



## Reference Standard Center

Bureau of Drug and Narcotic



# การผลิตสารมาตรฐานสมุนไพร เพื่อใช้ในการตรวจวิเคราะห์และวิจัย

ศูนย์สารมาตรฐานยาและวัตถุเสพติด  
สำนักยาและวัตถุเสพติด กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์





## สารมาตรฐานกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ (DMSc Reference Standard: DMScRS)

กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ ผลิตสารมาตรฐานกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ (DMScRS) เพื่อใช้ในงานควบคุมคุณภาพวัตถุดิบและเภสัชผลิตภัณฑ์ที่ผลิตในประเทศและนำเข้าจากต่างประเทศซึ่งมีจำหน่ายในท้องตลาด การควบคุมคุณภาพวัตถุดิบและเภสัชผลิตภัณฑ์ดังกล่าวจำเป็น ต้องใช้สารมาตรฐานของสารชนิดนั้น ๆ เป็นตัวเปรียบเทียบ เพื่อให้ทราบคุณภาพและปริมาณสารสำคัญของผลิตภัณฑ์ตามข้อกำหนดมาตรฐาน

- ✓ โครงการผลิต DMScRS เริ่มตั้งแต่ปี พ.ศ. 2536 (ARS เริ่มโครงการปี 2523)
- ✓ ปัจจุบันมีการผลิต DMScRS จำนวน 214 ชนิด

- สารมาตรฐานยา
- สารมาตรฐานยาเสพติดและวัตถุออกฤทธิ์
- สารมาตรฐานสารสลายตัว
- สารมาตรฐานสมุนไพร



# โครงการพัฒนาการผลิตสารมาตรฐานด้านยา วัตถุเสพติดและสมุนไพร

ความเชื่อมโยงของภารกิจงานต่อนโยบาย/เป้าหมายของส่วนราชการ “แผนยุทธศาสตร์ชาติ 20 ปี ด้านสาธารณสุข”

แผนงานที่ 10 ประเทศไทย 4.0 ด้านสาธารณสุข “โครงการพัฒนาผลิตภัณฑ์สุขภาพและเทคโนโลยีทางการแพทย์”

## สารมาตรฐานวัตถุเสพติด

- สนับสนุนงานตรวจพิสูจน์ยาเสพติดและวัตถุออกฤทธิ์ต่อจิตและประสาท
- ผู้ใช้บริการ: ห้องปฏิบัติการภายในกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์/สำนักงานคณะกรรมการป้องกันและปราบปรามยาเสพติด
- ประหยัดงบประมาณของประเทศและลดระยะเวลาในการดำเนินการนำเข้าสารมาตรฐานยาเสพติดจากต่างประเทศซึ่งมีราคาแพงและต้องใช้เวลาในการดำเนินการมากกว่า 6 เดือน

สารมาตรฐาน  
วัตถุเสพติด

สาร  
มาตรฐาน  
สมุนไพร

สารมาตรฐาน  
ยา

## สารมาตรฐานสมุนไพร

- สนับสนุนงานวิจัย พัฒนาและควบคุมคุณภาพผลิตภัณฑ์สมุนไพร
- ผู้ใช้บริการ: ห้องปฏิบัติการภายในกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์/มหาวิทยาลัย/อุตสาหกรรมสมุนไพร
- ส่งเสริมอุตสาหกรรมสมุนไพรไทยให้มีคุณภาพและมาตรฐาน สนับสนุนการส่งออกผลิตภัณฑ์สมุนไพรซึ่งมีมูลค่าการส่งออกมากกว่า 10,000 ล้านบาทต่อปี

## สารมาตรฐานยา

- ใช้ในงานควบคุมคุณภาพเภสัชภัณฑ์ยาแผนปัจจุบัน
- ผู้ใช้บริการ: ห้องปฏิบัติการภายในกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์/มหาวิทยาลัย/อุตสาหกรรมยาแผนปัจจุบัน
- ประหยัดงบประมาณของประเทศในการนำเข้าสารมาตรฐานยาจากต่างประเทศของทั้งภาครัฐและเอกชน
- ส่งเสริมอุตสาหกรรมยาแผนปัจจุบันให้มีคุณภาพและมาตรฐาน สนับสนุนการส่งออกเภสัชภัณฑ์ยาซึ่งมีมูลค่าการส่งออกมากกว่า 35,000 ล้านบาทต่อปี



## วัตถุประสงค์ของการผลิตสารมาตรฐานสมุนไพร

- ส่งเสริมการใช้ยาสมุนไพรตามแผนยุทธศาสตร์ชาติ 20 ปีด้านสาธารณสุข
- ส่งเสริมอุตสาหกรรมการผลิตสมุนไพรเพื่อการส่งออกไปยังต่างประเทศ
- มีความสำคัญในการควบคุมคุณภาพของผลิตภัณฑ์สมุนไพรที่จำหน่ายในประเทศและส่งออกไปยังต่างประเทศ
- เริ่มผลิตสารมาตรฐานสมุนไพรชนิดแรกปี พ.ศ. 2560

### บริหารจัดการโครงการผลิตสารมาตรฐานสมุนไพร

- ☐ ศูนย์สารมาตรฐานยาและวัตถุเสพติด สำนักยาและวัตถุเสพติด

### เจ้าของโครงการ/ผู้เกี่ยวข้อง

- ☐ กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ (สยวส, สวพ, ศูนย์วิจัยฯ)
- ☐ หน่วยงานความร่วมมือต่างๆ

### สนับสนุนโครงการ

- ☐ มหาวิทยาลัย
- ☐ โรงงานและอุตสาหกรรมสมุนไพร



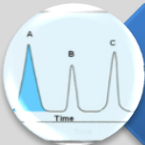
ขั้นตอนการผลิตสารมาตรฐานสมุนไพร



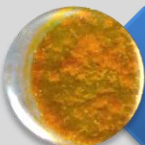
การคัดเลือกสมุนไพร / ค้นคว้าข้อมูล / หาสารสำคัญ



พัฒนาวิธีการสกัดและทำให้สารสำคัญบริสุทธิ์



พัฒนาและตรวจสอบความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์



ทดสอบคุณภาพวัตถุดิบเบื้องต้น



ทดสอบคุณสมบัติทางเคมี-กายภาพวัตถุดิบ / Homogeneity Testing / Stability monitoring

สยวส, ศวก.,  
มหาวิทยาลัย,  
หน่วยงานอื่นๆ  
(ความร่วมมือ)

ศูนย์สารมาตรฐานฯ  
สยวส

ระยะเวลาดำเนินการ



สารมาตรฐานกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์

# 1. การคัดเลือกสมุนไพร / คั่นคว้าข้อมูล / หาสารสำคัญ

1. คัดเลือกสมุนไพรเป้าหมาย ได้แก่ Product champion, ได้รับการส่งเสริม, มีการใช้อย่างแพร่หลาย, สมุนไพรตามแผนแม่บทของกระทรวง, โครงการประกันคุณภาพยา

| Product champion                     | บัญชียาหลักแห่งชาติ                                                   |                                                                                 |                                                                                    | แผนของ THP                                                 |                                                                          |
|--------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------|
| ขมิ้นชัน<br>กระชายดำ<br>โพล<br>บัวบก | ขิง<br>ชุมเห็ดเทศ<br>กล้วย<br>มะขามแขก<br>ฟ้าทะลายโจร<br>พลู<br>บัวบก | พริก<br>หญ้าหนวดแมว<br>กระเจี๊ยบแดง<br>มะระขี้นก<br>พญายอ<br>รางจืด<br>ขมิ้นชัน | หญ้าปักกิ่ง<br>ว่านหางจระเข้<br>เปลือกมังคุด<br>หญ้าดอกขาว<br>เมล็ดน้อยหน่า<br>โพล | ฟ้าทะลายโจร<br>กวาวเครือขาว<br>พญายอ<br>กระเทียม<br>รางจืด | เถากำแพงเจ็ดชั้น<br>เถาวัลย์เปรียง<br>มะหาด<br>เปลือกมังคุด<br>มะขามป้อม |



# 1. การคัดเลือกสมุนไพร / ค้นคว้าข้อมูล / หาสารสำคัญ

## 2. วิธีวิเคราะห์หาปริมาณ / พิสูจน์เอกลักษณ์ → เลือกสารสำคัญผลิตเป็นสารมาตรฐาน เช่น USP / BP / THP / มอก. / วารสาร

USP39

### Powdered Andrographis

#### DEFINITION

Powdered Andrographis is Andrographis reduced to a fine or very fine powder. It contains NLT 1.0% of diterpene lactones, calculated on the dried basis as the sum of the andrographolide, neoandrographolide, 14-deoxy-11,12-didehydroandrographolide, and andrograpanin.

#### COMPOSITION

##### • CONTENT OF DITERPENE LACTONES

**Solution A:** Dissolve 0.14 g of potassium dihydrogen phosphate in 900 mL of water, add 0.5 mL of phosphoric acid, dilute with water to 1000 mL, mix, filter, and degas.

**Solution B:** Use filtered and degassed acetonitrile.

**Standard solution A:** Dissolve a weighed quantity of USP Andrographolide RS in methanol to obtain a solution having a known concentration of about 1.0 mg/mL. Transfer 5.0 mL of this solution to a 10-mL volumetric flask, dilute with acetonitrile to volume, and mix.

**Standard solution B:** Transfer an amount of USP Powdered Andrographis Extract RS, equivalent to about 25 mg of diterpene lactones, to a 50-mL volumetric flask, add 25 mL of methanol, heat gently for 15–20 min, dilute with acetonitrile to volume, and mix. Before injection, pass through a membrane filter of 0.45- $\mu$ m or finer pore size, discarding the first 5 mL of the filtrate.

**Sample solution:** Transfer a weighed amount of Powdered Andrographis Extract, equivalent to about 25 mg of diterpene lactones, to a 50-mL volumetric flask, add 25 mL of methanol, heat gently for 15–20 min, dilute with acetonitrile to volume, and mix. Before injection,

148

THP 2018

### ยาแคปซูลขมิ้นชัน (KHAMIN CHAN CAPSULES)

Turmeric Capsules

Category Stomachic, carminative.

Turmeric Capsules contain an amount of powdered Turmeric equivalent to not less than 80.0 per cent of the labelled amount of volatile oil and not less than 90.0 per cent of the labelled amount of curcuminoids, calculated as curcumin ( $C_{21}H_{20}O_6$ ).

#### Assay

**FOR VOLATILE OIL** Grind the contents of not less than 20 Turmeric Capsules to fine powder. Transfer about 10 g, accurately weighed, to a 500-ml round-bottomed flask. Use 100 ml of water as the distillation liquid and distil at a rate of 2 to 3 ml per minute for 5 hours. Use 2.0 ml of xylene in the graduated tube (Appendix 7.3H). Calculate the content of volatile oil, in ml, in the portion of the Capsules taken with reference to the anhydrous substance.

**FOR CURCUMINOIDS** Carry out the determination as described in the "Ultraviolet and Visible Spectrophotometry" (Appendix 2.2).

**Standard curcumin solution** Dissolve an accurately weighed quantity of curcumin in methanol. Dilute quantitatively with methanol to obtain a solution having a known concentration of about 400  $\mu$ g of curcumin per ml.

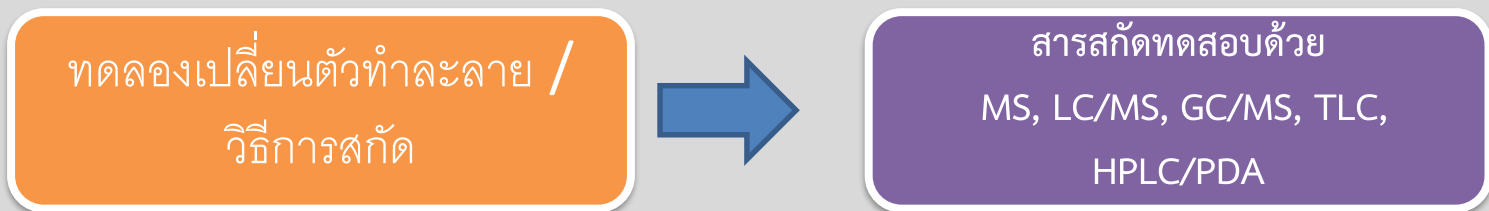
**Standard curcumin curve** Transfer into five 10-ml volumetric flasks, 20, 40, 50, 60, and 80  $\mu$ l of Standard curcumin solution, dilute to volume with methanol, and mix. Measure the absorbances of the standard solutions at the maximum at about 420 nm, using methanol as the blank. Plot the readings and draw the curve of best fit.

**Assay preparation** Weigh and mix the contents of not less than 20 Turmeric Capsules. Transfer about 400 mg, accurately weighed, to a stoppered centrifuge tube. Add 10.0 ml of tetrahydrofuran and mix. Set aside at room temperature for 24 hours with frequent shaking. Dilute 1.0 ml of the clear supernatant liquid with methanol to produce 25.0 ml. Transfer 1.0 ml of this solution into a 50-ml volumetric flask, dilute to volume with methanol and mix well.

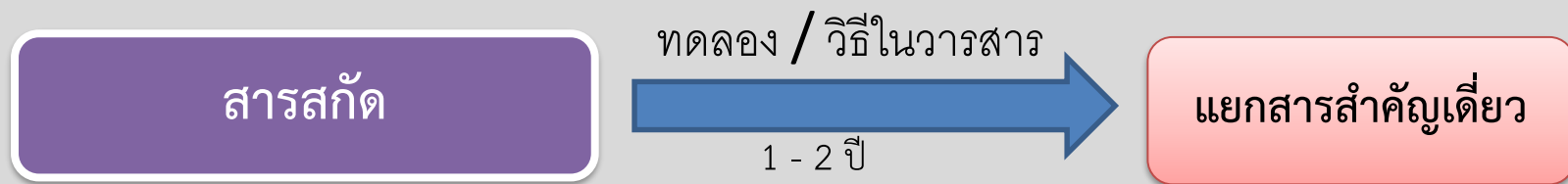
**Procedure and Calculation** Measure the absorbance of Assay preparation at the maximum at about 420 nm, using methanol as the blank. By reference to the Standard curcumin curve, calculate the content of curcuminoids as curcumin ( $C_{21}H_{20}O_6$ ) in the portion of the Capsules taken.

## 2. พัฒนาวิธีการสกัดและทำให้สารสำคัญบริสุทธิ์

- ✓ เลือกชนิดตัวทำละลาย (ทำการทดลอง) ที่ได้สารที่ต้องการมากที่สุดและมีสารอื่นปนเปื้อนน้อยที่สุด เช่น Hexane, Chloroform, dichloromethane, ethanol, methanol, 50% ethanol, water และอื่นๆ
- ✓ ทดลองวิธีการสกัดต่างๆ / อุณหภูมิต่างๆ / เวลา



- ✓ วิธีทำให้บริสุทธิ์ เช่น ตกลึกซ้ำ, column chromatography



- ✓ วิธีเหมาะสมสำหรับ สเกลการผลิต (ได้สารสำคัญเดี่ยว 5-10 กรัม)  
ทดสอบความบริสุทธิ์เบื้องต้น

ความบริสุทธิ์สูง > 95%



### 3. พัฒนาและตรวจสอบความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์

- ไม่มีวิธีมาตรฐาน USP / BP/ THP หรือวิธีไม่เหมาะสม
- ไม่มีวิธีในวารสาร / วิธีอ้างอิง เช่น มอก.
- ไม่เป็นวิธีวิเคราะห์สำหรับสารสำคัญเดียว เช่น เกสรตัวรับ



**Method development :** HPLC, LC/MS

TLC (std for identification)

**Method validation** (for assay of std.) :

Specificity, Accuracy, Precision, linearity, robustness, ruggedness

วิธีและเกณฑ์ตาม USP/BP และ  
ICH Guidelines

## 4. ทดสอบคุณภาพวัตถุดิบเบื้องต้น

**Identification** : IR, TLC, Melting point, Mass, NMR

**Purity** : HPLC, Titration, UV ( >95%)

ไม่ผ่าน

พัฒนาวิธีการสกัด  
ใหม่ / ตกผลึกซ้ำ /  
เพิ่มขั้นตอนการทำให้  
บริสุทธิ์



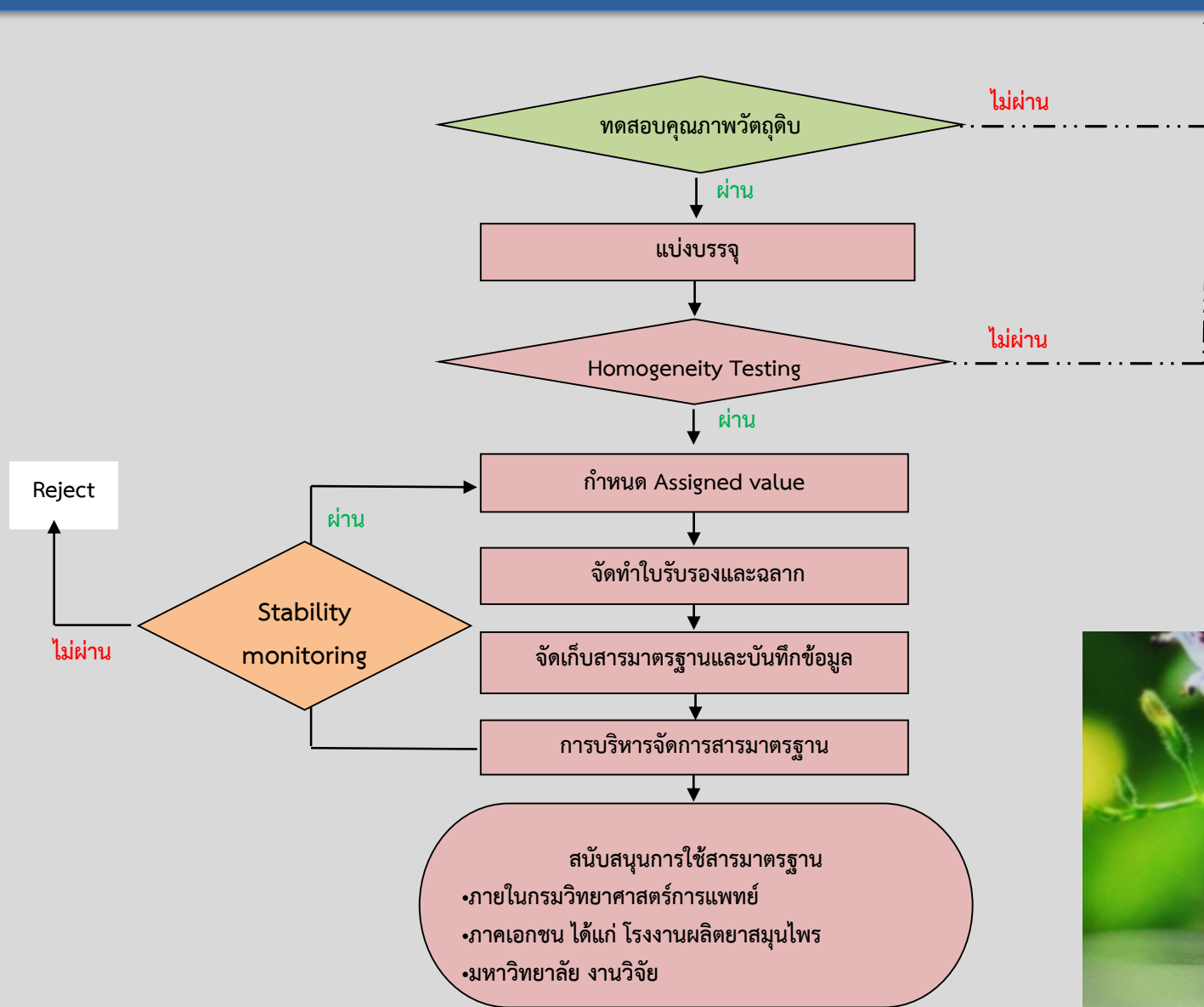
ผ่านและได้ปริมาณมากพอ\*\*

ฝ่าย ศูนย์สารมาตรฐานฯ สยวส. รับผิดชอบ  
ตรวจวิเคราะห์คุณภาพวัตถุดิบที่ได้รับและดำเนินการ  
จัดทำเป็นสารมาตรฐาน

\*\* สารมาตรฐานสำหรับหาปริมาณ ต้องการ 5-10 กรัม

สารมาตรฐานสำหรับพิสูจน์เอกลักษณ์ ต้องการ 3-5 กรัม

## 5. กระบวนการผลิตสารมาตรฐาน DMScRS



# การผลิตสารมาตรฐาน Andrographolide DMScRS

## การพัฒนาวิธีการสกัดและการทำให้บริสุทธิ์

- ใบและต้นฟ้าทะลายโจรอบแห้ง → สกัดสารสำคัญ ด้วยตัวทำละลายชนิดต่างๆ ได้แก่ hexane, chloroform, ethanol, methanol etc. สารสกัดต่างๆที่ได้นำไปทดสอบ
- ทดสอบ crude ด้วย LC/MS เลือกตัวทำละลายและวิธีที่เหมาะสม (ได้สาร **Andrographolide** มากที่สุด และมีสารอื่นน้อย เช่น **Neoandrographolide**, **14-deoxy-11,12-didehydroandrographolide**, **Andrograpanin** และสารอื่น )
- ตกผลึกสารสำคัญ → ตกผลึกซ้ำ → ผลึกสารบริสุทธิ์
- %yield = 1.3 (จากฟ้าทะลายโจรอบแห้ง 10 กิโลกรัม)



ฟ้าทะลายโจร



ต้นและใบแห้ง



สกัดสารสำคัญ



ตกผลึก



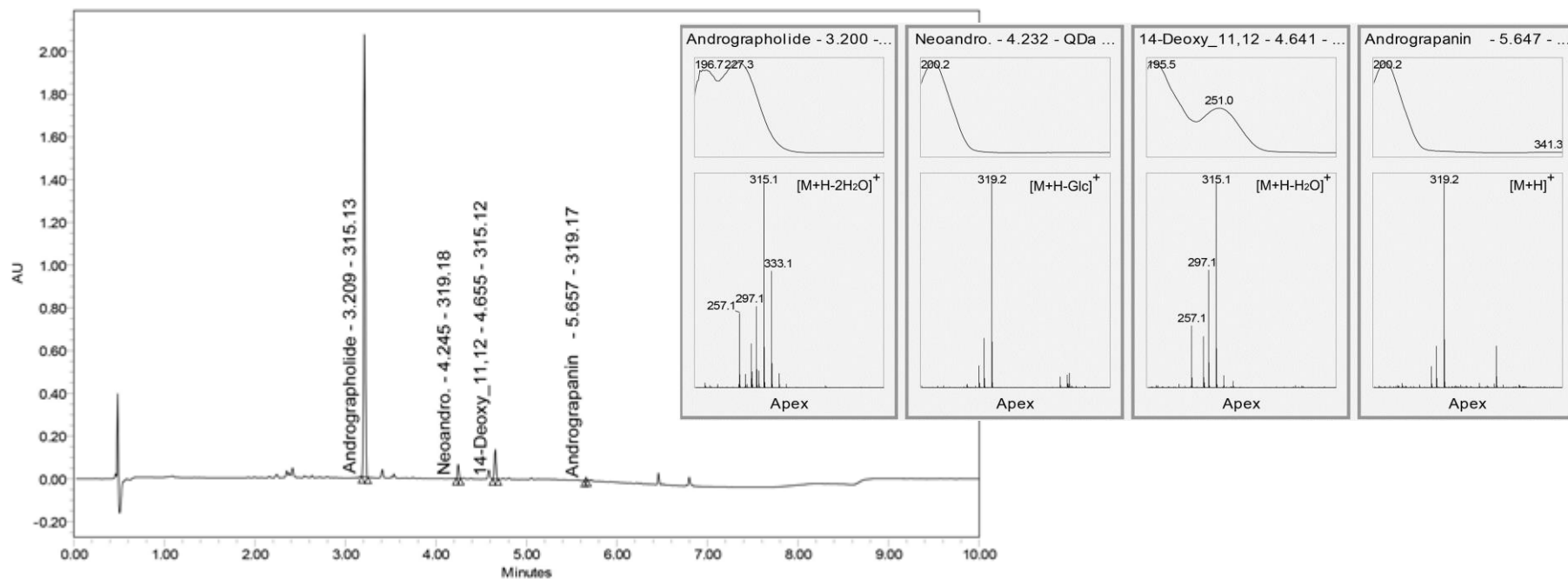
ผลึกบริสุทธิ์



Andrographolide  
DMScRS

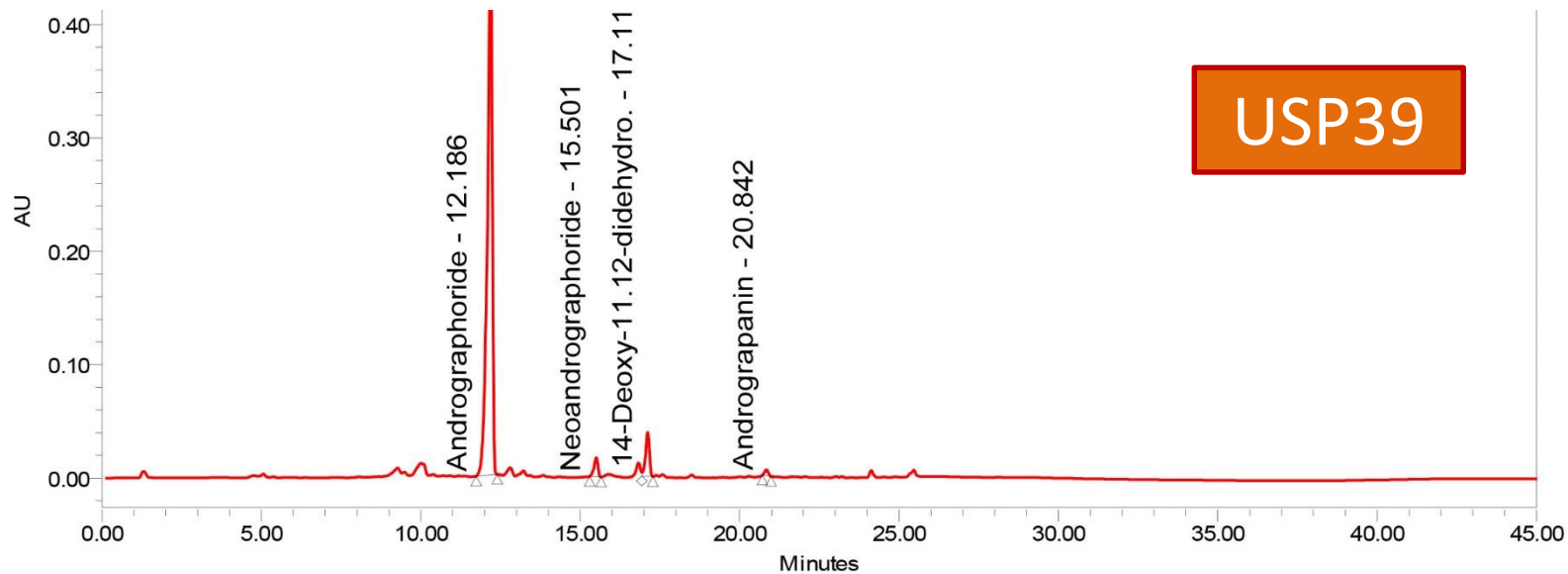
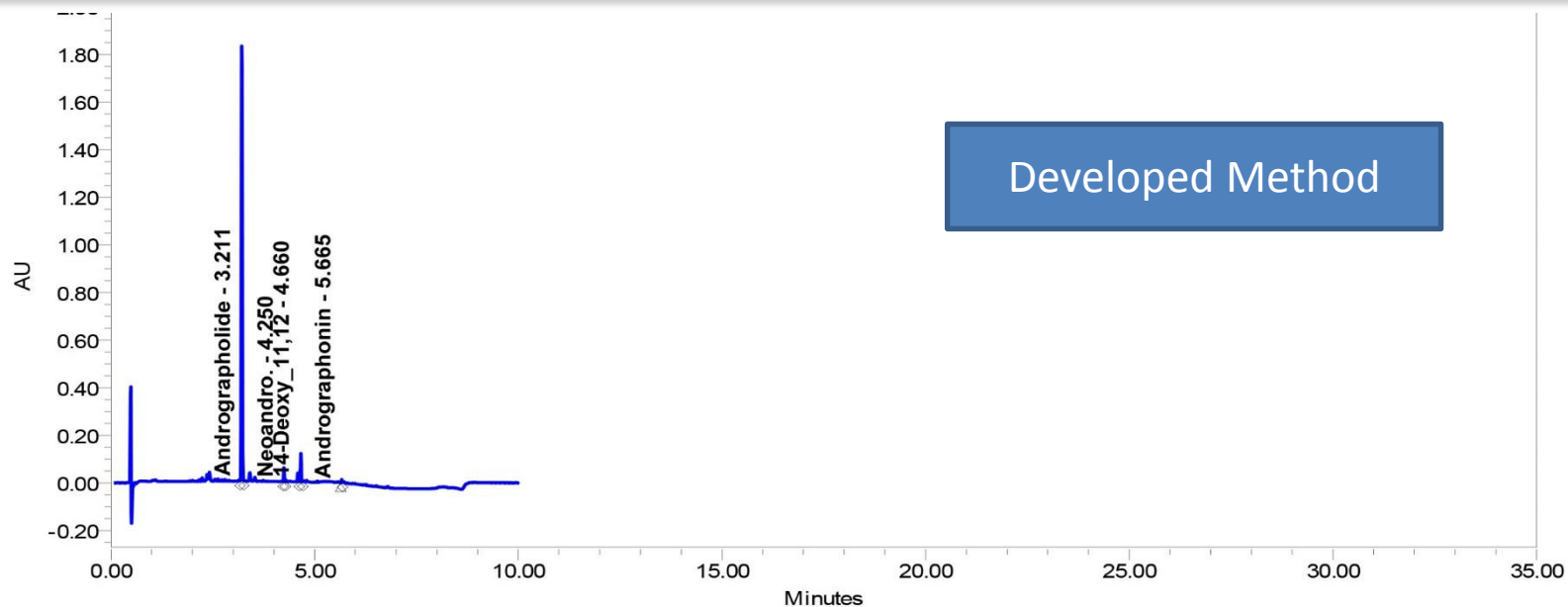
## พัฒนาและตรวจสอบความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์

- พัฒนาริธีวิเคราะห์ด้วย UPLC/MS ควรเลือกวิธีที่เหมาะสมสำหรับใช้วิเคราะห์ในขั้นตอนต่างๆ ได้แก่
  - ✓ ตรวจวิเคราะห์สารสกัดที่ได้จากการทดลอง
  - ✓ วิเคราะห์ผลึกที่ได้ ตกผลึกซ้ำหรือไม่
  - ✓ ใช้ยืนยันชนิดและความบริสุทธิ์ของสารเบื้องต้น
  - ✓ ใช้หาค่า assign value
  - ✓ ใช้ทดสอบ Homogeneity & Stability





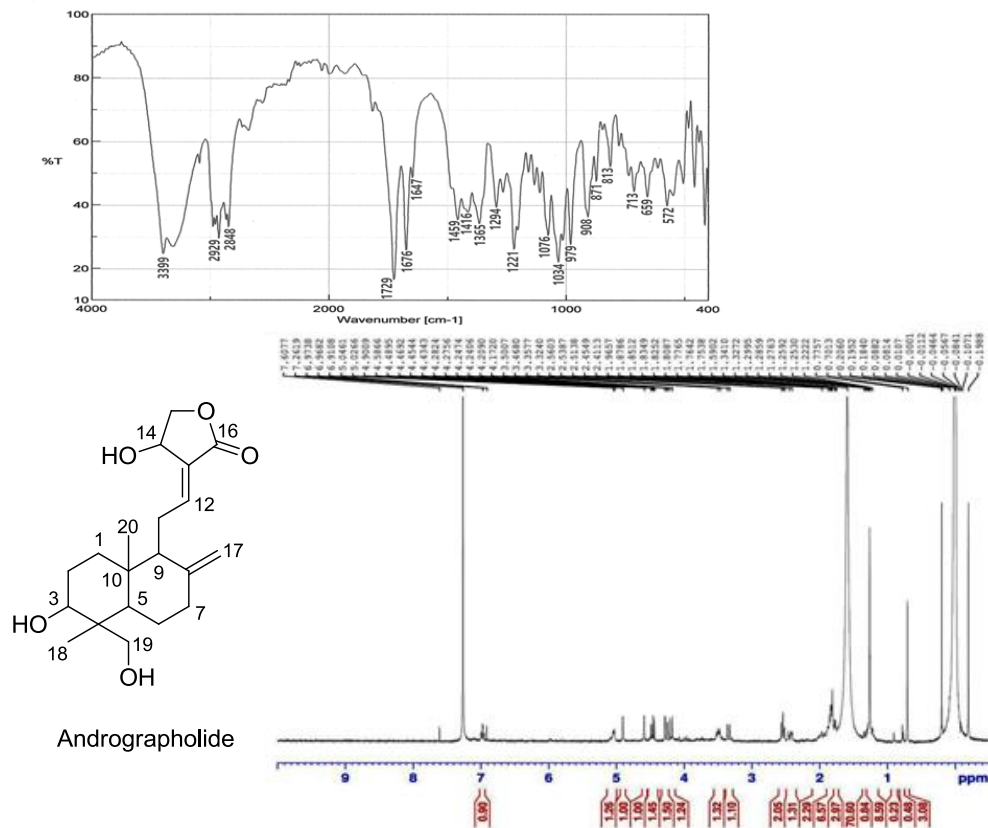
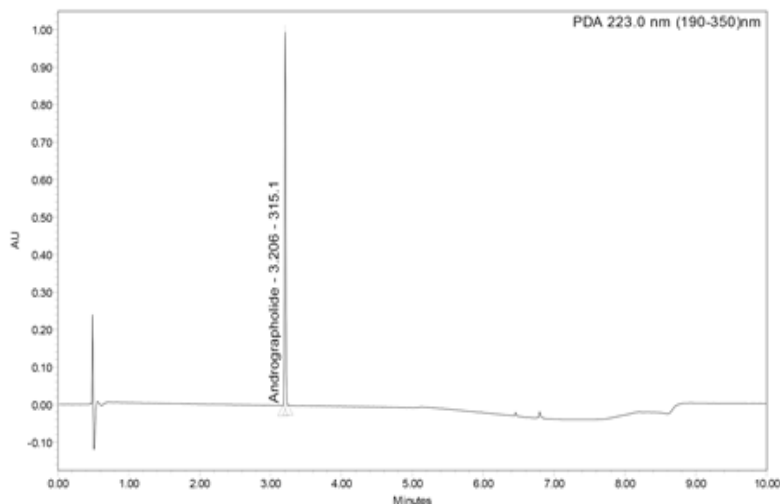
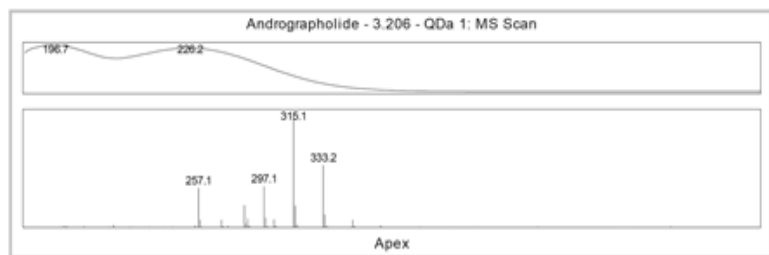
## Method development for Andrographolide



# การผลิตสารมาตรฐาน Andrographolide DMScRS

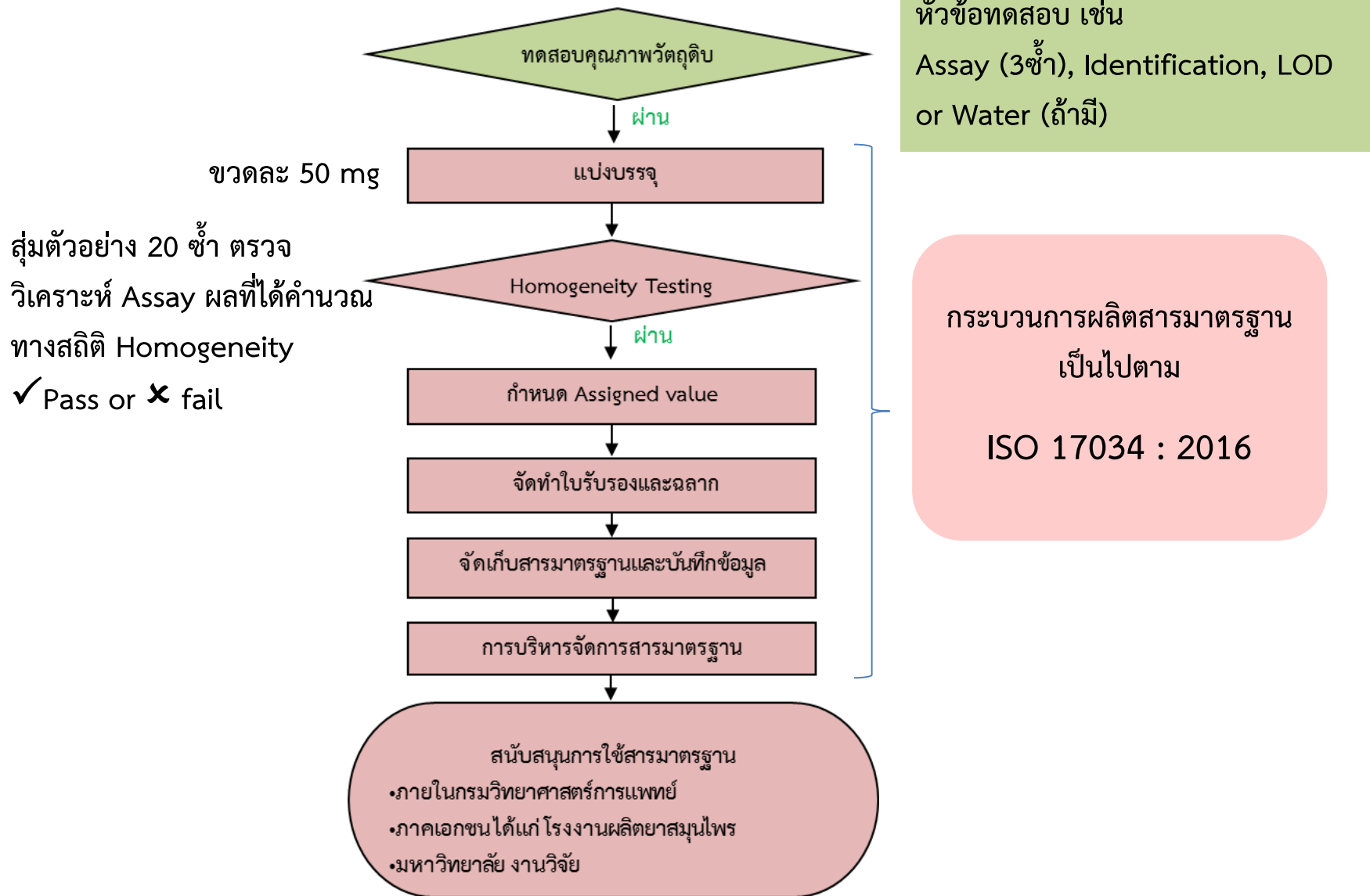
## ทดสอบคุณภาพวัตถุดิบเบื้องต้น

- พิสูจน์ทราบโครงสร้างทางเคมีของสาร : IR , Mass , NMR
- พิสูจน์เอกลักษณ์สาร : IR (เปรียบเทียบกับ Standard) , Melting point
- ความบริสุทธิ์ของสาร : HPLC



# การผลิตสารมาตรฐาน Andrographolide DMScRS

## การให้ค่าความบริสุทธิ์และการผลิตสารมาตรฐาน



# การผลิตสารมาตรฐาน Andrographolide DMScRS



## Andrographolide DMScRS

- สารมาตรฐาน DMSc สมุนไพรชนิดแรก
- ได้จากการสกัดสาร Andrographolide จากใบและต้นฟ้าทะลายโจร *Andrographis paniculata* (Burm.F.)
- ความบริสุทธิ์ >98%
- ใช้ควบคุมคุณภาพวัตถุดิบและผลิตภัณฑ์จากฟ้าทะลายโจร
- ขนาดบรรจุขวดละ 50 มิลลิกรัม จำหน่ายราคา 3,000 บาท (Andrographolide USPRS 15,000 บาท/50 มิลลิกรัม)



BUREAU OF DRUG AND NARCOTIC  
DEPARTMENT OF MEDICAL SCIENCES  
MINISTRY OF PUBLIC HEALTH  
NONTABURI 11000, THAILAND  
TEL. (662) 951-0000 ext. 99103 FAX. (662) 5805733

### Certificate of Analysis ANDROGRAPHOLIDE DMSc Reference Standard Control No. 01A60213

|                     |                                                                                                                                                                |
|---------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Description         | : A white, crystalline powder.                                                                                                                                 |
| Infrared absorption | : Concordant with the reference spectrum of Andrographolide USPRS                                                                                              |
| Assay               | : $981.5 \pm 11.1$ mcg/mg of $C_{20}H_{30}O_5$ , calculated on the as is basis, 95% confidence level ( $k=2$ ), determined by HPLC method, compared with USPRS |
| Intended use        | : For chemical assay and identification.                                                                                                                       |
| Direction for use   | : Do not dry before use.                                                                                                                                       |
| Storage             | : Keep container tightly closed and protected from light, preferably at the temperature about $0^\circ\text{C}$                                                |

Tested Date: 23 November 2017  
Next Retest Date: 23 November 2020  
Reference Standard Center  
Bureau of Drug and Narcotic

### Powdered Andrographis Extract

#### DEFINITION

Powdered Andrographis Extract is prepared from Andrographis by extraction with methanol or alcohol. The ratio of plant material to extract is between 15:1 and 10:1. It contains NLT 90.0% and NMT 110.0% of the labeled amount of diterpene lactones, calculated on the dried basis as the sum of andrographolide, neoandrographolide, 14-deoxy-11,12-didehydroandrographolide, and andrograpanin. The content of 14-deoxy-11,12-didehydroandrographolide is NMT 15% of the total diterpene lactones. It may contain suitable added substances as carriers.

#### COMPOSITION

##### • CONTENT OF DITERPENE LACTONES

**Solution A:** Dissolve 0.14 g of potassium dihydrogen phosphate in 900 mL of water, add 0.5 mL of phosphoric acid, dilute with water to 1000 mL, mix, filter, and degas.

**Solution B:** Use filtered and degassed acetonitrile.

**Standard solution A:** Dissolve a weighed quantity of USP Andrographolide RS in methanol to obtain a solution having a known concentration of about 1.0 mg/mL. Transfer 5.0 mL of this solution to a 10-mL volumetric flask, dilute with acetonitrile to volume, and mix.

**Standard solution B:** Transfer an amount of USP Powdered Andrographis Extract RS, equivalent to about 25 mg of diterpene lactones, to a 50-mL volumetric flask, add 25 mL of methanol, heat gently for 15–20 min, dilute with acetonitrile to volume, and mix. Before injection, pass through a membrane filter of 0.45-μm or finer pore size, discarding the first 5 mL of the filtrate.

**Sample solution:** Transfer a weighed amount of Powdered Andrographis Extract, equivalent to about 25 mg of diterpene lactones, to a 50-mL volumetric flask, add 25 mL of methanol, heat gently for 15–20 min, dilute with acetonitrile to volume, and mix. Before injection, pass through a membrane filter of 0.45-μm or finer pore size, discarding the first 5 mL of the filtrate.

**Mobile phase:** See the gradient table below.

| Time (min) | Solution A (%) | Solution B (%) |
|------------|----------------|----------------|
| 0          | 95             | 5              |
| 18         | 55             | 45             |
| 25         | 20             | 80             |
| 28         | 20             | 80             |
| 35         | 55             | 45             |
| 40         | 95             | 5              |
| 45         | 95             | 5              |

#### Chromatographic system

(See Chromatography <621>, System Suitability.)

**Mode:** LC

**Detector:** UV 223 nm

**Column:** 4.6-mm × 25-cm; 5-μm packing L1

**Flow rate:** 1.5 mL/min

**Injection size:** 20 μL

#### System suitability

**Samples:** Standard solution A and Standard solution B

#### Suitability requirements

The chromatogram from Standard solution B is similar to the reference chromatogram provided with the lot of USP Powdered Andrographis Extract RS.

**Column efficiency:** NLT 5000 theoretical plates, Standard solution A

**Tailing factor:** NMT 1.5 for the andrographolide peak, Standard solution A

**Relative standard deviation:** NMT 2.0%, determined from the andrographolide peak for replicate injections, Standard solution A

**Resolution:** NLT 5 between the neoandrographolide and 14-deoxy-11,12-didehydroandrographolide peaks, Standard solution B

| Analyte                                 | Relative Retention Time |
|-----------------------------------------|-------------------------|
| Andrographolide                         | 1.00                    |
| Neoandrographolide                      | 1.16                    |
| 14-Deoxy-11,12-didehydroandrographolide | 1.31                    |
| Andrograpanin                           | 1.50                    |

Separately calculate the percentages of andrographolide, neoandrographolide, 14-deoxy-11,12-didehydroandrographolide, and andrograpanin in the portion of Powdered Andrographis Extract taken:

$$\text{Result} = (r_u/r_s) \times (C_s/W) \times 5F$$

$r_u$  = peak response for each diterpene lactone from the Sample solution

$r_s$  = peak response for andrographolide from Standard solution A

$C_s$  = concentration of USP Andrographolide RS in Standard solution A (mg/mL)

$W$  = weight of Powdered Andrographis Extract taken to prepare the Sample solution (g)

$F$  = conversion factor for each analyte (1.00 for andrographolide, 3.90 for neoandrographolide, 1.45 for 14-deoxy-11,12-didehydroandrographolide, and 2.65 for andrograpanin)

**Acceptance criteria:** 90.0%–110.0%, on the dried basis, of the labeled amount of diterpene lactones calculated as the sum of the percentages of andrographolide, neoandrographolide, 14-deoxy-11,12-didehydroandrographolide, and andrograpanin



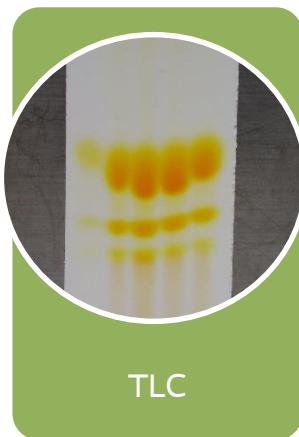
# การผลิตสารมาตรฐาน Curcumin DMScRS

## การพัฒนาวิธีการแยกสารสำคัญและทำให้บริสุทธิ์

- วัตถุดิบ Curcuminoids ( Curcumin, Desmethoxycurcumin, Bisdemethoxycurcumin )  
ทดสอบหา condition สำหรับการแยก Curcumin ด้วย TLC
- แยกสารสำคัญออกจากสารอื่น ด้วย Column Chromatography ➡ ได้ condition ที่เหมาะสม
- ทดสอบ fraction ที่แยกได้ด้วย LC/MS (ทราบค่า purity เบื้องต้น)
- ทำซ้ำ ➡ ➡ เก็บ+รวม fraction สารสำคัญ ➡ ตกลึกซ้ำ (ทดสอบความบริสุทธิ์เบื้องต้น)
- %yield = 34.4 (จากวัตถุดิบ Curcuminoids 25 กรัม)



Curcuminoids



TLC



Column



เก็บFractions



ตกลึกซ้ำ



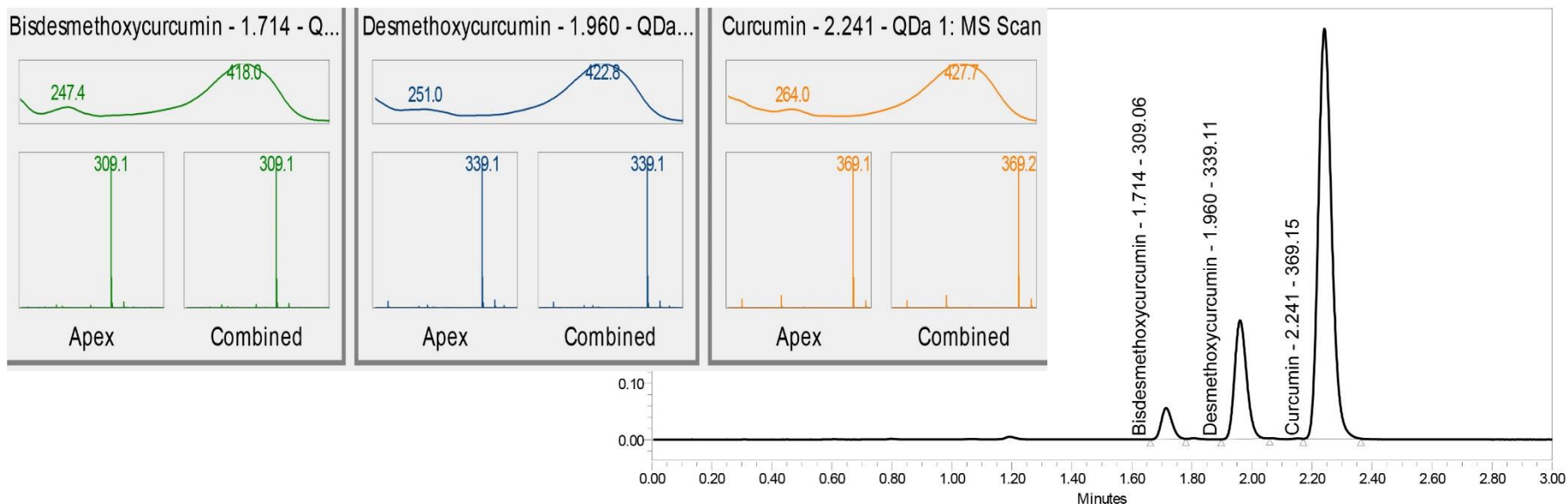
Curcumin  
DMScRS



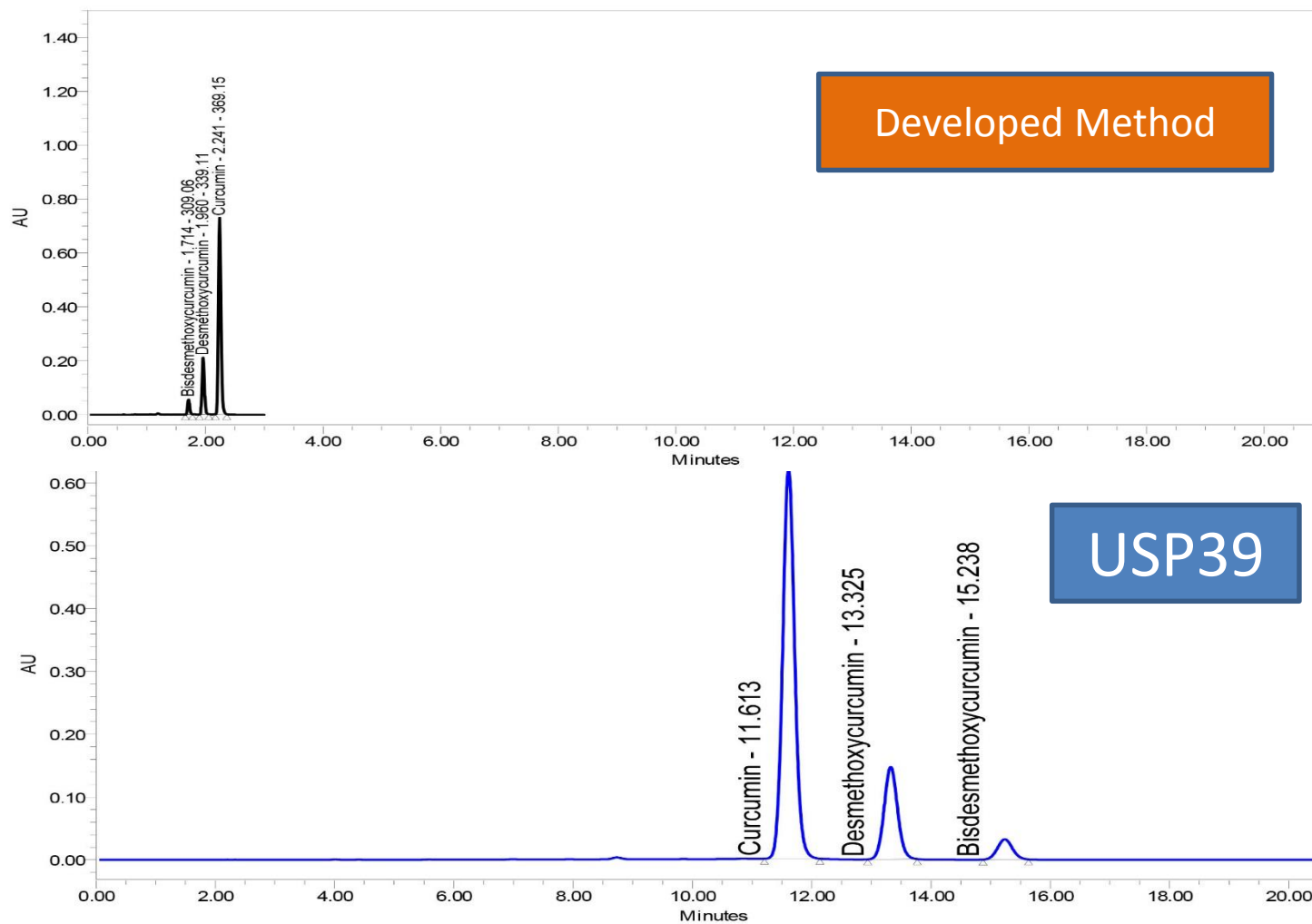
# การผลิตสารมาตรฐาน Curcumin DMScRS

## พัฒนาและตรวจสอบความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์

- พัฒนาวิธีวิเคราะห์ด้วย UPLC/MS เป็นวิธีที่เหมาะสมสำหรับใช้วิเคราะห์ในขั้นตอนต่างๆ ได้แก่
  - ✓ ใช้ยืนยันชนิดของสารในแต่ละ fractions
  - ✓ ตรวจวิเคราะห์ผลึกที่ได้ ตกผลึกซ้ำหรือไม่
  - ✓ ใช้ยืนยันชนิดและความบริสุทธิ์ของสารเบื้องต้น
  - ✓ ใช้หาค่า assign value
  - ✓ ใช้ทดสอบ Homogeneity & Stability

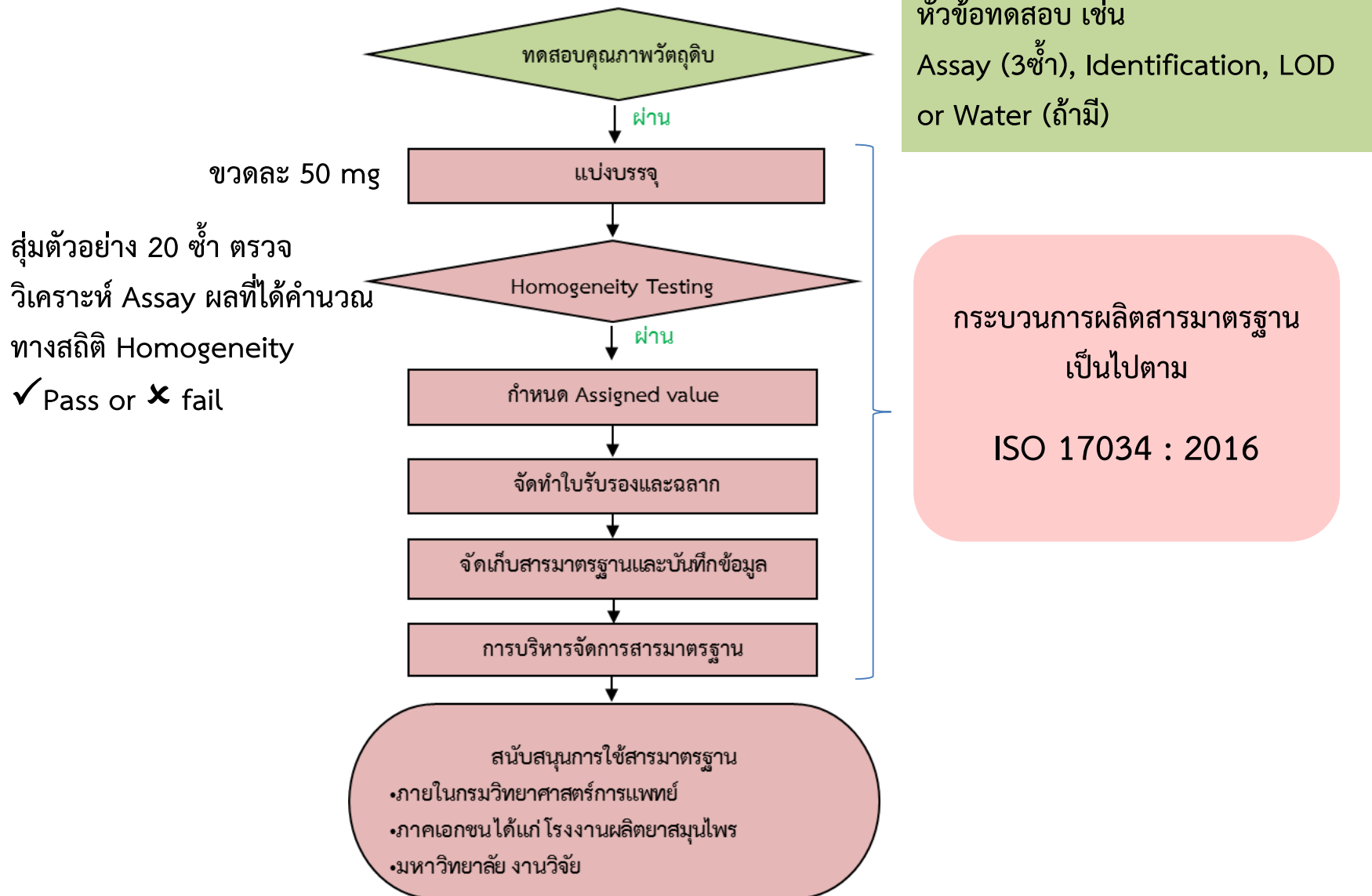


# Method development for Curcumin



# การผลิตสารมาตรฐาน Curcumin DMScRS

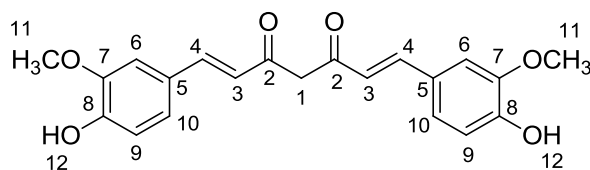
## การให้ค่าความบริสุทธิ์และการผลิตสารมาตรฐาน



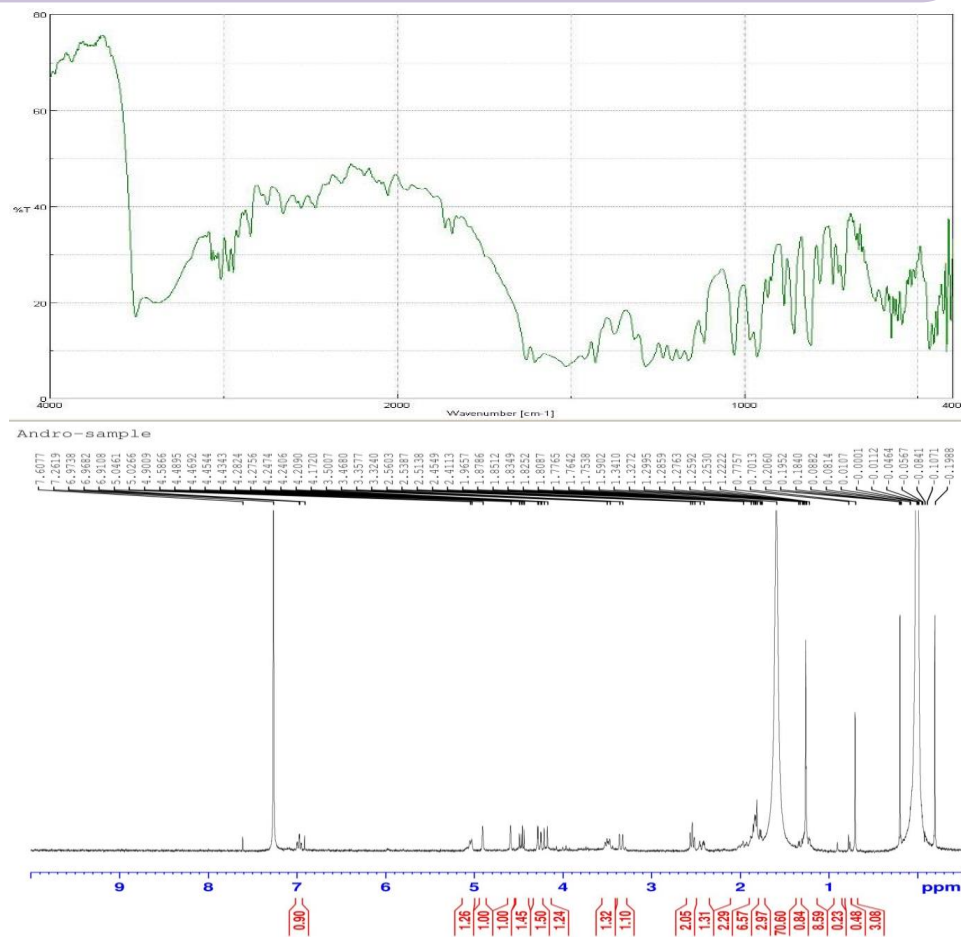
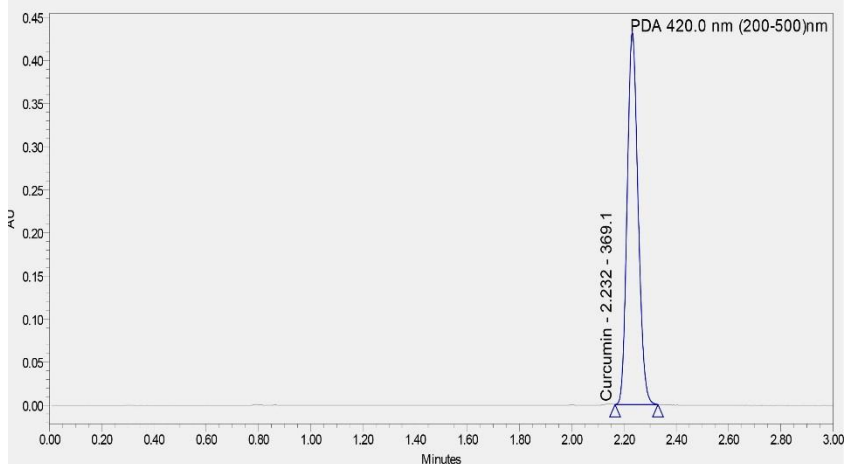
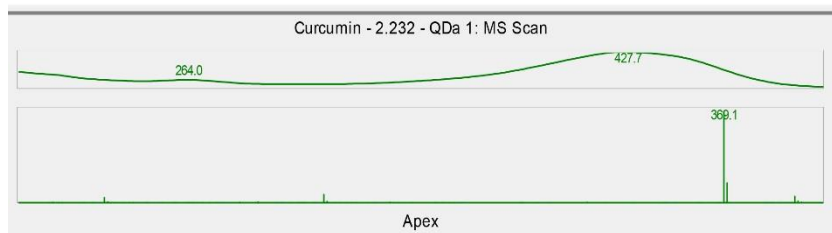
## การผลิตสารมาตรฐาน Curcumin DMSO

## ทดสอบคุณภาพวัตถุดิบเบื้องต้น

- พิสูจน์ทราบโครงสร้างทางเคมีของสาร : IR , Mass , NMR
- พิสูจน์เอกลักษณ์สาร : IR (เปรียบเทียบกับ Standard) , Melting point
- ความบริสุทธิ์ของสาร : HPLC



## Curcumin



# การผลิตสารมาตรฐาน Curcumin DMScRS



## Curcumin DMScRS

- สารมาตรฐาน DMSc สมุนไพรผลิตขึ้นในปี 2561
- ได้จากการแยก Curcumin จากวัตถุดิบ Curcuminoids ที่พบในขมิ้นชัน
- ความบริสุทธิ์ >95%
- ใช้ควบคุมคุณภาพวัตถุดิบและผลิตภัณฑ์จากขมิ้นชัน
- ขนาดบรรจุขวดละ 50 มิลลิกรัม จำหน่ายราคา 3,000 บาท  
(Curcumin USPRS 10,000 บาท/30 มิลลิกรัม)



BUREAU OF DRUG AND NARCOTIC  
DEPARTMENT OF MEDICAL SCIENCES  
MINISTRY OF PUBLIC HEALTH  
NONTABURI 11000, THAILAND  
TEL. (662) 951-0000 ext. 99103 FAX. (662) 5805733

### Certificate of Analysis CURCUMIN DMSc Reference Standard Control No. 01A61214

|                   |                                                                                                                                                                |
|-------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Description       | : A yellow, crystalline powder.                                                                                                                                |
| IR Identification | : Concordant with the reference spectrum of Curcumin USPRS.                                                                                                    |
| Assay             | : $951.5 \pm 21.0$ mcg/mg of $C_{21}H_{20}O_6$ , calculated on the as is basis, 95% confidence level ( $k=2$ ), determined by HPLC method, compared with USPRS |
| Intended use      | : For chemical assay and identification.                                                                                                                       |
| Direction for use | : Do not dry before use.                                                                                                                                       |
| Storage           | : Keep container tightly closed and protected from light, preferably at the temperature below $0^\circ\text{C}$ .                                              |

Tested Date: 30 November 2018  
Next Retest Date: 30 November 2021  
Reference Standard Center  
Bureau of Drug and Narcotic



- **ABSENCE OF SPECIFIED MICROORGANISMS (2022):** Meet the requirements of the tests for the absence of *Salmonella* species and *Escherichia coli*

## ADDITIONAL REQUIREMENTS

- **PACKAGING AND STORAGE:** Preserve in well-closed containers, protect from light and moisture, and store at room temperature.
- **LABELING:** The label states the content of curcuminoids in mg/Capsule.
- **USP REFERENCE STANDARDS (11)**  
USP Bisdesmethoxycurcumin RS  
USP Curcumin RS  
USP Curcuminoids RS  
USP Desmethoxycurcumin RS

**USP39**

## Curcuminoids Tablets

### DEFINITION

Curcuminoids Tablets are prepared from Curcuminoids and contain NLT 90.0% and NMT 110.0% of the labeled amount of curcuminoids, calculated as the sum of curcumin, desmethoxycurcumin, and bisdesmethoxycurcumin.

### IDENTIFICATION

#### A. THIN-LAYER CHROMATOGRAPHY

**Standard solution:** 0.2 mg/mL of USP Curcuminoids RS in acetone

**Sample solution:** Weigh and finely powder NLT 20 Tablets. Transfer a portion of the powder, equivalent to about 10 mg of curcuminoids, to a suitable container, add 5 mL of acetone, shake for 1 min, and sonicate for 10 min. Allow to stand for 15 min before use.

**Adsorbent:** Chromatographic silica gel mixture with an average particle size of 10-15 µm (TLC plates)

**Application volume:** 10 µL, as bands

**Developing solvent system:** Chloroform, methanol, and formic acid (96:4:1)

#### Analysis

**Samples:** Standard solution and Sample solution

Apply the samples as bands to a suitable thin-layer chromatographic plate (see *Chromatography* (621)). Use a saturated chamber. Develop the chromatograms until the solvent front has moved up about three-fourths of the length of the plate. Remove the plate from the chamber, dry, and examine under UV light at 365 nm.

**Acceptance criteria:** The Sample solution chromatogram shows yellowish-brown bands due to bisdesmethoxycurcumin, desmethoxycurcumin, and curcumin at  $R_f$  values of about 0.4, 0.6, and 0.7, respectively, corresponding in position and color to those obtained from the Standard solution.

• **B.** The retention times of the peaks for curcumin, desmethoxycurcumin, and bisdesmethoxycurcumin of the Sample solution correspond to those of the Standard solution for the appropriate USP Reference Standard, as obtained in the test for Content of Curcuminoids.

### STRENGTH

#### CONTENT OF CURCUMINOIDS

**Mobile phase:** Tetrahydrofuran and 1 mg/mL of citric acid in water (4:6)

[NOTE—Sonication may be necessary to dissolve the RS in each Standard solution; all solutions should be passed through a filter with 0.45-µm pore size before injection. USP Curcumin RS, USP Desmethoxycurcumin RS and USP Bisdesmethoxycurcumin RS can also be prepared in one standard solution containing the final concentration specified below for each.]

**Standard solution A:** 40 µg/mL of USP Curcuminoids RS in Mobile phase

**Standard solution B:** 40 µg/mL of USP Curcumin RS in Mobile phase

**Standard solution C:** 10 µg/mL of USP Desmethoxycurcumin RS in Mobile phase

**Standard solution D:** 2 µg/mL of USP Bisdesmethoxycurcumin RS in Mobile phase

**Sample stock solution:** Weigh and finely powder NLT 20 Tablets. Transfer an accurately weighed amount of the powder, equivalent to about 20 mg of curcuminoids, to a 50-mL volumetric flask. Add about 30 mL of acetone, sonicate for 30 min, dilute with acetone to volume, mix, and centrifuge.

**Sample solution:** Dilute a portion of the Sample stock solution (1 in 10) with Mobile phase, and mix.

#### Chromatographic system

(See *Chromatography* (621), System Suitability.)

**Mode:** LC

**Detector:** UV-Vis 420 nm

**Column:** 4.6-mm × 20-cm; 5-µm packing L1

**Flow rate:** 1 mL/min

**Injection size:** 20 µL

#### System suitability

**Sample:** Standard solution A

[NOTE—The relative retention times for the curcumin, desmethoxycurcumin, and bisdesmethoxycurcumin peaks are about 1.0, 1.2, and 1.4, respectively.]

#### Suitability requirements

**Chromatogram similarity:** The chromatogram from Standard solution A is similar to the Reference Chromatogram provided with the lot of USP Curcuminoids RS being used.

**Resolution:** NLT 2.0 between the curcumin and desmethoxycurcumin peaks and the desmethoxycurcumin and bisdesmethoxycurcumin peaks

**Tailing factor:** NMT 1.5 for the bisdesmethoxycurcumin, desmethoxycurcumin, and curcumin peaks

**Relative standard deviation:** NMT 2.0% for desmethoxycurcumin peak, in repeated injections

#### Analysis

**Samples:** Standard solution A, Standard solution B, Standard solution C, Standard solution D, and Sample solution

Calculate the quantity, in mg, of curcumin, desmethoxycurcumin, and bisdesmethoxycurcumin in each Tablet:

$$\text{Result} = (r_u/r_s) \times C_s \times D \times V \times (W_i/W_u)$$

$r_u$  = peak area for curcumin, desmethoxycurcumin, or bisdesmethoxycurcumin from the Sample solution

$r_s$  = peak area for curcumin, desmethoxycurcumin, or bisdesmethoxycurcumin from the appropriate Standard solution

$C_s$  = concentration of the appropriate Standard solution (mg/mL)

$D$  = dilution factor to prepare the Sample solution from the Sample stock solution

$V$  = volume of Sample solution (mL)

$W_i$  = average weight of Tablets (mg)

$W_u$  = weight of Tablets powder taken to prepare the Sample stock solution (mg)

Calculate the percentage of the labeled amount of curcuminoids in the Tablet:

$$\text{Result} = (\Sigma Q/L) \times 100$$

$\Sigma Q$  = sum of the quantities of curcumin, desmethoxycurcumin, and bisdesmethoxycurcumin in the Tablet (mg)

$L$  = labeled amount of curcuminoids (mg/Tablet)

148

THP 2018

## ยาแคปซูลขมิ้นชัน (KHAMIN CHAN CAPSULES)

Turmeric Capsules

**Category** Stomachic, carminative.

**Turmeric Capsules** contain an amount of powdered Turmeric equivalent to not less than 80.0 per cent of the labelled amount of volatile oil and not less than 90.0 per cent of the labelled amount of curcuminoids, calculated as curcumin ( $C_{21}H_{20}O_6$ ).

### Assay

**FOR VOLATILE OIL** Grind the contents of not less than 20 Turmeric Capsules to fine powder. Transfer about 10 g, accurately weighed, to a 500-ml round-bottomed flask. Use 100 ml of water as the distillation liquid and distil at a rate of 2 to 3 ml per minute for 5 hours. Use 2.0 ml of xylene in the graduated tube (Appendix 7.3H). Calculate the content of volatile oil, in ml, in the portion of the Capsules taken with reference to the anhydrous substance.

**FOR CURCUMINOIDS** Carry out the determination as described in the "Ultraviolet and Visible Spectrophotometry" (Appendix 2.2).

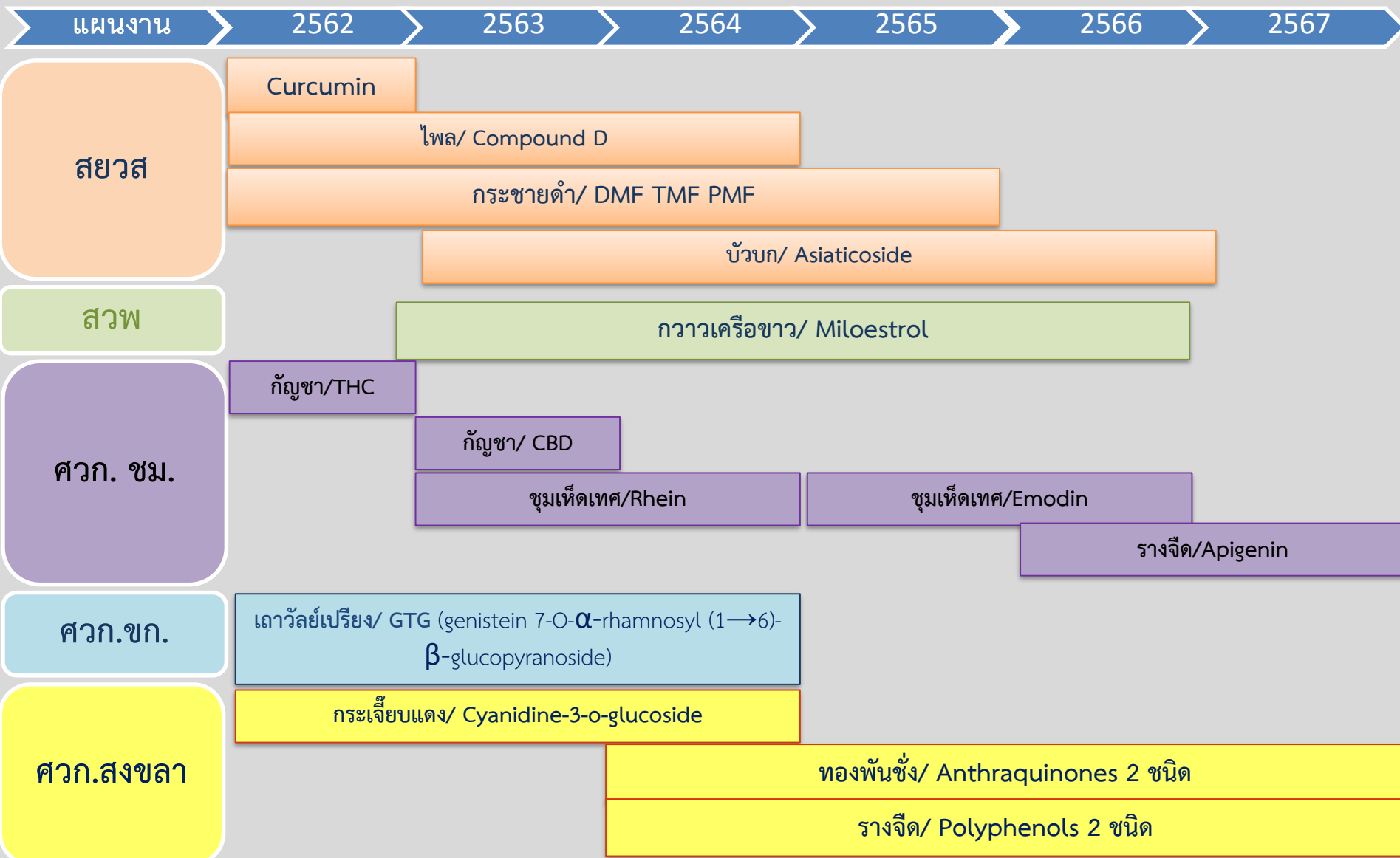
**Standard curcumin solution** Dissolve an accurately weighed quantity of curcumin in methanol. Dilute quantitatively with methanol to obtain a solution having a known concentration of about 400 µg of curcumin per ml.

**Standard curcumin curve** Transfer into five 10-ml volumetric flasks, 20, 40, 50, 60, and 80 µl of Standard curcumin solution, dilute to volume with methanol, and mix. Measure the absorbances of the standard solutions at the maximum at about 420 nm, using methanol as the blank. Plot the readings and draw the curve of best fit.

**Assay preparation** Weigh and mix the contents of not less than 20 Turmeric Capsules. Transfer about 400 mg, accurately weighed, to a stoppered centrifuge tube. Add 10.0 ml of tetrahydrofuran and mix. Set aside at room temperature for 24 hours with frequent shaking. Dilute 1.0 ml of the clear supernatant liquid with methanol to produce 25.0 ml. Transfer 1.0 ml of this solution into a 50-ml volumetric flask, dilute to volume with methanol and mix well.

**Procedure and Calculation** Measure the absorbance of Assay preparation at the maximum at about 420 nm, using methanol as the blank. By reference to the Standard curcumin curve, calculate the content of curcuminoids as curcumin ( $C_{21}H_{20}O_6$ ) in the portion of the Capsules taken.

# โครงการบูรณาการการผลิตสารมาตรฐานสมุนไพร





## การจัดทำสารมาตรฐานสมุนไพร DMScRS

### สารมาตรฐานสำหรับหาปริมาณ

(5-10 g)

- งบประมาณที่ใช้ ประมาณ 1 ล้านบาท
- พัฒนาวិธีการสกัดและการทำให้บริสุทธิ์
- เพิ่มปริมาณสารบริสุทธิ์
- พัฒนาวิธีวิเคราะห์ / method validation / ตรวจวิเคราะห์คุณภาพวัตถุดิบเบื้องต้น
- ทดสอบ Homogeneity / Stability / ให้ค่า assign value

### สารมาตรฐานสำหรับพิสูจน์เอกลักษณ์

(3-5 g)

- งบประมาณที่ใช้ ประมาณ 5 แสนบาท
- พัฒนาวิธีการสกัดและการทำให้บริสุทธิ์
- เพิ่มปริมาณสารบริสุทธิ์
- ตรวจวิเคราะห์คุณภาพวัตถุดิบ



ราคาสารมาตรฐานกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์

| ลำดับ<br>ที่ | ผู้ผลิต                                     | ประเภทสารมาตรฐาน                               | จำนวน/ปริมาณ<br>ต่อขวด | ราคาต่อขวด<br>(บาท) | ราคาเฉลี่ย USP<br>(บาท) |
|--------------|---------------------------------------------|------------------------------------------------|------------------------|---------------------|-------------------------|
| 1            | ศูนย์สาร<br>มาตรฐาน<br>ยาและวัตถุ<br>เสพติด | สารมาตรฐานยา                                   | 200 - 300 มก.          | 2,000 – 3,000       | 10,000                  |
| 2            |                                             | สารมาตรฐานยาเสพติดและวัตถุออกฤทธิ์ต่อจิตประสาท | 50 - 200 มก.           | 3,000 - 5,000       | 50,000                  |
| 3            |                                             | สารมาตรฐานสมุนไพร                              | 30 - 100 มก.           | 3,000 - 10,000      | 15,000                  |
| 4            |                                             | สารมาตรฐาน ประเภทสารสลายตัว/<br>ปนเปื้อน       | 30 - 100 มก.           | 3,000 - 10,000      | 30,000                  |