective for extraction of the triterpenes from CA than the conventional refluxing method.

The amount of triterpenes in CA collected from various locations of Thailand were evaluated by the HPLC using Alltech column (Alltima C18, 4.6x150mm, 5 μ m) as stationary phase, a mixture of acetonitrile: 10 mM phosphate buffer pH 7.1 (29:71) as mobile phase, a photodiode array at wavelength 210 nm as detector. All accessions of CA exhibited chemical variations in percentage content of triterpenes. The maximum contents were obtained as followed: asiaticoside 3.47%, w/w (Rayong province), madecassoside 5.48%, w/w (Phitsanulok province), asiatic acid 0.39%, w/w (Trat province) and madecassic acid 0.91%, w/w (Chiang Mai province). Furthermore, the content of these compounds was also annually determined in CA that collected from the commercial crops of Nakhon Pathom, Ubon Ratchathani and Nakhon Si Thammarat province. The maximum glycosides of CA in Nakhon Pathom and Nakhon Si Thammarat province were also observed in CA that collected on May and the maximum glycosides of CA in Ubon Ratchathani province were observed in CA that collected on March. Information obtained may be utilized as criteria for plant varieties selection and breeding programs for commercial cultivars of optimal triterpenes content for further isolation of pure triterpenes.

Department: Pharmaceutical chemistry Student's signature.....
 Field of study: Pharmaceutical chemistry Advisor's signature.....
 Academic year 2006..... Co-advisor's signature.....

CONTENTS

	Page
ABSTRACT (Thai).....	iv
ABSTRACT (English).....	v
ACKNOWLEDGEMENTS.....	vi
CONTENTS.....	vii
LIST OF SCHEMES.....	ix
LIST OF TABLES.....	x
LIST OF FIGURES.....	xii
LIST OF ABBREVIATIONS.....	xv
CHAPTER	
I INTRODUCTION.....	1
II LITERATURE REVIEW.....	5
• Botanical description.....	5
• Chemical constituents.....	6
• Medicinal uses	8
• Experiment and clinical pharmacology.....	9
• Overview of the techniques of isolation of analytes from plant material..	11
• Overview of the determination of active constituents in CA.....	24
III MATERIALS AND METHODS.....	27
• Materials.....	27
• Extraction and isolation of triterpene glycoside.....	29
• Preparation of MS, AS, MA and AA as standard.....	29
• Development of sample preparation for the HPLC quantitative determination of MS, AS, MA and AA in CA.....	37
• Quantitative determination of MS, AS, MA, AA in CA by the HPLC method.....	42
IV RESULTS AND DISCUSSIONS.....	49
• Extraction and isolation of triterpene glycoside.....	49
• Preparation of MS, AS, MA and AA.....	49

• Development of extraction methods.....	58
• Determination of MS, AS, MA and AA contents in various CA samples.....	62
V CONCLUSION.....	68
REFERENCES.....	73
APPENDICES.....	80
VITAE.....	130

LIST OF SCHEMES

Scheme		Page
3.1	Extraction and isolation scheme for triterpenoid glycosides from CA.....	30
3.2	Isolation of AS and MS from triterpenoid glycosides	31
3.3	Diagram of alkali hydrolysis of glycosides.....	32

LIST OF TABLES

Table	Page
2.1	Substances isolated using ultrasonic-assisted extraction.....15
2.2	Physical constants of some solvents commonly used in MAE.....18
2.3	MAE applications of organic compounds reported in literature.....20
3.1	Preparation of acid standard solutions for sample analysis.....45
3.2	Preparation of stock standard mixture solutions for sample analysis.....45
3.3	Concentration of working standard solutions.....46
3.4	Various CA samples cultivated by Thailand Institute of Scientific and Technological Research.....81
3.5	Various CA samples collected from the commercial crops of Nakhon Pathom, Ubon Ratchathani and Nakhon Si Thammarat province.....81
4.1	Accelerated stability of MS, AS, MA and AA in solid form at 45°C, 75% RH82
4.2	Stability of MS and AS in sample solution.....82
4.3	Percentage contents of extraction of CA by reflux at various times.....83
4.4	The effect of ultrasonic extraction power on percentage contents of MS, AS, MA and AA.....84
4.5	The stability of MS and AS during UAE.....86

Table	Page
4.6 The effect of microwave extraction time on percentage contents of MS, AS, MA and AA	86
4.7 The stability of MS and AS during MAE	87
4.8 Contents of MS, AS, MA and AA in whole plant of various CA from Thailand Institute of Scientific and Technological Research.....	87
4.9 Contents of MS, AS, MA and AA in whole plant of CA from the commercial crop of Nakhon Pathom province in annual period.....	88
4.10 Contents of MS, AS, MA and AA in whole plant of CA from the commercial crop of Ubon Ratchathani province in annual period.....	89
4.11 Contents of MS, AS, MA and AA in whole plant of CA from the commercial crop of Nakhon Si Thammarat province in annual period.....	90
4.12 Contents of MS, AS, MA and AA in whole plant of CA from Ubon Ratchathani, Nakhon Si Thammarat and Rayong province collected during the cultivation.....	91

LIST OF FIGURES

Figure	Page
2.1	Picture of <i>Centella asiatica</i> (L.) Urb.....5
2.2	The structure of major triterpenes from <i>Centella asiatica</i> (L.) Urb.....6
2.3	Experiment setup for UAE using an ultrasonic bath.....16
2.4	Experiment setup for FMAE22
3.1	Picture of CA planted at Thailand Institute of Scientific and Technological Research and Nakhon Pathom province.....43
3.2	Picture of various CA samples at Thailand Institute of Scientific and Technological Research44
3.3	Picture of CA sample at Ubon Ratchathani province.....44
3.4	Picture of CA sample at Nakhon Si Thammarat province44
4.1	Spots on TLC-plate of madecassoside (MS), asiaticoside (AS), madecassic acid (MA) and asiatic acid (AA).....92
4.2	HPLC chromatogram of madecassoside and asiaticoside in standard solution and CA extract.....92
4.3	HPLC chromatogram of pure madecassoside, asiaticoside, madecassic acid and asiatic acid.....93
4.4	HPLC chromatogram of standard solution and CA extract sample95
4.5	UV spectrums of pure MS, AS, MA and AA.....96
4.6	IR spectrum of pure madecassoside99
4.7	IR spectrum of pure asiaticoside100
4.8	IR spectrum of pure madecassic acid.....101

Figure	Page
4.9	IR spectrum of pure asiatic acid.....102
4.10	¹ H-NMR of pure madecassoside.....103
4.11	¹ H-NMR of pure asiaticoside.....104
4.12	¹ H-NMR of pure madecassic acid.....105
4.13	¹ H-NMR of pure asiatic acid.....106
4.14	¹³ C-NMR of pure madecassoside.....107
4.15	¹³ C-NMR of pure asiaticoside.....108
4.16	¹³ C-NMR of pure madecassic acid.....109
4.17	¹³ C-NMR of pure asiatic acid.....110
4.18	Percentage contents of extraction of CA by reflux at various times.....111
4.19	The effect of ultrasonic extraction power on percentage contents of MS, AS, MA and AA.....114
4.20	The effect of microwave extraction time on percentage contents of MS, AS, MA and AA.....116
4.21	3D-HPLC chromatogram of MS and AS standard during UAE by using the photodiode array detector.....119
4.22	3D-HPLC chromatogram of MS and AS standard during MAE by using the photodiode array detector.....119
4.23	Contents of MS, AS, MA and AA in whole plant of various CA from Thailand Institute of Scientific and Technological Research.....120

Figure	Page
4.24	Comparison of percent contents of MS, AS, MA and AA in CA sample collected during the year 2003 and 2006 from Nakhon Pathom province123
4.25	Contents of MS, AS, MA and AA in whole plant of CA from the commercial crop of Ubon Ratchathani province in annual period124
4.26	Contents of MS, AS, MA and AA in whole plant of CA from the commercial crop of Nakhon Si Thammarat province in annual period124
4.27	Annually content profiles of MS in whole plant of CA from the commercial crop of Nakhon Pathom, Ubon Ratchathani and Nakhon Si Thammarat province.....125
4.28	Annually content profiles of AS in whole plant of CA from the commercial crop of Nakhon Pathom, Ubon Ratchathani and Nakhon Si Thammarat province.....126
4.29	Annually content profiles of MA in whole plant of CA from the commercial crop of Nakhon Pathom, Ubon Ratchathani and Nakhon Si Thammarat province.....127
4.30	Annually content profiles of AA in whole plant of CA from the commercial crop of Nakhon Pathom, Ubon Ratchathani and Nakhon Si Thammarat province.....128
4.31	Contents of MS, AS, MA and AA in whole plant of CA from Ubon Ratchathani, Nakhon Si Thammarat and Rayong province collected during the cultivation.....129

LIST OF ABBREVIATIONS

AA	Asiatic acid
AR	Analytical reagent
AS	Asiaticoside
°C	Degree Celsius
CA	<i>Centella asiatica</i> (L.) Urb.
cm	Centimeter
FMAE	Focused microwave-assisted extraction
g	Gram
HPLC	High Performance Liquid Chromatography
IR	Infrared
l	Liter
MA	Madecassic acid
MAE	Microwave-assisted extraction
mg	Milligram
ml	Milliliter
mm	Millimeter
mM	Millimolar
min	Minute
mp	Melting point
MS	Madecassoside
MW	Molecular weight
NMR	Nuclear Magnetic Resonance

nm	Nanometer
NO.	Number
PL	Prednisolone
RH	Relative humidity
S	Standard
SD	Standard deviation
sec	second
SPE	Soild-phase extraction
%R	Percent recovery
TLC	Thin Layer Chromatography
t_R	Retention time
UAE	Ultrasonic-assisted extraction
UV	Ultraviolet
WS	Working standard
μg	Microgram
μl	Microliter
μm	Micrometer
δ	Chemical shift
ϵ	Dielectric constant