

# Analysis of high-value compounds that against SARS-CoV-2 in *Andrographis paniculate* and *Boesenbergia rotunda* extracted

Extraction, separation, and purification

Wattanapong Sittisaree

Field application specialist (CIA and DxS)

**Supelco**®

Analytical Products

**MERCK**

# Supelco®

Analytical Products



## Agenda

- Effect of *Andrographis paniculate* and *Boesenbergia rotunda* extracted on Sar-CoV2
- Analysis of *Andrographis paniculate* extracted by TLC and HPLC method
- Analysis of *Boesenbergia rotunda* extracted by TLC and HPLC method
- Promotion and special offer

**MERCK**

**Effect of *Andrographis paniculate* and  
*Boesenbergia rotunda* extracted on Sar-CoV2**



# Effect of *Andrographis paniculate* extracted on Sar-CoV2 In vitro study in Thailand



## Anti-SARS-CoV-2 Activity of *Andrographis paniculata* Extract and Its Major Component Andrographolide in Human Lung Epithelial Cells and Cytotoxicity Evaluation in Major Organ Cell Representatives

Khanit Sa-ngiamsuntorn,<sup>#</sup> Ampa Suksatu,<sup>#</sup> Yongyut Pewkliang, Piyanoot Thongsri, Phonthon Kanjanasirirat, Suwimon Manopwisedjaroen, Sitthivut Charoensuththivarakul, Patompon Wongtrakoongate, Supaporn Pitiporn, Jarinya Chaopreecha, Supasek Kongsomros, Kedchin Jearawuttanakul, Warawuth Wannalo, Phisit Khemawoot, Somchai Chutipongtanate, Suparek Borwornpinyo,\* Arunee Thitithanyanont,\* and Suradej Hongeng

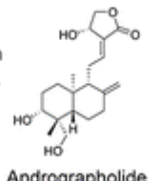
Cite This: *J. Nat. Prod.* 2021, 84, 1261–1270

Read Online



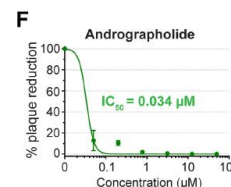
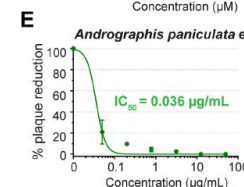
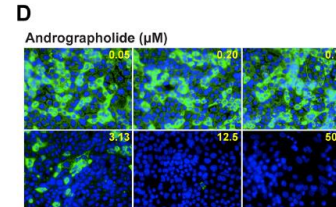
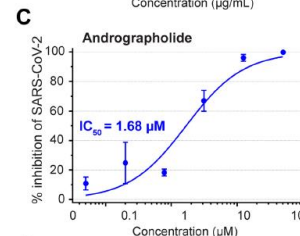
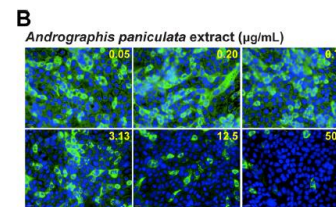
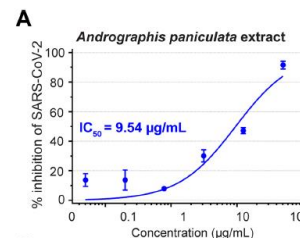
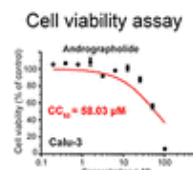
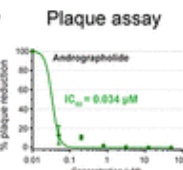
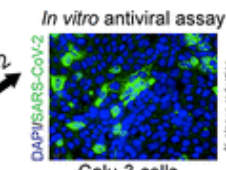
*Andrographis paniculata*

Extraction



Anti-SARS-CoV-2

Cytotoxicity



**IC<sub>50</sub> against SARS-CoV-2 in Calu-3**

- *A. paniculata* extract = 0.036  $\mu\text{g/mL}$
- Andrographolide = 0.034  $\mu\text{M}$

**CC<sub>50</sub> in Calu-3**

- *A. paniculata* extract >100  $\mu\text{g/mL}$
- Andrographolide = 58.03  $\mu\text{M}$

**CC<sub>50</sub> in HepG2**

- *A. paniculata* extract >100  $\mu\text{g/mL}$
- Andrographolide = 81.52  $\mu\text{M}$

**CC<sub>50</sub> in imHC**

- *A. paniculata* extract >100  $\mu\text{g/mL}$
- Andrographolide = 44.55  $\mu\text{M}$

**CC<sub>50</sub> in SH-SY-5Y**

- *A. paniculata* extract >100  $\mu\text{g/mL}$
- Andrographolide = 13.19  $\mu\text{M}$

**CC<sub>50</sub> in HK-2**

- *A. paniculata* extract >100  $\mu\text{g/mL}$
- Andrographolide = 34.11  $\mu\text{M}$

**CC<sub>50</sub> in Caco-2**

- *A. paniculata* extract >100  $\mu\text{g/mL}$
- Andrographolide = 52.30  $\mu\text{M}$

- This study demonstrated anti-SARS-CoV-2 activity of *A. paniculata* and andrographolide using a Calu-3- based anti-SARS-CoV-2 assay.
- Potent anti-SAR-CoV-2 activities, together with the favorable cytotoxicity profiles, support further development of *A. paniculata* extract and especially andrographolide as a monotherapy or in combination with other effective drugs against SARS-CoV-2 infection.

Ministry of Health approve to use *Andrographis paniculate* extracted in COVID-19 patient

**ฟ้าทะลายโจร รักษาโควิด-19 ได้หรือไม่ ?**

คลายข้อข้องใจ Q&A

ฟ้าทะลายโจร มีแนวโน้มเป็นทางเลือกในการรักษาอาการโควิด-19 ที่ไม่รุนแรง ภายใต้การดูแลของแพทย์

ศึกษาเปรียบเทียบระหว่างกลุ่มผู้ป่วยโควิด-19 ที่ไม่ได้รับการยาฟ้าทะลายโจรจะมีโอกาสปอดอักเสบ 14.64 % ส่วนผู้ป่วยที่ได้รับยาฟ้าทะลายโจร มีโอกาสปอดอักเสบ 0.97 %

พญ.อินพร เญญงพลพิทักษ์  
อธิบดีกรมการแพทย์แผนไทยและการแพทย์ทางเลือก

ข้อมูล ณ วันที่ 1 พฤษภาคม 2564 | ศูนย์ข้อมูล COVID-19 | สายด่วน 1111



**ฟ้าทะลายโจร ใช้อย่างไรให้ปลอดภัย**

กรมการแพทย์แผนไทยและการแพทย์ทางเลือก  
Department of The Traditional and Alternative Medicine

**1 พวงฟ้าทะลายโจร**

รูปแบบแคปซูล  
รูปแบบยาเม็ด

ขนาด 350 - 400 มก./แคปซูลหรือเม็ด  
รับประทานครั้งละ 4 แคปซูลหรือเม็ด  
วันละ 4 ครั้ง หลังอาหารและก่อนนอน  
(ได้ปริมาณผงยาประมาณ 6,000 มก./วัน)

**2 สารสกัดฟ้าทะลายโจร**

รูปแบบแคปซูล  
รูปแบบยาเม็ด

ขนาด 9 - 10 มก. รับประทานครั้งละ 2 แคปซูลหรือเม็ด  
ขนาด 20 มก. รับประทานครั้งละ 1 แคปซูลหรือเม็ด  
วันละ 3 ครั้ง หลังอาหาร  
(ได้ปริมาณผงยาประมาณ 60 มก./วัน)

ขนาดใช้ของแคปซูลฟ้าทะลายโจรทั้งสองรูปแบบ ให้แอนโดรกราโฟไลด์ ประมาณ 60 มก./วันเหมือนกัน

**ข้อเตือน**

- ไม่ควรใช้ในผู้ที่มีอาการแพ้ฟ้าทะลายโจร
- ไม่ควรใช้ในหญิงตั้งครรภ์ และหญิงให้นมบุตร
- ควรระวังการใช้ยาร่วมกับยารักษาวัณโรค, ยาต้านไวรัส, ยาต้านเชื้อรา, ยาต้านมะเร็ง, ยาต้านการแข็งตัวของเลือด

ติดต่อ: 0-2952-3000 | Call Center 02 951 5007 | กรมการแพทย์แผนไทยและการแพทย์ทางเลือก | @DIAM /

ผลิตและเผยแพร่โดย ศูนย์งานวิจัยสารออกฤทธิ์



# Effect of *Boesenbergia rotunda* extracted on Sar-CoV2

## In vitro study in Thailand

### scientific reports

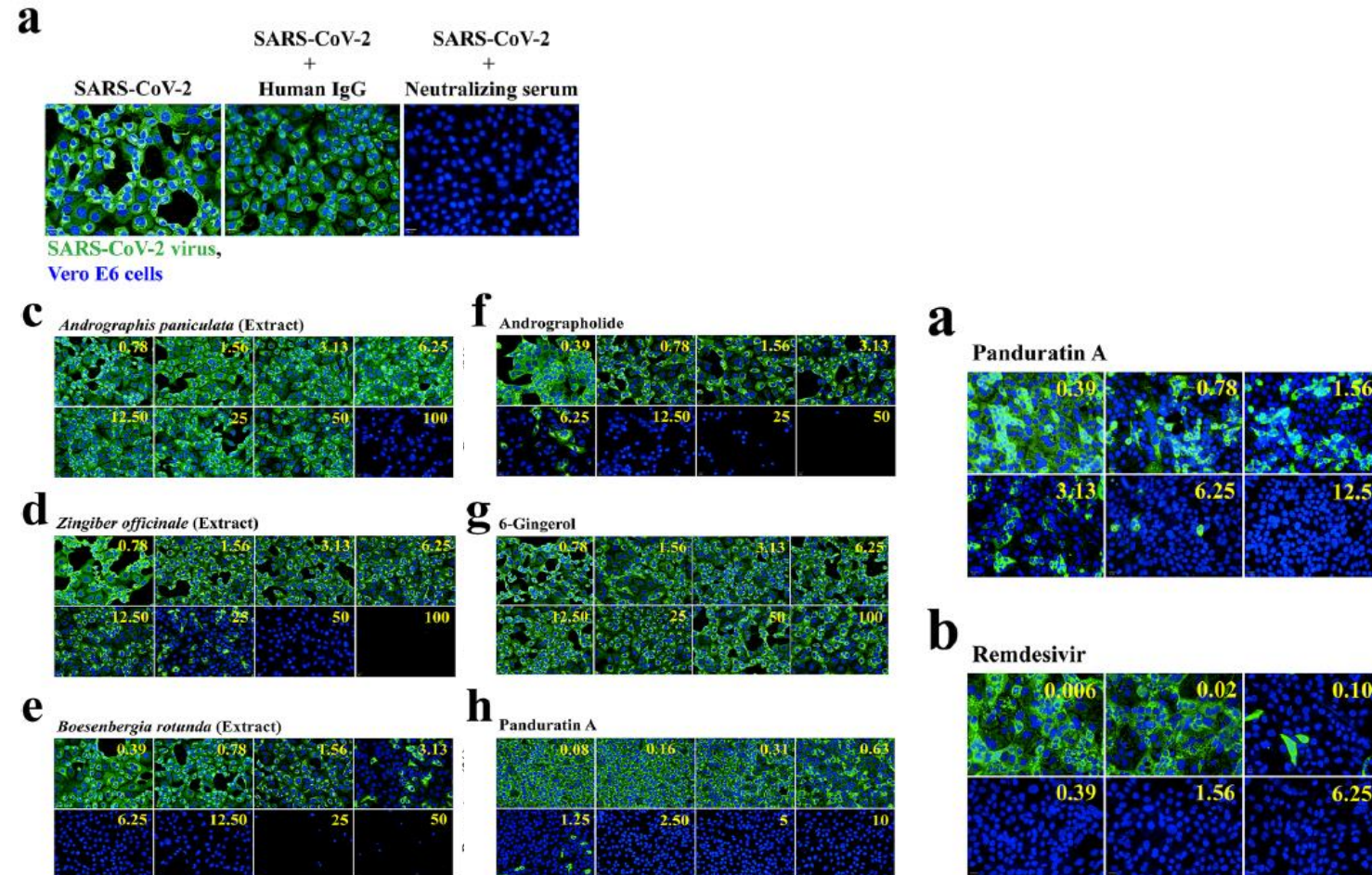
OPEN

#### High-content screening of Thai medicinal plants reveals *Boesenbergia rotunda* extract and its component Panduratin A as anti-SARS-CoV-2 agents

Phongthon Kanjanasirirat<sup>1,14</sup>, Ampa Suksatu<sup>2,14</sup>, Suwimon Manopwisedjaroen<sup>2</sup>, Bamroong Munyoo<sup>2</sup>, Patoomratana Tuchinda<sup>1,3</sup>, Kedchin Jearawuttanakul<sup>1</sup>, Sawinee Seemakhan<sup>1</sup>, Sitthivut Charoensuthivarakul<sup>1,4,9</sup>, Patompon Wongtrakongate<sup>5,9</sup>, Noppawan Rangkasenee<sup>1</sup>, Supaporn Pitiporn<sup>7</sup>, Neti Waranuch<sup>1</sup>, Napason Chabang<sup>6</sup>, Phisit Khemawoot<sup>10</sup>, Khanit Sa-ngiamsuntorn<sup>11</sup>, Yongyut Pewkliang<sup>12</sup>, Piyanoot Thongsri<sup>12</sup>, Somchai Chutipongtanate<sup>13</sup>, Suradej Hongeng<sup>1,13</sup>, Suparek Borwornpinyo<sup>1,6,8</sup> & Arunee Thitithanyanont<sup>2,8</sup>

- Taken together, we identified *B. rotunda* extract and its active compound, panduratin A, as the promising anti-SARS-CoV-2 agents by using the high-content imaging system coupled with the plaque reduction assay.
- Importantly, *B. rotunda* extract and panduratin A exhibited the potent antiviral efficacy in Vero E6 cells when the treatment was performed after SARS-CoV-2 infection

Check for updates



# Analysis of *Andrographis paniculate* by TLC and HPLC method

2

# Analysis of *Andrographis paniculate* by TLC and HPLC method

## Collection, extraction, and identification

### การเตรียมตัวอย่างตัวอย่างสมุนไพรฟ้าทะลายโจรส่วนใบและลำต้นอบแห้ง

- นำตัวอย่างฟ้าทะลายโจรมาล้างทำความสะอาด ผึ่งแห้งที่อุณหภูมิห้อง 24 ชั่วโมง
- ชั่งตัวอย่าง 5 กรัม ใส่ในห่อกระดาษ ขนาด 5 x 5 cm.
- นำไปอบแห้งที่ อุณหภูมิ 40 - 50 C ประมาณ 18 ชั่วโมง
- นำมาลดขนาดด้วยการบด
- เก็บในถุงพลาสติกแห้งในห้องปรับอากาศ นามาใช้ในระยะเวลาไม่เกินกว่า 1 สัปดาห์

### ตัวอย่างสมุนไพรฟ้าทะลายโจรชนิดแคปซูล

นำผงยาภายในแคปซูล (1 แคปซูล มีฟ้าทะลายโจร 400 มิลลิกรัม) จำนวน 4 แคปซูลผสมรวมกันแล้วนำไปชั่งปริมาณ 1 กรัม



### Collection

Andrographis Herb shall be kept in well-closed containers, protected from light, and stored in a dry place. It should be used within 1 year and air-dried every 2 to 3 months.

### Extraction

To about 1 g of the sample, in powder, add 20 mL of ethanol, boil in a water-bath and filter. To the filtrate, add 300 mg of decolorizing charcoal, stir and filter (solution 1).

### Identification

To 1 mL of solution 1, add 2 drops of a 2 per cent w/v solution of 3,5-dinitrobenzoic acid in methanol and 2 drops of a 5.7 per cent w/v solution of potassium hydroxide in methanol: a purplish red colour develops.

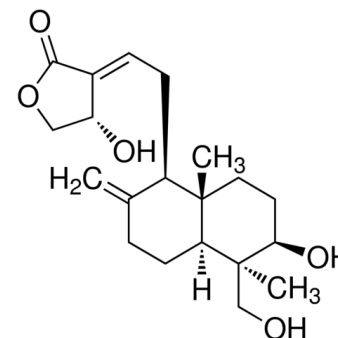


# Analysis of *Andrographis paniculate* by TLC and HPLC method

## Thin layer chromatography method

- Silica gel GF254 as the coating substance and a mixture of 85 volumes of Chloroform and 15 volumes of absolute ethanol as the mobile phase.
- Apply separately to the plate, 5 µL each of the following solutions. Prepare solution (A) by boiling 1 g of the sample, in powder, with 20 mL of Ethanol on a water-bath for 5 minutes, adding 300 mg of decolorizing charcoal stirring, and filtering.
- Evaporate the filtrate under reduced pressure to dryness and dissolve the residue in 1 mL of warm ethanol (80 per cent).
- For standard, dissolve 2 mg of andrographolide in 1 ml of ethanol
- After removal of the plate, allow it to dry in air and examine under ultraviolet light (254 nm), marking the quenching spots
- Spray the plate with a 2 per cent w/v solution of 3,5-dinitrobenzoic acid in Methanol and then with an excess of a 5.7 per cent w/v solution of potassium hydroxide in Methanol ; the spot due to andrographolide is dark violet.

90281 Andrographolide



# Analysis of *Andrographis paniculate* by TLC and HPLC method Chromatogram

Table 1 hR<sub>f</sub> Values of Components in Ethanolic Extract of the Aerial Parts of *Andrographis paniculata* (Burm. f.) Nees

Spot	hR <sub>f</sub> Value	Detection	
		UV 254	3,5-Dinitrobenzoic Acid/ Potassium Hydroxide in Methanol
1	1-5	-	dark violet
2	11-15	quenching	violet
3	18-22	quenching	violet
4*	28-32	-	dark violet
5	49-51	-	violet
6**	52-56	quenching	dark violet
7	57-59	quenching	violet
8	66-68	-	violet
9***	69-71	quenching	dark violet

\*neoandrographolide

\*\*andrographolide

\*\*\* dehydroandrographolide

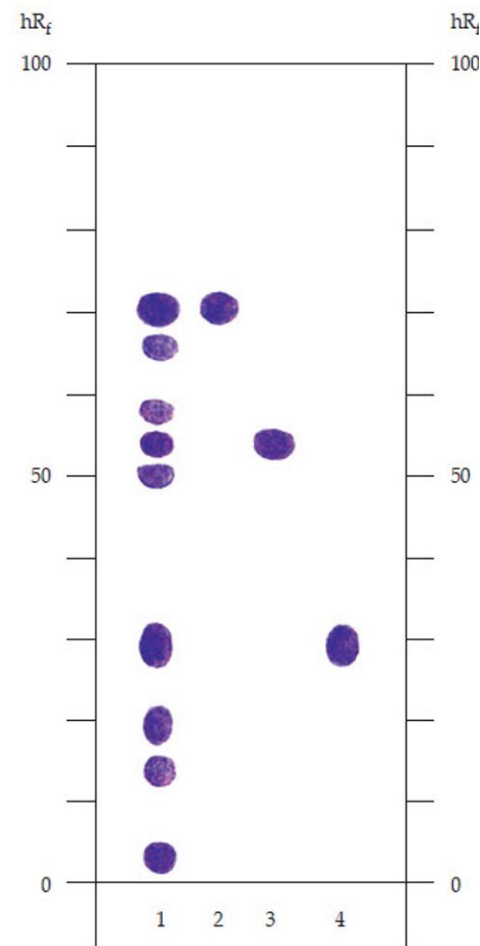


Fig. 3 Thin-Layer Chromatogram of Ethanolic Extract of the Aerial Parts of *Andrographis paniculata* (Burm. f.) Nees, Detected with 3,5-Dinitrobenzoic Acid/Potassium Hydroxide in Methanol

- 1 = solution (A)
- 2 = a 0.4 per cent w/v solution of dehydroandrographolide in ethanol
- 3 = solution (B)
- 4 = a 0.2 per cent w/v solution of neoandrographolide in ethanol

## Standard and sample preparation for HPLC analysis

### Standard preparations

- Dissolve an accurately weighed quantity of andrographolide in sufficient methanol and dilute with Mobile phase to obtain a stock solution having a known concentration of about 200 µg per mL.
- Dilute this solution quantitatively, and stepwise with Mobile phase to obtain six solutions having known concentrations of 20, 40, 60, 80, 100, and 140 µg per mL.

### Sample preparation

- Reflux about 400 mg of Andrographis Herb, in fine powder, accurately weighed, with 50 mL of a mixture of equal volumes of dichloromethane and methanol in a water-bath for 30 minutes.
- Filter and evaporate the filtrate at 50° under reduced pressure to dryness. Dissolve the residue in sufficient methanol, transfer quantitatively to a 100-mL volumetric flask, dilute with Mobile phase to volume, and mix.
- Filter through a nylon membrane having a 0.45-µm porosity.

# Analysis of *Andrographis paniculate* by TLC and HPLC method

## HPLC condition by general C18

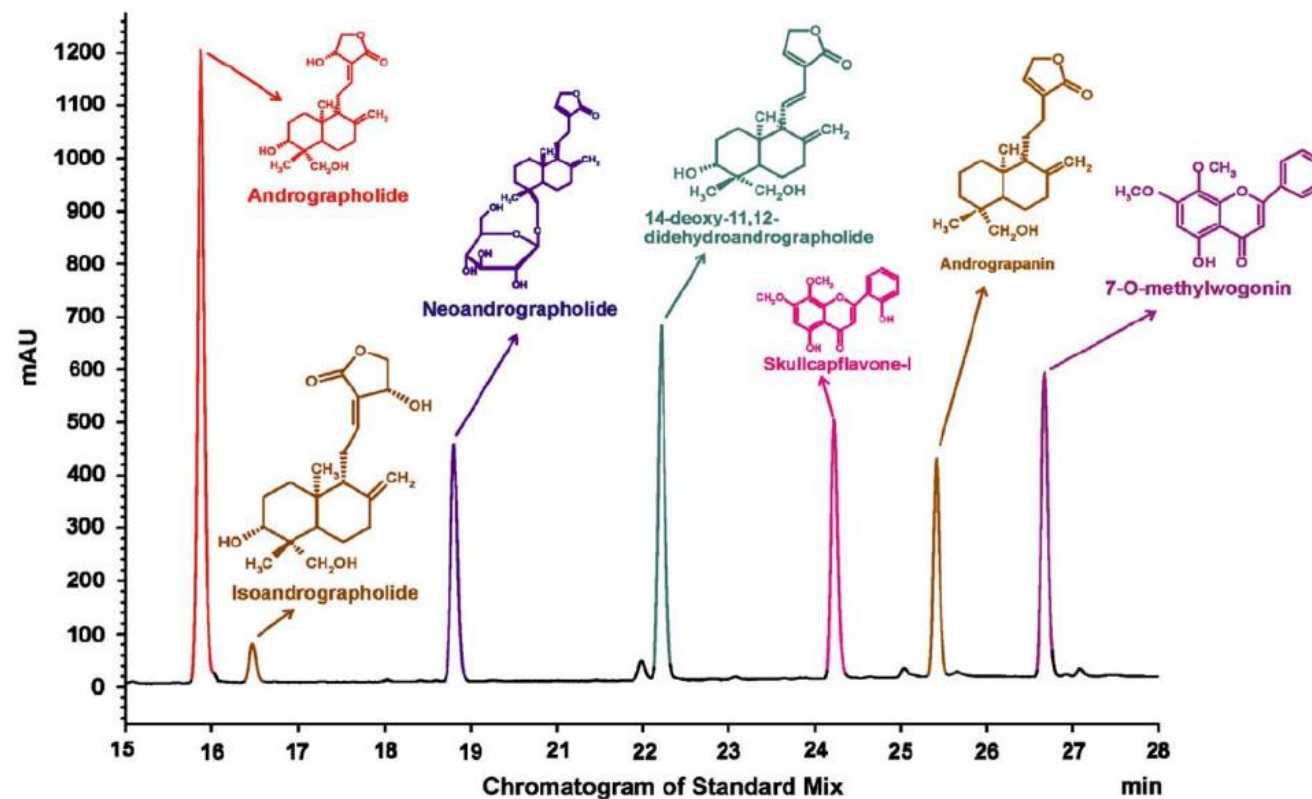
Running solvent A: Phosphate buffer [prepared By dissolving 0.136 g of (KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>) in 900 ml of water and 0.5ml of H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>) then the final volume was made up to 1000 ml]

Running solvent B: Acetonitrile

Detection: UV 223 nm

Flow rate: 1.5 mL/min

Running condition: Gradient condition



Ref A randomized doubleblind placebo controlled clinical evaluation of extract of *Andrographis paniculata* (KalmCold™) inpatients with uncomplicated upper respiratory tract infection

	Solvent A	Solvent B
<b>0 min</b>	95%	5%
<b>18 min</b>	55%	45%
<b>25 min</b>	20%	80%
<b>28 min</b>	20%	80%

# Analysis of *Andrographis paniculate* by TLC and HPLC method

## HPLC condition by Special C18 (Fast method)

Running solvent A: Water

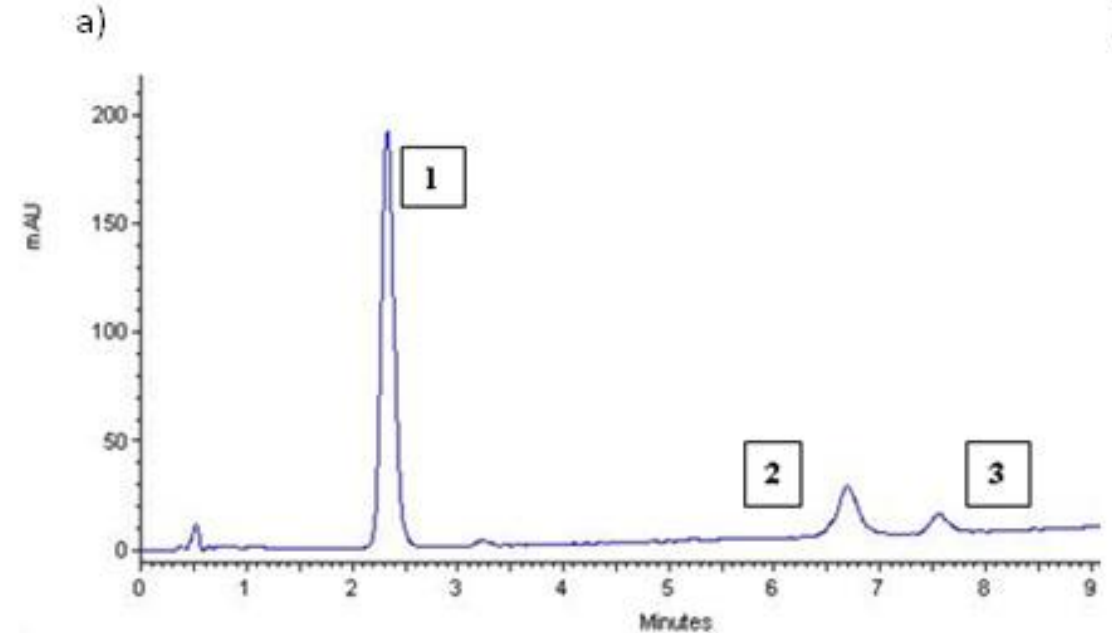
Running solvent B: Methanol

Detection: UV 220 nm

Flow rate: 3 mL/min

Running condition: Gradient condition

	Solvent A	Solvent B
<b>0 min</b>	40%	60%
<b>9 min</b>	51%	49%
<b>10 min</b>	40%	60%



andrographolide 1, didehydroandrographolide 2 and neoandrographiside 3.

**Ref** Quantitative Determination of Andrographolide and Related Compounds in *Andrographis paniculate* Extracts and Biological Evaluation of Their Anti-Inflammatory Activity



**Analysis of *Boesenbergia rotunda*  
extracted by TLC and HPLC method**

3

## Extraction, Standard preparation, and TLC method

### Extraction

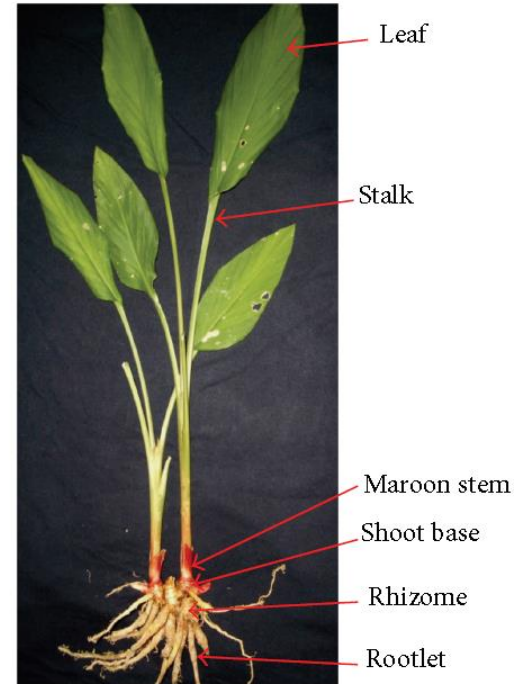
*B. rotunda* root was dried and ground into powder. The powders were exhaustively extracted with dichloromethane using Soxhlet apparatus. The extract yields were weighed and recorded.

### Standard

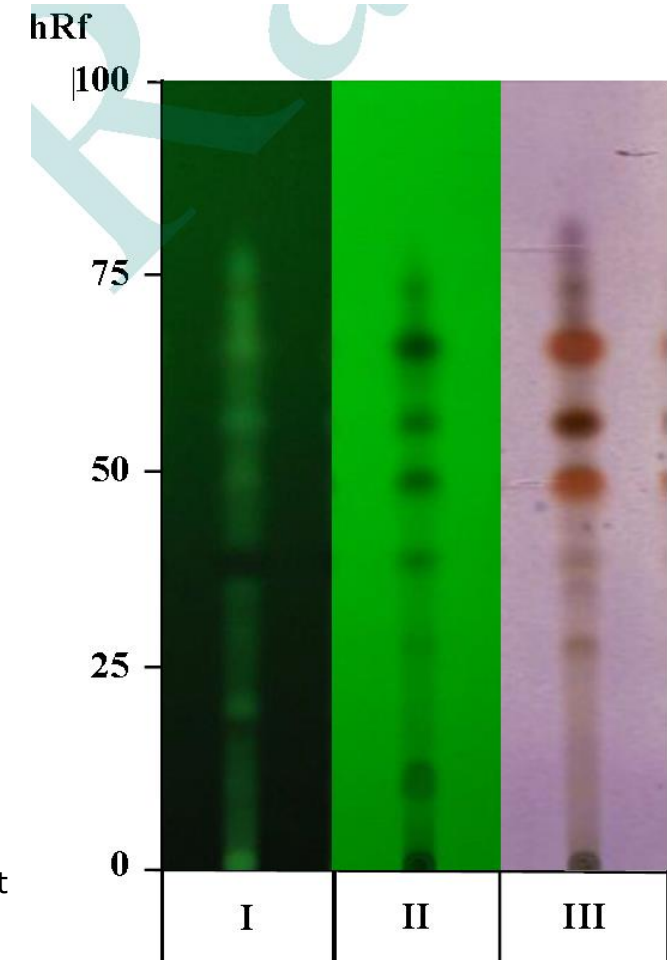
Two microliter of standard pinocembrin solutions were applied (0.4, 0.8, 1.2, 1.8 and 2.0 µg/ml)

### TLC analysis

One g of the sample was macerated in powder, with 10 ml of 95% ethanol for 6 hours, and filtered and evaporated to dryness. The residue was dissolved in 1 ml of 95% ethanol. Apply 3-5 µl was applied to the TLC plate, using silica gel F254 as the coating substance.



I = detection under UV light 254 nm  
II = detection under UV light 365 nm  
III = detection with anisaldehyde staining reagent



Ref Pharmacognostic Specification and Pinocembrin Content of *Boesenbergia rotunda* Root

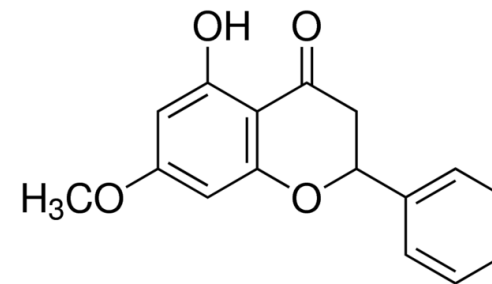
## Extraction and standard preparation

### Extraction

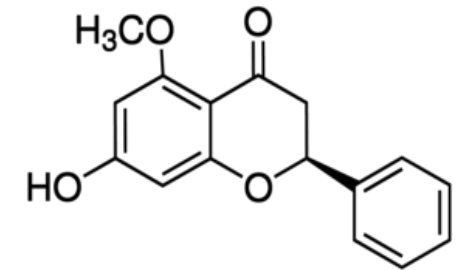
- 1) For the extraction of five selected flavonoids, rhizomes from suspension cultures were oven dried at 38 °C and pulverized.
- 2) Powdered samples (1.0 g) were soaked in 100 ml of methanol for 72 h and filtered through a Whatman No. 1 filter paper.
- 3) The filtrates were concentrated using a rotary evaporator (BÜCHI Rotavapor R-114).
- 4) The slurry residue was then partitioned against an equal volume of ethyl acetate and water.
- 5) Ethyl acetate fraction was again evaporated.
- 6) The mass of the partitioned ethyl acetate extract was recorded and re-dissolved in methanol at a ratio of 1.0 mg of extract to 0.2 ml methanol.
- 7) This methanolic solution of the extract was filtered through 0.45 µm PTFE filter (Sartorius 13 CR) prior to HPLC injection.

### Standard preparation

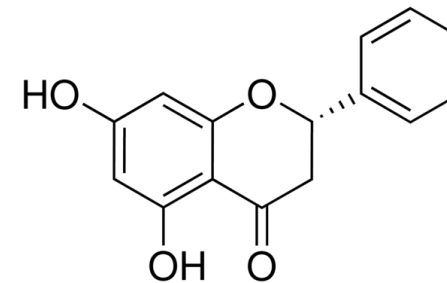
Quantification of alpinetin, pinocembrin, cardamonin, pinostrobin and panduratin A in the extracts was done using a standard calibration method applicable within the range of 0.002 to 1.0 µg.



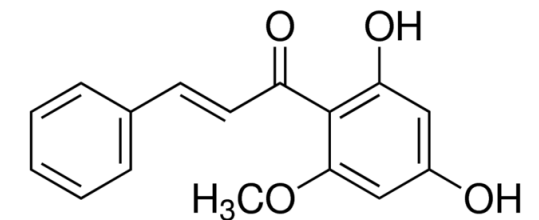
38790 (±)-Pinostrobin



PHL89849 Alpinetin

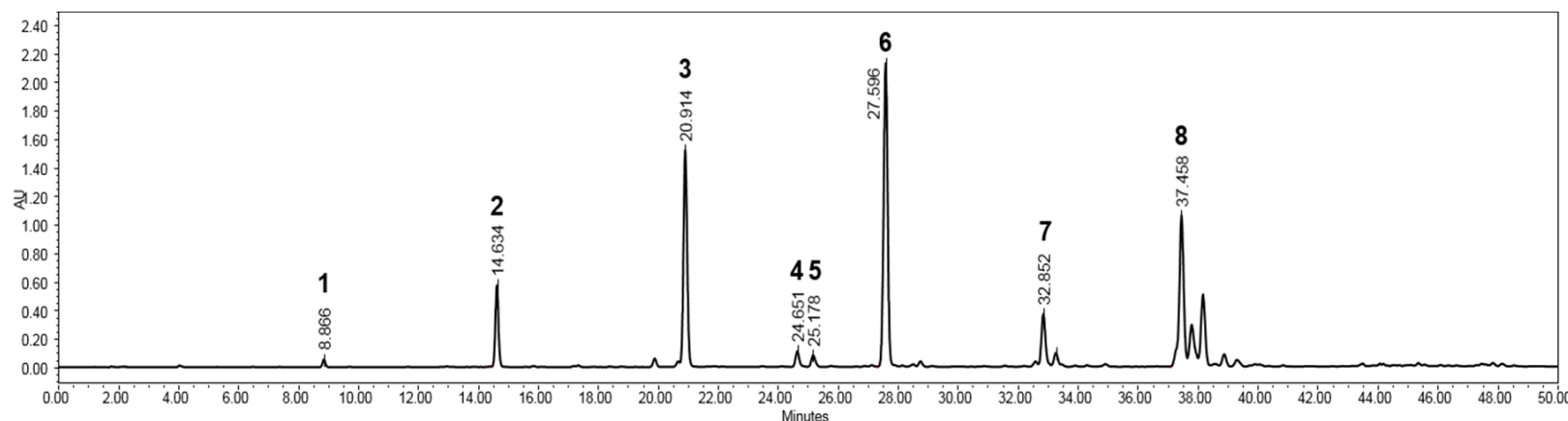


P5239 Pinocembrin



C8249 Cardamonin

## HPLC condition by general C18



naringenin 5-methyl ether (1), alpinetin (2), pinocembrin (3), cardamonin (4), pinostrobin chalcone (5), pinostrobin (6), 4-hydroxypanduratin A (7) and panduratin A (8)

**Ref** Vasorelaxant Effect of *Boesenbergia rotunda* and Its Active Ingredients on an Isolated Coronary Artery

Running solvent A: 0.1% HCOOH-containing water

Running solvent B: Acetonitrile

Detection: UV 300 nm

Flow rate: 1 mL/min

Running condition: Gradient condition

	Solvent A	Solvent B
<b>0 min</b>	80%	20%
<b>40 min</b>	10%	90%
<b>50 min</b>	10%	90%
<b>55 min</b>	80%	20%

## HPLC condition

Running solvent A: 0.1% phosphoric acid

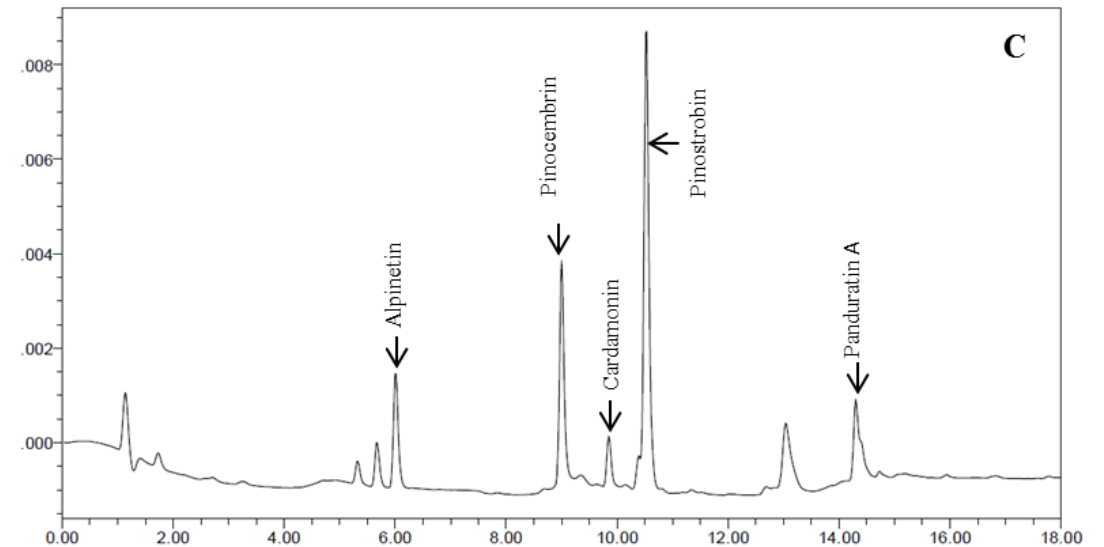
Running solvent B: Acetonitrile

Detection: UV 220 nm

Flow rate: 3 mL/min

Running condition: Gradient condition

	Solvent A	Solvent B
<b>0 min</b>	80%	20%
<b>4.5 min</b>	65%	35%
<b>5 min</b>	40%	60%
<b>8 min</b>	0%	100%
<b>16 min</b>	80%	20%
<b>18 min</b>	80%	20%



**Ref** Existence of bioactive flavonoids in rhizomes and plant cell cultures of *Boesenbergia rotunda* (L.) Mansf. Kulturpfl



# PROMOTION AND SPECIAL OFFER

4

# CIA focus seminar 2

## Promotion

### สำหรับงานฟ้าทะลายโจร

581325-U ASCENTIS C18 5UM 25CMX4.6MM HPLC COLUMN 13,900 บาท

581373-U KIT, ASCENTIS C18 5UM 2CMX4.0MM GUARD& 9,500 บาท

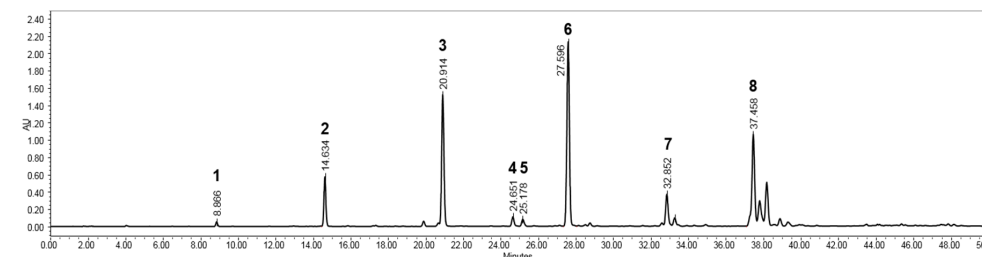
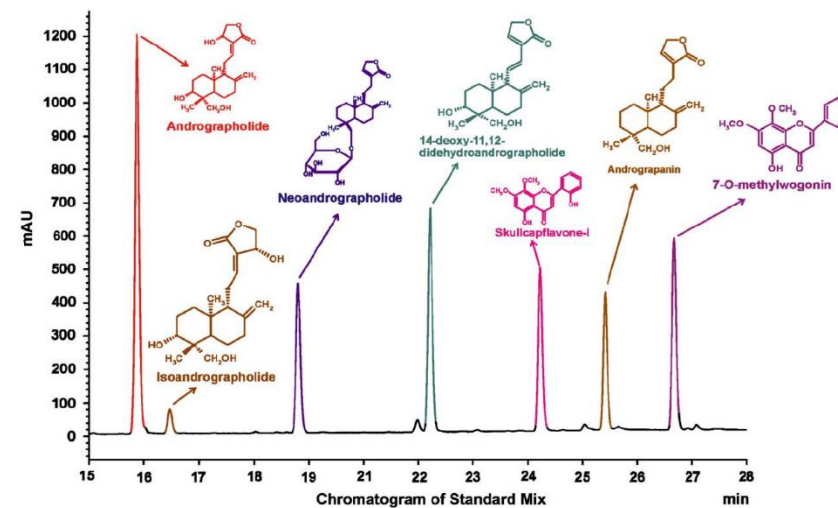
พิเศษ ซื่อ คอลัมน์พร้อมการ์ดคู่มือ ลดเหลือ 19,900 บาท

### สำหรับงานกระชายขาว

581324 -U ASCENTIS C18 5UM 15CMX4.6MM HPLC COLUMN 13,900 บาท

581373-U KIT, ASCENTIS C18 5UM 2CMX4.0MM GUARD& 9,500 บาท

พิเศษ ซื่อ คอลัมน์พร้อมการ์ดคู่มือ ลดเหลือ 19,900 บาท



## CIA focus seminar 2

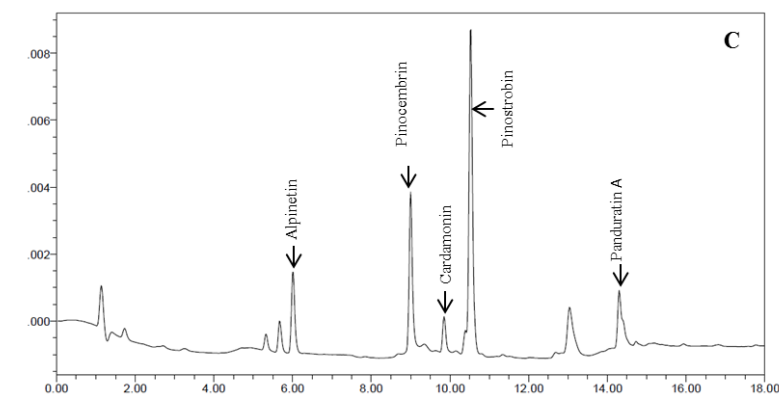
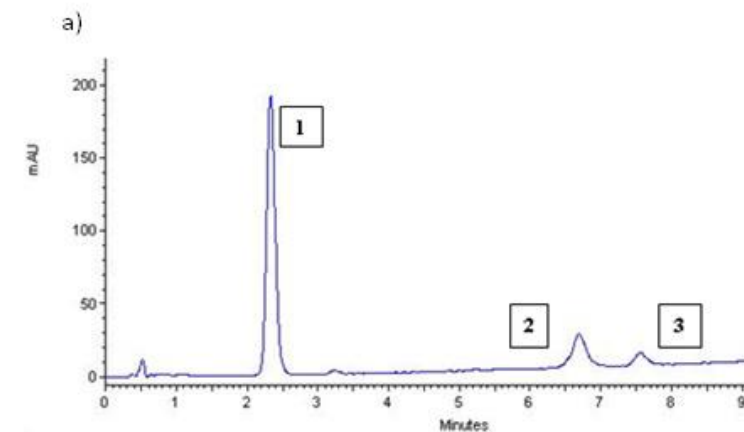
### Promotion

ราคาพิเศษ เฉพาะคอลัมน์ แห่งเดียว

Code	Product description	Special price
102129.000	Chromolith® Performance RP-18 endcapped 100-4.6	16,990
1	HPLC column	

ราคาพิเศษ ซื้อมารวม Guard column set ลด ราคาคอลัมน์ เพิ่ม 5,000 บาท

Code	Product description	Special price
102129.0001	Chromolith® Performance RP-18 endcapped 100-4.6 HPLC column	11,990
152032.0001	Chromolith® 5-4.6 guard cartridge holder	13,180
151451.0001	Chromolith® RP-18 endcapped 5-4.6 guard cartridges (3 pieces)	18,430
	<b>Total</b>	<b>43,600</b>



## SPECIAL THANK FOR ALL

ส่วนลด 15 % สำหรับ สินค้ากลุ่ม Advance Analytical

โดยส่งเป็น code ส่วนลด ทางอีเมลล์ ที่ทุกท่านได้ลงทะเบียนมา (ส่วนลดใช้ได้ถึง 30 กันยายน นี้)

# Cannabis Testing The Series EP 2

Success Story of Cannabinoid Application in  
Medicine, Foods, Beverages, and Cosmetics

โดย

**ภญ. ผกากรอง ขวัญข้าว**

หัวหน้าศูนย์หลักฐานเชิงประจักษ์ด้านการแพทย์แผนไทยและสมุนไพร  
โรงพยาบาลเจ้าพระยาอภัยภูเบศร

11 สิงหาคม 2564 เวลา 14.00 - 15.30 น.

 Zoom Meeting



scan to  
register

สมัครวันนี้ลุ้นรับ  
ของสมนาคุณ จาก  
โรงพยาบาลเจ้าพระยา  
อภัยภูเบศร

“ฟรี”

ท้ายงาน

