การคัดแยกสัณฐานทางของแข็งของสารเอเชียติโคซายด์

สำนักงานวิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

นางสาว สุภาวดี สุรางค์กูล

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร ปริญญาเภสัชศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาเภสัชอุตสาหกรรม ภาควิชาเภสัชอุตสาหกรรม
คณะเภสัชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
ปีการศึกษา 2548

ISBN 974-53-2077-3

ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

SOLID STATE MORPHOLOGY SCREENING OF ASIATICOSIDE

Miss Supawadee Surangkul

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements
for the Degree of Master of Science in Pharmacy Program in Industrial Pharmacy
Department of Manufacturing Pharmacy
Faculty of Pharmaceutical Sciences
Chulalongkorn University
Academic Year 2005
ISBN 974-53-2077-3

481679

Thesis Title	SOLID STATE MORPHOLOGY SCREENING OF ASIATICOSIDE
By	Miss Supawadee Surangkul
Field of study	Industrial Pharmacy
Thesis Advisor	Narueporn Sutanthavibul, Ph.D.

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

.....Dean of the Faculty of Pharmaceutical Sciences

(Associate Professor Pornpen Pramyothin, Ph.D.)

THESIS COMMITTEE

.....Chairman

(Associate Professor Poj Kulvanich, Ph.D.)

..... Thesis Advisor

(Narueporn Sutanthavibul, Ph.D.)

..... Member

(Professor Garnpimol C. Ritthidej, Ph.D.)

..... Member

(Assistant Professor Wichein Thanindratarn, M.Sc.in Pharm.)

.....Member

(Associate Professor Ekarin Saifah, Ph.D.)

สุภาวดี สุรางค์กุล : การคัดแยกสัณฐานทางของแข็งของสารเอเชียติโคซายด์ (SOLID STATE MORPHOLOGY SCREENING OF ASIATICOSIDE) อ. ที่ปรึกษา : อ.ดร. นฤพร สุตัณฑวิบูลย์, 109 หน้า, ISBN 974-53-2077-3

การศึกษาคุณสมบัติทางของแข็งของสารเอเชียติโคซายด์ซึ่งเป็นสารประกอบหลักในสารสกัดจากบัวบก ประกอบไปด้วยการศึกษารูปแบบของสารเอเชียติโคซายด์ในสภาวะของแข็งความคงตัวของสารในสภาวะของแข็งความสามารถในการละลาย และ ความเข้ากันไม่ได้ของสารเอเชียติโคซายด์กับสารช่วยทางเภสัชกรรม

การศึกษารูปแบบของสารเอเชียติโคซายด์ในสภาวะของแข็ง ทำโดยการตกผลึกสารเอเชียติโคซายด์โดยใช้ตัวทำละลายหลายชนิด พบว่าผลึกที่ได้มีลักษณะเป็นผลึกรูปเข็มซึ่งมีขนาดแตกต่างกันออกไป การศึกษาคุณลักษณะทางของแข็งของผลึกเอเชียติโคซายด์โดยใช้ เอกซ์เรย์ พาวเดอร์ ดิฟแฟกชั่น สามารถแยกผลึกเอเชียติโคซายด์ออกได้ 2 รูปแบบ รูปแบบที่ I คือ สารเอเชียติโคซายด์เริ่มต้นและผลึกของเอเชียติโคซายด์ที่ผ่านการตกผลึกจากเมธิล แอลกอฮอร์ จากนั้นให้ความร้อนที่ 105 อาศาเซลเซียสเป็นเวลา 3 ชั่วโมง ซึ่งจะเรียกต่อว่า เอเชียติโคซายด์ I และกลุ่มที่ 2 ได้แก่ ผลึกของเอเชียติโคซายด์ที่ผ่านการตกผลึกจากตัวทำละลายทุกชนิด ซึ่งจะเรียกต่อว่า เอเชียติโคซายด์ II เมื่อนำผลึกทั้ง 2 กลุ่มมาศึกษาโดยใช้เทอร์โมกราวิเมติก พบว่ามีรูปแบบของการเปลี่ยนแปลงเหมือนกัน โดยมีจุดหลอมเหลวที่ประมาณ 230 องศาเซลเซียส แต่ในทางตรงข้ามเมื่อนำผลึกทั้ง 2 กลุ่มโดยวิธี ดิฟเฟอเรนเทียล สแกนนิ่ง คาลอริมิตี้ พบความแตกต่างเล็กน้อยของเอนโดเทอมิค พีค ที่อุณหภูมิ 40-70 องศาเซลเซียส ซึ่งอาจเกิดจาก เอเชียติโคซายด์ II อาจมีการจัดเรียงโครงสร้างภายในผลึกและเปลี่ยนเป็น เอเชียติโคซายด์ I ความสามารถการละลายของสารเอเชียติโคซายด์รูปแบบที่ II มีค่าสูงกว่า รูปแบบที่ I ในระยะแรก แต่จะลดลงจนคงที่และเท่ากับสารเอเชียติโคซายด์รูปแบบที่ I เนื่องจากการเปลี่ยนแปลงรูปแบบของสารสารเอเชียติโคซายด์รูปแบบที่ IIมาเป็น รูปแบบที่ I ซึ่งมีความคงตัวมากกว่า

ความคงตัวทางด้านของแข็งของเอเชียติโคซายด์ที่อุณหภูมิและความชื้นสัมพัทธ์ต่างๆกัน การเปลี่ยนแปลงทางด้านของแข็งจากเอเชียติโคซายด์ II ไปเป็นเอเชียติโคซายด์ I เกิดขึ้นเมื่อมีการเพิ่มของอุณหภูมิหรือความชื้นสัมพัทธ์ลดลง ในขณะที่เอเชียติโคซายด์ I ไม่มีการเปลี่ยนแปลง ผลของอุณหภูมิต่อความคงตัวทางเคมีของเอเชียติโคซายด์ I และ เอเชียติโคซายด์ II มีความสัมพันธ์อย่างมากกับอุณหภูมิที่เพิ่มขึ้น อย่างไรก็ตาม เป็นไปได้ว่ากลไกการสลายตัวอาจซับซ้อนจึงไม่สามารถอธิบายด้วยสมการทางจลน์พลศาสตร์ขั้นพื้นฐานได้ เมื่อมีการเปลี่ยนแปลงความชื้นไม่มีผลต่อการสลายตัวของเอเชียติโคซายด์ II ความคงตัวต่อความชื้นของเอเชียติโคซายด์ I พบว่ามีความคงตัวน้อยที่สุดที่ความชื้นสัมพัทธ์ 62 % ยิ่งไปกว่านั้นผลการศึกษาความเข้ากันไม่ได้พบว่าเอเชียติโคซายด์ II เสื่อมสลายมากกว่าเอเชียติโคซายด์ I เมื่อ ผสมกับ ทัลคัม แมกนีเซียม สเตียเรท และ ซิลิคอน ไดออกไซด์ ในอัตราส่วน 1 ต่อ 1 อย่างไรก็ตาม การเสื่อมสลายของเอเชียติโคซายด์ เมื่อผสมกับ สเปรย์ ดราย แลคโทส พรีเจลลาติไนซ์ สต๊าซ และ ไดเบสิค แคลเซียม ฟอสเฟส ในอัตราส่วน 1 ต่อ 20 ยากต่อการตรวจสอบเนื่องจากปัญหาของการผสมและการสุ่มตัวอย่าง

ภาควิชา.....เภสัชอุตสาหกรรม..... ลายมือชื่อนิสิต .....

สาขาวิชา .....เภสัชอุตสาหกรรม..... ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา .....

ปีการศึกษา ...2548.....

4576622533 : MAJOR MANUFACTURING PHARMACY
KEY WORD: ASIATICOSIDE/SOLID STATE/STABILITY/
TRANSFORMATION/ POLYMORPH

SUPAWADEE SURANGKUL : SOLID STATE MORPHOLOGY SCREENING OF ASIATICOSIDE. THESIS ADVISOR : NARUEPORN SUTANTHAVIBUL, Ph.D., 109 pp. ISBN 974-53-2077-3

Solid state characterization of asiaticoside, major component in *Centella asiatica* extracts, was investigated. The solid state characterization includes solid phase characterization, solid state stability, solubility and incompatability with excipients.

Solid phase screening was done by recrystallization of asiaticoside in various solvents. The morphology of crystals produced were needle-like (acicular) but different in their respective sizes. Solid state characterization of asiaticoside crystals by X-ray powder diffractometry (XRPD) found 2 polymorphs of asiaticoside. The first polymorph found in raw material asiaticoside and recrystallized product from methyl alcohol after underwent heating at 105°C for 3 hours and were designated as asiaticoside I. Recrystallized products from other solvents utilized are the second polymorph and was called asiaticoside II. Thermogravimetric analyses (TGA) of the 2 polymorphic forms were similar. The melting points were found to be approximately at 230°C. On the other hand, the minor difference in endothermic peaks seen in diffrential scanning calorimetry (DSC) at 40 - 70°C implied that asiaticoside II may rearranged their internal structure and recrystallized to asiaticoside I. Solubility of asiaticoside II was higher than asiaticoside I in the early stage but eventually decreased until stable and equal to the saturated concentration of asiaticoside I. This was due to the transformation of asiaticoside II to the-more-stable asiaticoside I during the solubility study.

Solid state stability of asiaticoside was investigated using various temperatures and relative humidities. Solid state transformation of asiaticoside II to asiaticoside I was observed when the temperature increased or the relative humidity decreased while asiaticoside I did not changed. The effect of temperature on chemical stability of asiaticoside I and asiaticoside II found to correlate well with increasing temperature. However, it was not possible to postulate the mechanism due to complex behavior which did not obey any simple kinetic equations tested. Various relative humidities also did not show any correlation with the decomposition of asiaticoside II. Humidity stability of asiaticoside I was proven to be the least stable at 62%RH. Moreover, incompatibility studies with selected excipients found that asiaticoside II degraded to a greater extent than asiaticoside I when mixed with talcum, magnesium stearate and silicon dioxide in the ratio of 1:1. However, degradation of the mixture of asiaticoside with spray dried lactose, pregelatinized starch and dibasic calcium phosphate in the ratio of 1:20 were very difficult to detect due to mixing homogeneity and sampling problems.

Department Manufacturing Pharmacy Student's signature .....

Field of study Industrial Pharmacy Advisor's signature .....

Academic year 2005

ACKNOWLEDGEMENT

I would like to express my sincere gratitute to my thesis advisor, Narueporn Sutanthavibul, Ph.D. for her valuable advice, guidance, kindness and encouragement through my graduate study.

I would like to thank the Department of Manufacturing Pharmacy , Department of Pharmaceutical Botany, The Petroleum and Petrochemical Collage, Chulalongkorn University for supporting the research facilities. Special thanks for Mr. Sorapong On-ngurn for his helpfulness.

I wish to express appreciation to Associate Professor Poj kulvanich, Ph.D., Professor Karnpimol C. Ritthidej, Ph.D., Assistant Professor Wichein Thanindratarn, M.Sc. in Pharm., Associate Professor Ekarin Saifah, Ph.D. to as members of the thesis committee for their valuable suggestion and comments.

I am thankful to my friends for their friendship and humour and other people whose names have not been mentioned for their great help and support.

I wish to express appreciation for fully financial support of the research grant from the Nation Research Council of Thailand (NRCT).

Furthermore, special thanks are given to the Department of Medical Sciences, Ministry of Public Health for their permission study.

Finally, I would like to express my tremendous gratitude to my mother. Her endless love and encouragement given to me are immeasurable and contributed me to finish this work.

TABLE OF CONTENTS

PAGE

Thai abstract.....iv

English abstract.....v

Acknowledgements vi

List of table.....vii

List of figure.....viii

Abbreviations xiii

Chapter

I Introduction..... 1

II Literature review 3

1. *Centella asiatica* (Linn.)Urban.....3

2. Asiaticoside.....6

3. Pharmaceutical Preformulation 7

4. Classification of solids 8

5. Generation of polymorphs,hydrate,solvates and amorphous solids.....15

6. Method for the characterization of Polymorphs, Hydrate, Solvate and Amorphous solids 16

III Experiment.....23

1. Materials 23

2. Method 26

IV Result and Discussion..... 32

1. Recrystallized of asiaticoside in various solvents 32

2. Identification of asiaticoside 32

3. Solid state characterization of asiaticoside 38

4. Physicochemical studies.....48

V Conclusion..... 72

References.....74

Appendices..... .81

Appendix A 82

Appendix B 84

Appendix C 87

PAGES

Appendix D 89
Appendix E 101
Appendix F 102
Appendix G 103
Vita 109

LIST OF TABLES

Table		Page
1	Main constituents of *Centella asiatica*	5
2	Classification of crystal habits	10
3	Solvents often used in the preparation of polymorphs	16
4	The water content in asiaticoside I and asiaticoside II	46
5	Kinetic equations used in stability studies	54
6	The rate constants and the correlation of determination of asiaticoside I and II from stability studies.	58
7	The R_f values of asiaticoside , madecassic acid , asiatic acid, recrystallized asiaticoside from various solvents	83
8	Concentration and Peak Area data for calibration curve of asiaticoside	84
9	Solubility data of Asiaticoside I in water 37 ± 2 °C	85
10	Solubility data of asiaticoside II in water 37 ± 2 °C	86
11	Concentration and Peak area data for calibration curve of asiaticoside	87
12	Peak area of asiaticoside standard solution concentration 1.0 mg/ml	88
11	Titer of Karl Fischer reagent	101

LIST OF FIGURES

Figure		Page
1	Strcture of Asiaticoside	1
2	Area of distribution of *Centella asiatica*	3
3	*Centella asiatica* (Linn.) urban	4
4	Structure formular of asiaticoside	6
5	Outline differentiating habit and crystal chemistry of a chemical compound	9
6	Morphology of anhedral (A) and euhedral (B)	10
7	Different habits of crystals	11
8	Two forms of silica	12
9	PXRD pattern of sample obtained from grainding for different time interval	18
10	FTIR pattern of raw material asiaticoside (asiaticoside I)	34
11	FTIR pattern of recrystallized asiaticoside from methyl alcohol (asiaticoside II)	34
12	^{13}C NMR spectrum of Asiaticoside I	36
13	^{13}C NMR spectrum of Asiaticoside II	37
14	Morphology of raw material asiaticoside (x 650)	39
15	Morphology of recrystallized product from Methyl alcohol (x 650)	39
16	Morphology of recrystallized product from Ethyl alcohol (x 650)	39
17	Morphology of recrystallized product from n-propyl alcohol (x 650)	39
18	Morphology of recrystallized product from Isopropyl alcohol (x 650)	39
19	Morphology of recrystallized product from 1-buthyl alcohol (x 650)	39
20	Morphology of recrystallized product from 2-buthyl alcohol (x 650)	40
21	Morphology of recrystallized product from Acetone (x 650)	40
22	Morphology of recrystallized product from methyl alcohol and acetonitrile (x 650)	40
23	Morphology of recrystallized product from methyl alcohol and water (x 650)	40
24	XPRD pattern of asiaticoside raw material and its recrystallized products from various solvents	42

Figure **Page**

25 XPRD pattern of asiaticoside raw material and its recrystallized products from 2 solvent-systems 42
26 XPRD patterns of asiaticoside before and after heat treatment at 105°C for 3 hours 43
27 TGA thermogram of asiaticoside at the scanning rate of 5°C/min, from 25-300°C 44
28 DSC thermograms of asiaticoside at the scanning rate of 5°C/min, from 25-300°C 45
29 GC chromatogram of standard methanol and volatile substance from asiaticoside..... 47
30 Solubility Profile of asiaticoside in 37 ± 2 °C 49
31 XRPD pattern of asiaticoside I after stored in 40 °C and 62 %RH 50
32 XRPD pattern of asiaticoside I after stored in 50 °C and 59 %RH 51
33 XRPD pattern of asiaticoside I after stored in 60 °C and 59 %RH 51
34 XRPD pattern of asiaticoside II after stored in 40 °C and 62 % RH 52
35 XRPD pattern of asiaticoside II after stored in 50 °C and 59 %RH 52
36 XRPD pattern of asiaticoside II after stored in 60 °C and 59 %RH 53
37 XRPD pattern of asiaticoside I after stored in 42%RH and 40°C 54
38 XRPD pattern of asiaticoside I after stored in 75%RH and 40°C 54
39 XRPD pattern of asiaticoside II after stored in 42%RH and 40°C 55
40 XRPD pattern of asiaticoside II after stored in 75%RH and 40°C 55
41 Zero order kinetic of asiaticoside I at various temperatures at 55 – 65 %RH.....59
42 Zero order kinetic of asiaticoside II at various temperatures at 55 – 65%RH..... 59
43 One dimentional Growth of a Phase Boundary graph of asiaticoside I at various relative humidities at 40°C 60
44 One dimentional Growth of a Phase Boundary graph of asiaticoside II at various relative humidities at 40°C 60
45 The XRPD patterns of mixture of asiaticoside I with spray-dried lactose 62
46 The XRPD patterns of mixture of asiaticoside I with pregellatinized starch...62

Figure **Page**

47 The XRPD patterns of mixture of asiaticoside I with dibasic calcium phosphate 63
48 The XRPD patterns of mixture of asiaticoside I with talcum 63
49 The XRPD patterns of mixture of asiaticoside I with magnesium stearate...64
50 The XRPD patterns of mixture of asiaticoside I with silicon dioxide 64
51 The XRPD patterns of mixture of asiaticoside II with spray-dried lactose .. 65
52 The XRPD patterns of mixture of asiaticoside II with pregelatinized starch.....65
53 The XRPD patterns of mixture of asiaticoside II with dibasic calcium phosphate 66
54 The XRPD patterns of mixture of asiaticoside II with talcum 66
55 The XRPD patterns of mixture of asiaticoside II with magnesium stearate.67
56 The XRPD patterns of mixture of asiaticoside II with silicon dioxide..... 67
57 Incompatibility studies of mixture asiaticoside and spray dried lactose..... 68
58 Incompatibility studies of mixture asiaticoside and pregelatinized starch.....69
59 Incompatibility studies of mixture asiaticoside and dibasic calcium phosphate.....69
60 Incompatibility studies of mixture asiaticoside and talcum 70
61 Incompatibility studies of mixture asiaticoside and magnesium stearate 70
62 Incompatibility studies of mixture asiaticoside and silicon dioxide ..... .71
63 TLC plate for identification asiaticoside 82
64 Calibration curve of asiaticoside from HPLC analysis 84
65 Linearlity curve of asiaticoside 87
66 XRPD pattern of asiaticoside I after stored in 40° C and 62%RH at 18 weeks.....89
67 XRPD pattern of asiaticoside I after stored in 50° C, 55-65%RH at 18 weeks 90
68 XRPD pattern of asiaticoside I after stored in 60° C, 55-65%RH at 18 weeks 90
69 XRPD pattern of asiaticoside I after stored in 42%RH , 40°C at 18 weeks... 91
70 XRPD pattern of asiaticoside I after stored in 75%RH, 40°C at 18 weeks..... 91

Figure **Page**

71 XRPD pattern of asiaticoside II after stored in 40° C and 62%RH at 18 weeks 92

72 XRPD pattern of asiaticoside II after stored in 50° C , 55-65%RH at 18 weeks 92

73 XRPD pattern of asiaticoside II after stored in 60° C, 55-65%RH at 18 weeks 93

74 XRPD pattern of asiaticoside II after stored in 42%RH, 40°C at 18 weeks....93

75 XRPD pattern of asiaticoside II after stored in75%RH, 40°C at 18 weeks....94

76 XRPD pattern of mixture of asiaticoside I and lactose after stored in 40° C and 75%RH at 18 weeks 94

77 XRPD pattern of mixture of asiaticoside I and pregelatinized starch after stored in 40° C and 75%RH at 18 weeks 95

78 XRPD pattern of mixture of asiaticoside I and dibasic calcium phosphate after stored in 40° C and 75%RH at 18 weeks 95

79 XRPD pattern of mixture of asiaticoside I and talcum after stored in 40° C and 75%RH at 18 weeks 96

80 XRPD pattern of mixture of asiaticoside I and magnesium stearate after stored in 40° C and 75%RH at 18 weeks 96

81 XRPD pattern of mixture of asiaticoside I and silicon dioxide after stored in 40° C and 75%RH at 18 weeks 97

82 XRPD pattern of mixture of asiaticoside II and lactose after stored in 40° C and 75%RH at 18 weeks 97

83 XRPD pattern of mixture of asiaticoside II and pregelatinized starch after stored in 40° C and 75%RH at 18 weeks 98

84 XRPD pattern of mixture of asiaticoside II and dibasic calcium phosphate after stored in 40° C and 75%RH at 18 weeks 98

85 XRPD pattern of mixture of asiaticoside II and talcum after stored in 40° C and 75%RH at 18 weeks 99

86 XRPD pattern of mixture of asiaticoside II and magnesium stearate after stored in 40° C and 75%RH at 18 weeks 99

Figure **Page**

87 XRPD pattern of mixture of asiatiocoside II and silicon dioxide after stored in 40° C and 75%RH at 18 weeks 100

88 TGA thermogram if asiaticoside I at scanning rate 5°C/min, from 25 - 300°C.....102

89 TGA thermogram if asiaticoside II at scanning rate 5°C/min, from 25 - 300°C.....103

90 DSC thermogram of asiaticoside I and spray dried lactose mixture at scanning rate 5°C/min, from 25 - 300°C 103

91 DSC thermogram of asiaticoside II and spray dried lactose mixture at scanning rate 5°C/min, from 25 - 300°C 103

92 DSC thermogram of asiaticoside I and pregelatinized starch mixture at scanning rate 5°C/min, from 25 - 300°C 104

93 DSC thermogram of asiaticoside II and pregelatinized starch mixture at scanning rate 5°C/min, from 25 - 300°C 104

94 DSC thermogram of asiaticoside I and dibasic calcium phosphate mixture at scanning rate 5°C/min, from 25 - 300°C 105

95 DSC thermogram of asiaticoside II and dibasic calcium phosphate mixture at scanning rate 5°C/min, from 25 - 300°C 105

96 DSC thermogram of asiaticoside I and talcum mixture at scanning rate 5°C/min, from 25 - 300°C.....106

97 DSC thermogram of asiaticoside II and talcum mixture at scanning rate 5°C/min, from 25 - 300°C.....106

98 DSC thermogram of asiaticoside I and magnesium stearate mixture at scanning rate 5°C/min, from 25 - 300°C 107

99 DSC thermogram of asiaticoside II and magnesium stearate mixture at scanning rate 5°C/min, from 25 - 300°C 107

100 DSC thermogram of asiaticoside I and silicon dioxide mixture at scanning rate 5°C/min, from 25 - 300°C 108

101 DSC thermogram of asiaticoside II and silicon dioxide mixture at scanning rate 5°C/min, from 25 - 300°C 108

ABBREVIATIONS

°C	degree celcius
cm	centrimeter(s)
DSC	differential scanning calorimetry
FTIR	fourier transform infrared spectrophotoscopy
g	gram(s)
GC	gas chronatography
Glu	glucose
hr	hour(s)
HPLC	high performance liquid chromatography
KV	kilovolt
LD_{50}	a dose lethal to 50% of the specified animals or microorganism
mA	milliampere(s)
min	minute(s)
mg	milligram(s)
ml	mililitter(s)
M.W.	molecular weight
NMR	nuclear magnetic resornance
pH	the negative logarlithm of the hydrogen ion concentration
r^2	correlation of determination
RH	relative humudity
Rham	rhamnose
rpm	revolution per minute
SD	standard deviation
SEM	scanning electron microscopy
TGA	thermogravimatric analysis
TLC	thin layer chromatrography
XRPD	X-ray powder diffraction
w/w	weight by weight