ชื่อวิทยานิพนธ์	การสร้างข้อกำหนดมาตรฐานของสารสกัด rhinacanthins จากใบทองพันชั่ง
ผู้เขียน	นายทศธน จรูญรัตน์
สาขาวิชา	เภสัชศาสตร์
ปีการศึกษา	2550

บทคัดย่อ

วิธีการวิเคราะห์สาร rhinacanthin-C, rhinacanthin-D และ rhinacanthin-N ในสารสกัดใบทองพันชั่งด้วยเทคนิค reversed-phase high-performance liquid chromatography ถูกสร้างขึ้น โดยใช้คอลัมน์ชนิด TSK-gel ODS-80Ts (5 μm, 4.6 x 150 mm) กับ mobile phase ซึ่งเป็นตัวทำละลายผสมระหว่าง methanol และ 5% aqueous acetic acid ในอัตราส่วน 80:20 v/v การประเมินความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์ (method validation) โดยการประเมิน accuracy, linearity, precision, specificity และ limits of detection and quantitation ของวิธีการวิเคราะห์ พบว่า % recovery ของการวิเคราะห์สารทั้งสามชนิดอยู่ในช่วง 94.3 – 100.9 % และ calibration curve ของ rhinacanthins ทั้งสามชนิดมี linearity ที่ดี โดยมีค่า r^2 มากกว่าหรือเท่ากับ 0.9990 นอกจากนี้วิธีการดังกล่าวยังมีความจำเพาะเจาะจงและความเที่ยงสูง (ค่า %R.S.D. ของทั้ง repeatability และ reproducibility น้อยกว่า 5%) และวิธีการวิเคราะห์นี้มีค่า limits of detection and quantitation เท่ากับ 0.75 and 3.0 μg/ml ตามลำดับ การแยกสารสกัดใบทองพันชั่งให้บริสุทธิ์ขึ้นโดยใช้ basic anion exchange resin (Amberlite® IRA-67) ชะด้วย 10% acetic acid ใน methanol ทำให้ได้สารสกัดใบทองพันชั่งที่มีปริมาณสาร rhinacanthins สูง โดยสารสกัดที่ได้มีปริมาณสาร rhinacanthins รวมเพิ่มขึ้นจากเดิม 26.77 %w/w เป็น 83.61 %w/w นอกจากนี้ฤทธิ์ต้านเชื้อราที่ก่อโรคผิวหนังของสารสกัดก็เพิ่มขึ้นด้วย โดยมีค่า MIC ต่อเชื้อ *Trichophyton rubrum*, *Trichophyton mentagrophytes* และ *Microsporum gypseum* เท่ากับ 7.8, 31.2 และ 125 μg/ml ตามลำดับ จึงกำหนดค่ามาตรฐานปริมาณสารสำคัญ rhinacanthins รวมไม่น้อยกว่า 70 %w/w จากการศึกษาคุณสมบัติทางกายภาพของสารสกัดใบทองพันชั่งที่มีปริมาณสาร rhinacanthins สูง สามารถสร้างข้อกำหนดมาตรฐานของสารสกัดใบทองพันชั่งที่มีปริมาณสาร rhinacanthins สูงได้ดังนี้ ปริมาณความชื้น (loss on drying) ไม่มากกว่า 0.2 %w/w ปริมาณเถ้ารวมไม่มากกว่า 2.3 %w/w ไม่มีเถ้าที่ไม่ละลายในกรด ไม่มีการปนเปื้อนเชื้อแบคทีเรีย, *Escherichia coli* และเชื้อรา การประเมินค่าการละลายของสารสกัดในตัวทำละลายต่างๆ พบว่า สารสกัดละลายได้ดีใน chloroform และ ethyl acetate ละลายได้ใน methanol

และ ethanol ละลายได้บ้างใน DMSO ละลายได้เล็กน้อยใน hexane แต่ไม่ละลายในน้ำ สาร rhinacanthins ในสารสกัดมีค่า partition coefficient (log K) เท่ากับ 1.73 จากการศึกษาความคงตัวของสารสกัดในสภาวะต่างๆ เป็นเวลา 4 เดือน พบว่าสารสกัดมีความคงตัวดีเมื่อเก็บในภาชนะป้องกันแสงตลอด 4 เดือน ในขณะที่สารสกัดที่เก็บไว้ภายใต้แสงสว่างโดยไม่ป้องกันแสง จะไม่คงตัวหลังจากเก็บสารสกัดไว้ตั้งแต่ 1 สัปดาห์ขึ้นไป และพบว่าสารสกัดมีความคงตัวดีทั้งที่อุณหภูมิ 4 ± 2°C และ 30 ± 2°C การศึกษาความคงตัวในสภาวะเร่งโดยเก็บสารสกัดไว้ที่ 45°C ความชื้นสัมพัทธ์ 75% พบว่าเมื่อเวลาผ่านไป 4 สัปดาห์ ปริมาณ rhinacanthins ทั้งสามชนิดยังมีความคงตัวดีในสภาวะเร่ง เมื่อระยะเวลาผ่านไป 8 สัปดาห์ปริมาณ rhinacanthin-N ในสารสกัด เริ่มลดลงจากปริมาณเริ่มต้นและมีความแตกต่างจากสารสกัดที่เก็บที่สภาวะปกติอย่างมีนัยสำคัญ แต่ rhinacanthin-C และ rhinacanthin-D ยังมีความคงตัวดี อย่างไรก็ตามเมื่อระยะเวลาผ่านไป 12 สัปดาห์ สาร rhinacanthins ทั้งสามชนิดมีปริมาณลดลงจากปริมาณเริ่มต้นและมีความแตกต่างจากสารสกัดที่เก็บที่สภาวะปกติอย่างมีนัยสำคัญ การศึกษาอิทธิพลของ pH ต่อความคงตัวของสารสกัดในรูปสารละลาย พบว่าสารสกัดไม่มีความคงตัวที่ pH 5.5, pH 7.0 และ pH 8.0 อย่างไรก็ตาม พบว่าสารละลายที่ pH 5.5 สารสกัดจะมีความคงตัวดีกว่าที่ pH 7.0 และ pH 8.0 จากผลการศึกษาความคงตัวของสารสกัดที่ได้ แนะนำว่าการเก็บสารสกัดใบทองพันชั่งที่มีปริมาณสาร rhinacanthins สูง ควรเก็บในภาชนะปิดสนิทป้องกันแสงและสามารถเก็บที่อุณหภูมิห้องได้

Thesis Title	Establishment of Standard Information of Rhinacanthins Extract from *Rhinacanthus nasutus* Leaves
Author	Mr. Tossaton Charoonratana
Major program	Pharmaceutical Sciences
Academic Year	2007

ABSTRACT

A reversed-phase high-performance liquid chromatographic method was described for simultaneous determination of rhinacanthin-C, rhinacanthin-D and rhinacanthin-N in *Rhinacanthus nasutus* leaves. The method involved the use of a TSK-gel ODS-80Ts column (5 μm, 4.6 x 150 mm) with the mixture of methanol and 5% aqueous acetic acid (80:20, v/v) as the mobile phase. Various parameters of linearity, repeatability, accuracy, specificity and limits of detection and quantitation of the method were evaluated. The recovery of the compounds based on this method was 94.3 - 100.9 % and good linearity ($r^2 \geq 0.9990$) was obtained for all rhinacanthins. High degree of specificity, repeatability, and reproducibility (R.S.D. values less than 5%) were also achieved. The limit of detection and quantification of all rhinacanthins were 0.75 and 3.0 μg/ml, respectively. Fractionation of the ethyl acetate extract using a basic anion exchange resin (Amberlite® IRA-67) eluted with 10 % acetic acid in methanol afforded a rhinacanthin high-yielding *R. nasutus* leaf extract. The total content of rhinacanthins was increased from 26.77 %w/w to 83.61 %w/w. The antifungal activity of the rhinacanthin high-yielding *R. nasutus* leaf extract against dermatophytes was also improved. The MIC values of the rhinacanthin high-yielding *R. nasutus* leaf extract against *Trichophyton rubrum, Trichophyton mentagrophyte* and *Microsporum gypseum* were 7.8, 31.2, and 125 μg/ml, respectively. The standard value of the rhinacanthin content in the extract was therefore set up as the total rhinacanthins of not less than 70 %w/w. In addition, study on the physical properties of the rhinacanthin high-yielding extract let to the establishment of the specification of the extract as follow; moisture content (loss on drying) not more than 0.2 %w/w, total ash content not more than 2.5 %w/w, no acid insoluble ash, and no contamination with aerobic bacteria, *Escherichia coli* and fungi. Solubility evaluation of the extract in various solvents found that the extract was

freely soluble in ethyl acetate and chloroform, soluble in methanol and ethanol, sparingly soluble in DMSO, slightly soluble in hexane and practically insoluble in water. Determination of partition coefficient (log K) of the rhinacanthins in the extract found that the rhinacanthins in the rhinacanthin high-yielding *R. nasutus* leaf extract was 1.73. Stability evaluations of the rhinacanthin high-yielding *R. nasutus* leaf extracts in several conditions through the period of 4 months found that the extract was stable when it was kept in the well-closed container, protected from light, while the extract exposed to light was not stable after 1 weeks of storage. The extracts were also stable under 4 ± 2 ^{o}C, 30 ± 2 ^{o}C. Under accelerated condition at 45 ^{o}C with 75% relative humidity, the extract was stable through 4 weeks, but after 8 weeks, the rhinacanthin-N content began to decrease significantly. After 12 weeks the rhinacanthin-C, -D, and –N content was decreased significantly. Study on effect of pH on the stability of the aqueous solution of the extract found that the solutions were not stable at pH 5.5, pH 7.0, and pH 8.0. However, the solution at pH 5.5 was more stable than those at pH 7.0 and pH 8.0. These results suggest that the rhinacanthin high-yielding extract should be considered to store in well-closed container at room temperature (30 ± 2 ^{o}C) and protected from light.