

NGHIÊN CỨU XÂY DỰNG VÀ THẨM ĐỊNH PHƯƠNG PHÁP ĐỊNH LƯỢNG ANDROGRAPHOLID TRONG HỆ NANO POLYME BẰNG PHƯƠNG PHÁP SẮC KÝ LỎNG HIỆU NĂNG CAO

Nguyễn Hoàng Hiệp¹, Hồ Bá Ngọc Minh¹, Đặng Trường Giang¹
Vũ Bình Dương¹, Phạm Văn Hiến¹, Nguyễn Trọng Điệp^{1*}

Tóm tắt

Mục tiêu: Xây dựng và thẩm định phương pháp định lượng Andrographolid trong hệ nano polyme bằng phương pháp sắc ký lỏng hiệu năng cao (high performance liquid chromatography - HPLC). **Phương pháp nghiên cứu:** Khảo sát các điều kiện sắc ký. Thẩm định phương pháp định lượng theo hướng dẫn của ICH về tính tương thích hệ thống, độ đặc hiệu, khoảng tuyến tính, độ đúng, độ chính xác, giới hạn phát hiện và giới hạn định lượng dưới. **Kết quả:** Đã xác định được các điều kiện sắc ký. Phương pháp định lượng có sự tương quan tuyến tính giữa diện tích pic và nồng độ Andrographolid (AG) trong khoảng nồng độ từ 5 - 30 µg/mL với hệ số tương quan $R^2 = 0,9981$, độ lặp lại với RSD = 0,1492%, độ đúng trong khoảng từ 99,91 - 102,77%, giới hạn phát hiện 0,4 µg/mL, giới hạn định lượng 1,2 µg/mL. **Kết luận:** Đã xây dựng được phương pháp HPLC để định lượng Andrographolid trong hệ nano polyme, làm cơ sở cho các nghiên cứu tiếp theo.

Từ khóa: Andrographolid; Nano polyme; Sắc ký lỏng hiệu năng cao.

DEVELOPMENT AND VALIDATION OF A HIGH PERFORMANCE LIQUID CHROMATOGRAPHY METHOD FOR THE QUANTIFICATION OF ANDROGRAPHOLIDE IN POLYMERIC NANOSYSTEM

Abstract

Objectives: To develop and validate a high performance liquid chromatography method for the quantification of Andrographolid in polymeric nanosystem. **Methods:** Surveying chromatographic conditions validating quantification method, according to ICH guidelines in terms of system suitability, specificity,

¹Trung tâm Nghiên cứu, ứng dụng và sản xuất thuốc, Học viện Quân y

*Tác giả liên hệ: Nguyễn Trọng Điệp (diepvmu@gmail.com)

Ngày nhận bài: 17/8/2023

Ngày được chấp nhận đăng: 25/9/2023

<http://doi.org/10.56535/jmpm.v48.462>

linearity, precision, accuracy, limit of detection, and limit of quantification. **Results:** The chromatographic conditions were determined. The quantitative method shows a close linear correlation between the peak area and Andrographolide concentration in the range of 5 - 30 $\mu\text{g/mL}$ with regression correlation coefficient $R^2 = 0.9981$, good repeatability with $\text{RSD} = 0.1492\%$, good accuracy of 99.91 - 102.77%. The limit of detection is 0.4 $\mu\text{g/mL}$ and the lower limit of quantification is 1.2 $\mu\text{g/mL}$. **Conclusion:** A high-performance liquid chromatography method has been developed to quantify Andrographolide in polymeric nanosystems, serving as a basis for further studies.

Keywords: Andrographolide; Polymeric nanosystem; High performance liquid chromatography.

ĐẶT VẤN ĐỀ

Andrographolid là một diterpen lacton có nhiều trong cây Xuyên Tâm Liên (*Andrographis paniculate* (Burm.f.) Wall.ex Nees), thuộc họ Ô rô (Acanthaceae). Đã có nhiều nghiên cứu khoa học cho thấy Andrographolid và các dẫn chất của nó có nhiều tác dụng dược lý như chống viêm, kháng khuẩn, kháng vi rút, kháng tế bào ung thư, bảo vệ tế bào gan, tác dụng trên hệ tim mạch, thần kinh, giảm mỡ máu, chống tiêu chảy, viêm ruột, nhiễm trùng tiết niệu dưới, viêm da, điều trị bệnh lao, viêm phế quản, viêm xoang, viêm họng hạt, ho gà, viêm phổi, viêm tai giữa... Tuy nhiên, theo hệ thống phân loại sinh dược học (BCS), Andrographolid thuộc nhóm II là nhóm các hoạt chất có độ tan kém và tính thấm tốt. Do có tính thân dầu cao, độ tan trong nước thấp và nhanh chóng bị chuyển hóa nên sinh khả dụng đường

uống của Andrographolid rất thấp [1]. Nhận thấy những lợi ích điều trị tiềm năng của Andrographolid, trong những năm gần đây đã có rất nhiều nghiên cứu khoa học được tiến hành để tìm ra biện pháp cải thiện độ tan, tính thấm, hiệu quả chuyển hóa, thải trừ, thời gian lưu trú... của hoạt chất này. Trong các dạng bào chế được tập trung nghiên cứu của Andrographolid, hệ nano polyme được coi là hiệu quả nhất để tăng sinh khả dụng của dược chất khi dùng đường uống. Để góp phần giải quyết các vấn đề liên quan đến định lượng, xác định hiệu suất nạp thuốc, hiệu suất nano hóa và xác định các thông số giải phóng của hoạt chất Andrographolid từ dạng bào chế trong quá trình nghiên cứu, chúng tôi tiến hành: *Xây dựng và thẩm định phương pháp định lượng Andrographolid trong hệ nano polyme bằng phương pháp sắc ký lỏng hiệu năng cao.*

ĐỐI TƯỢNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

1. Nguyên liệu, dụng cụ, thiết bị

Chất chuẩn Andrographolid (số kiểm soát: ECO122007, hàm lượng 97,8%) được cung cấp bởi Viện Kiểm nghiệm thuốc Trung ương. Andrographolid nguyên liệu (hàm lượng 96,0%). Các nguyên liệu, hoá chất như poly lactic-co-glycolic acid (PLGA), lecithin, dicloromethan (DCM), methanol (MeOH), Tween 80, kali dihydrophosphat (KH_2PO_4) đạt tiêu chuẩn dược dụng, acetonitril (ACN), acid acetic băng, nước cất 2 lần đạt tiêu chuẩn phân tích. Các thiết bị, dụng cụ thiết bị: Cân phân tích Satorius CP224S (Mỹ), cân kỹ thuật điện tử (Sartorius-Mỹ), máy đồng nhất hóa Premix (Nhật Bản), hệ thống HPLC Alliance Waters 2695D (Mỹ), cột sắc ký Inert Sustain AQ (C18, 5 μm , 4,6 x 150mm) và các dụng cụ nghiên cứu khác.

2. Phương pháp nghiên cứu

* *Chuẩn bị mẫu:*

Dung dịch chuẩn gốc: Cân chính xác 10mg AG chuẩn vào bình định mức 100mL, thêm khoảng 50mL methanol, lắc siêu âm 15 phút để hòa tan hoàn toàn. Bổ sung thêm dung môi methanol đến vạch định mức để thu được dung dịch chuẩn gốc AG có nồng độ 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$.

Dãy dung dịch chuẩn: Hút lần lượt 1mL, 2mL, 3mL, 4mL, 5mL, 6mL dung dịch chuẩn gốc vào các bình định

mức 20mL. Thêm dung môi methanol đến vạch định mức để thu được dãy dung dịch chuẩn có nồng độ lần lượt là 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 15 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ và 30 $\mu\text{g}/\text{mL}$.

Chuẩn bị mẫu hệ lỏng nano polyme AG: Chuẩn bị pha nội: Cân chính xác 20mg AG nguyên liệu, 60mg PLGA và 20mg Lecithin vào cốc có mỏ 50mL. Hòa tan trong 10mL hỗn hợp dung môi DCM/MeOH (tỷ lệ 9/1) ở nhiệt độ phòng.

Chuẩn bị pha ngoại: Cân chính xác 1,05g Tween 80 vào cốc có mỏ 250mL. Hòa tan hoàn toàn lượng chất diện hoạt trong 150mL nước cất.

Nhũ hóa và đồng nhất hóa: Quá trình nhũ hóa và đồng nhất được tiến hành trên máy đồng nhất hóa. Thêm từng giọt pha nội vào pha ngoại với tốc độ nhũ hóa khoảng 1.000 vòng/phút. Sau khi quá trình nhũ hóa kết thúc, tiến hành đồng nhất hóa với tốc độ và thời gian thích hợp. Duy trì nhiệt độ $100 \pm 2^\circ\text{C}$ trong suốt quá trình nhũ hóa và đồng nhất.

Bốc hơi dung môi pha nội ở điều kiện nhiệt độ phòng trên máy khuấy từ trong khoảng 3 giờ, thu được hỗn dịch nano polyme Andrographolid.

Mẫu thử: Pha loãng một thể tích xác định hỗn dịch nano polyme AG bằng dung môi methanol đến nồng độ thích hợp. Lọc qua màng lọc 0,45 μm trước khi tiêm vào hệ thống sắc ký.

* *Khảo sát lựa chọn điều kiện sắc ký:* Sử dụng dung dịch chuẩn Andrographolid có nồng độ 20 µg/mL để khảo sát. Qua tham khảo tài liệu [2, 3, 4, 5, 6, 7], nghiên cứu tiến hành lựa chọn một số điều kiện sắc ký cơ bản:

Cột: Inert Sustain AQ, C18 5µm (4,6 x 150mm).

Detector: PDA.

Bước sóng hấp thụ cực đại: 223nm.

Nhiệt độ cột: Nhiệt độ phòng.

Thể tích tiêm: 10µL.

Chương trình pha động: Đẳng dòng (Isocratic).

Tốc độ dòng: 1mL/phút.

Tiến hành khảo sát một số hệ pha động:

ACN: Nước với các tỷ lệ thành phần pha động khác nhau (10/90, 25/75, 30/70).

ACN: Acid phosphoric 0,1% (40/60, v/v: thể tích/thể tích).

ACN: Acid acetic 0,4% (30/70, v/v).

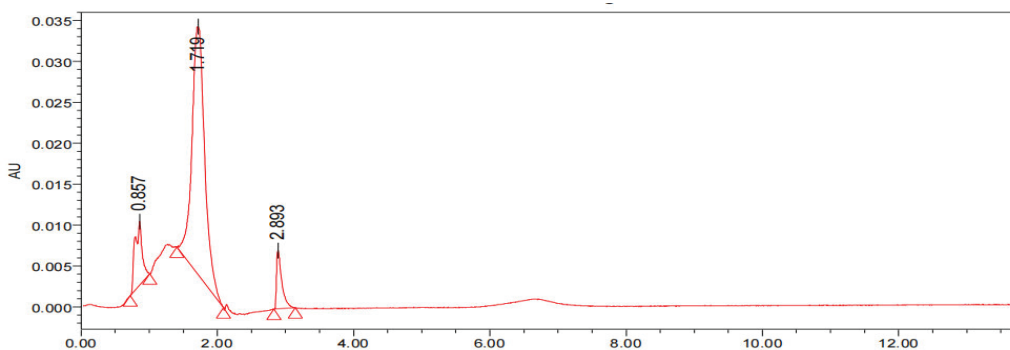
Xác định điều kiện sắc ký cho pic đạt độ đối xứng tốt, tỷ lệ diện tích pic trên nồng độ và chiều cao pic trên nồng độ lớn nhất.

* *Thẩm định phương pháp định lượng:* Phương pháp định lượng được thẩm định căn cứ theo hướng dẫn của ICH dựa trên khảo sát các chỉ tiêu gồm độ đặc hiệu, độ tương thích hệ thống, độ tuyến tính, độ lặp lại, độ đúng, giới hạn phát hiện và giới hạn định lượng của phương pháp [8].

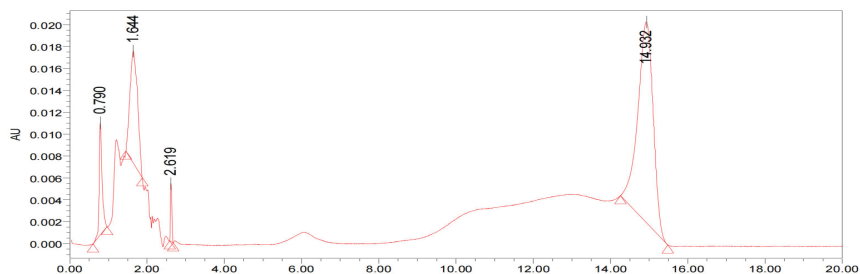
KẾT QUẢ VÀ BÀN LUẬN

1. Kết quả xây dựng phương pháp định lượng Andrographolid trong hệ nano polyme bằng phương pháp HPLC

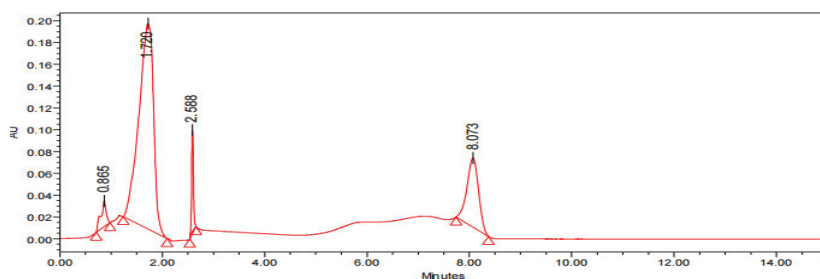
Kết quả khảo sát thành phần pha động được thể hiện ở hình 1, 2, 3, 4 và 5



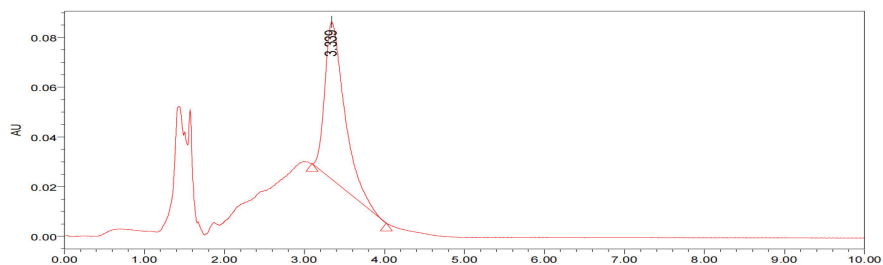
Hình 1. Sắc ký đồ mẫu chuẩn AG với hệ pha động ACN:nước (10/90, v/v).



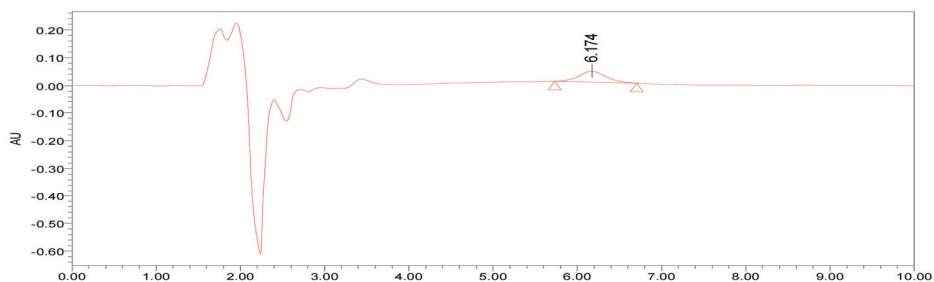
Hình 2. Sắc ký đồ mẫu chuẩn AG với hệ pha động ACN:nước (25/75, v/v).



Hình 3. Sắc ký đồ mẫu chuẩn AG với hệ pha động ACN:nước (30/70, v/v).



Hình 4. Sắc ký đồ mẫu chuẩn AG với hệ pha động ACN:acid phosphoric 0,1% (40/60, v/v).



Hình 5. Sắc ký đồ mẫu chuẩn AG với hệ pha động ACN:acid acetic 0,4% (30/70, v/v)

Căn cứ vào kết quả sắc ký đồ thu được nhận thấy các hệ dung môi pha động của ACN và nước dù ở bất cứ tỷ lệ nào đều không cho ra được các pic cân đối của hoạt chất Andrographolid. Hiện tượng tương tự cũng xuất hiện khi sử dụng hệ dung môi pha động của ACN và acid phosphoric 0,1%. Hệ dung môi ACN và acid acetic 0,4% (30/70, v/v) cho khả năng phân tách tốt, pic gọn, cân xứng, khoảng cách giữa 2 chân pic ngắn, thời gian lưu phù hợp cho quá trình phân tách (6,174 phút), đường nền ổn định. Kết quả khảo sát trên cho thấy hệ dung môi pha động ACN:acid acetic 0,4% (30/70, v/v) là phù hợp cho quá trình phân tích định lượng Andrographolid.

2. Kết quả thẩm định phương pháp định lượng Andrographolid trong hệ nano polyme bằng phương pháp HPLC

* *Tính tương thích hệ thống:*

Tiêm 6 lần mẫu chuẩn Andrographolid có nồng độ 20 µg/mL vào hệ thống HPLC, tiến hành sắc ký theo điều kiện đã chọn. Kết quả khảo sát tính tương thích hệ thống được trình bày ở bảng 1.

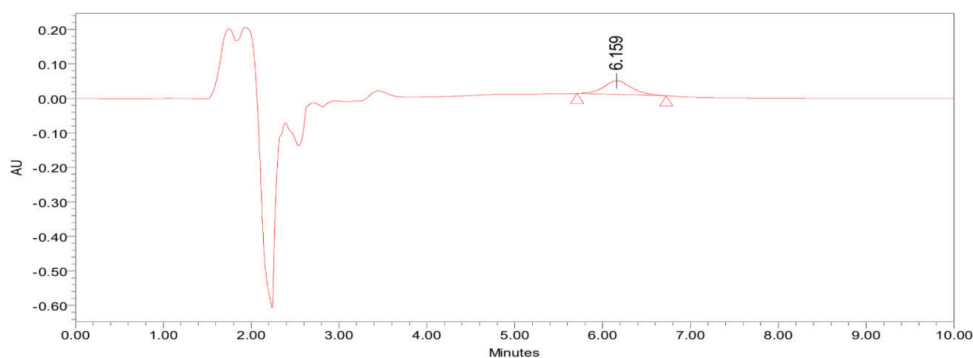
Bảng 1. Kết quả khảo sát tính tương thích hệ thống.

STT	Thời gian lưu T _R (phút)	Diện tích pic (µV.s)	Hệ số bất đối xứng (AF)	Số đĩa lý thuyết (n)
1	6,154	864481	1,132	10376
2	6,159	889901	1,131	10385
3	6,157	882788	1,132	10356
4	6,174	886265	1,131	10348
5	6,154	886232	1,132	10371
6	6,174	888984	1,133	10344
$\bar{X} \pm SD$	6,162 ± 0,0094	883109 ± 9460,08	1,132 ± 0,001	10363,33 ± 16,44
RSD %	0,154	1,071	0,067	0,159

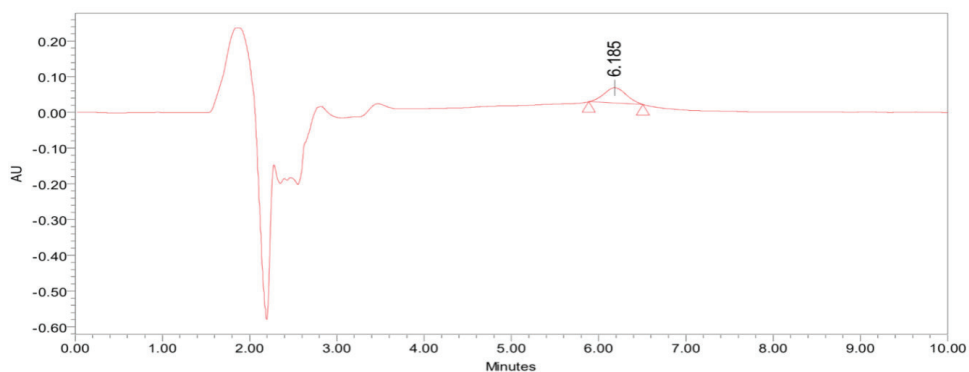
Kết quả trên cho thấy độ lệch chuẩn tương đối của các giá trị thời gian lưu nhỏ hơn 1% và diện tích pic nhỏ hơn 2%. Như vậy, chương trình sắc ký đã chọn phù hợp để định lượng AG.

* *Độ đặc hiệu:*

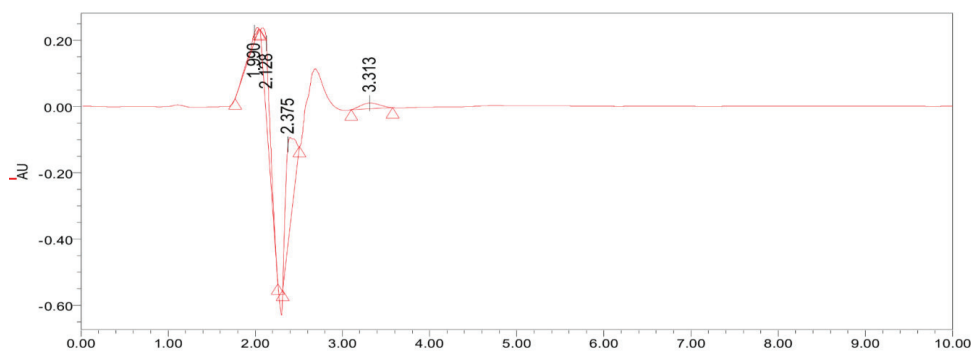
Chuẩn bị 3 mẫu: Mẫu trắng (hỗn hợp tá dược), mẫu chuẩn và mẫu thử. Tiến hành chuẩn bị mẫu và tiến hành sắc ký với các điều kiện đã lựa chọn. Kết quả sắc ký đồ của mẫu trắng, mẫu chuẩn và mẫu thử được thể hiện lần lượt ở hình 6, 7 và 8.



Hình 6. Sắc ký đồ mẫu chuẩn Andrographolid.



Hình 7. Sắc ký đồ mẫu thử (hệ lỏng nano polyme Andrographolid).



Hình 8. Sắc ký đồ mẫu trắng.

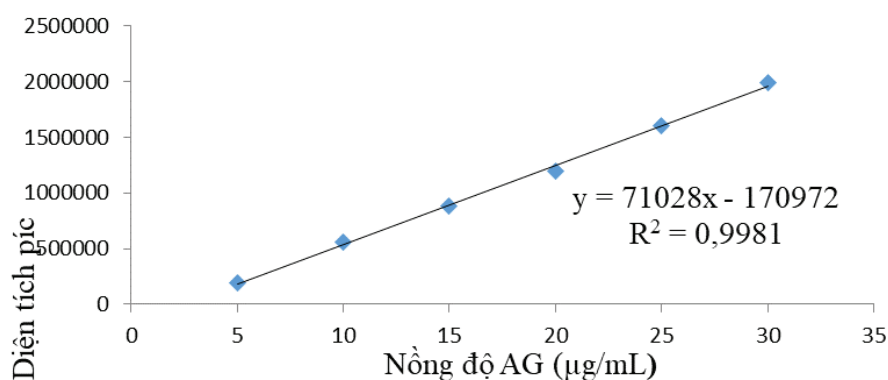
Từ hình ảnh sắc ký đồ của mẫu chuẩn và mẫu thử cho thấy thời gian lưu píc của mẫu chuẩn và mẫu thử là tương đương nhau (ở khoảng phút thứ 6,1). Trên sắc ký đồ của mẫu trắng, tại phút thứ 6,1 không thấy xuất hiện píc lạ. Kết quả cho thấy quy trình định lượng AG bằng phương pháp HPLC có độ đặc hiệu cao.

* *Khoảng tuyến tính:*

Chuẩn bị các mẫu chuẩn Andrographolid, nồng độ từ 5,0 - 30,0 µg/mL, mỗi nồng độ phân tích 3 lần. Từ kết quả diện tích píc thu được, tiến hành thiết lập phương trình hồi quy tuyến tính biểu thị sự tương quan giữa diện tích píc và nồng độ các dung dịch chuẩn Andrographolid. Kết quả được thể hiện ở bảng 2 và hình 9.

Bảng 2. Tương quan giữa nồng độ Andrographolid và diện tích píc.

Nồng độ mẫu chuẩn (µg/mL)	Diện tích píc (µV.s)				
	Lần 1	Lần 2	Lần 3	$\bar{X} \pm SD$	RSD%
5	190661	191615	190791	191022,3 ± 517,36	0,2708
10	562318	564572	562019	562969,7 ± 1395,69	0,2479
15	884481	889901	882788	885723,3 ± 3715,67	0,4195
20	1193351	1199672	1196190	1196404 ± 3165,94	0,2646
25	1608205	1610084	1606820	1608370 ± 1638,21	0,1018
30	1961305	1962114	2039467	1987629 ± 44895,13	2,2587



Hình 9. Đồ thị tương quan tuyến tính giữa nồng độ dung dịch chuẩn Andrographolid và diện tích píc.

Kết quả trên cho thấy trong khoảng nồng độ khảo sát từ 5 - 30 $\mu\text{g/mL}$ có sự tương quan tuyến tính chặt chẽ giữa diện tích pic và nồng độ AG. Ta thu được phương trình hồi quy: $y = 71028x - 170972$ với hệ số tương quan $R^2 > 0,99$. Như vậy, khoảng tuyến tính phù hợp để định lượng AG trong các mẫu nghiên cứu.

* *Độ lặp lại:*

Chuẩn bị mẫu hỗn dịch nano polyme AG theo quy trình được trình bày ở mục 2 (Phương pháp nghiên cứu). Chuẩn bị 6 mẫu thử riêng biệt, trong đó mỗi mẫu hút chính xác 2 mL hỗn dịch nano polyme AG đã bào chế và pha loãng bằng dung môi methanol đến nồng độ thích hợp. Lọc qua màng lọc 0,45 μm trước khi tiêm vào hệ thống sắc ký. Tiến hành chạy sắc ký và ghi lại diện tích pic của 6 mẫu thử. Kết quả được trình bày ở bảng 3.

Bảng 3. Kết quả khảo sát độ lặp lại của phương pháp.

Mẫu	Thể tích mẫu (mL)	Diện tích pic ($\mu\text{V.s}$)	Nồng độ ($\mu\text{g/mL}$)
1	2,0	762093	13,1365
2	2,0	761861	13,1333
3	2,0	764530	13,1708
4	2,0	762493	13,1422
5	2,0	764476	13,1701
6	2,0	764948	13,1767
$\bar{x} \pm \text{SD}$			13,1549 \pm 0,0196
RSD %			0,1492

Kết quả thử độ lặp lại của phương pháp cho thấy với các điều kiện sắc ký đã chọn, độ lệch chuẩn tương đối của các kết quả là 0,1493% (< 2%), đạt yêu cầu theo tiêu chuẩn quy định. Như vậy, phương pháp định lượng đã chọn đảm bảo độ lặp lại của các kết quả trong các thử nghiệm được thực hiện song song.

* *Độ đúng:*

Chuẩn bị các dung dịch chuẩn và hỗn dịch nano polyme AG ở ba mức nồng độ 5 µg/mL (mẫu LQC), 10 µg/mL (mẫu MQC) và 15 µg/mL (mẫu HQC). Lấy 2mL mẫu thử, thêm một lượng dung dịch chuẩn tương ứng khoảng 10%, 20% và 30% thể tích mẫu thử ở các nồng độ tương ứng như trên. Xác định tỷ lệ thu hồi (%) bằng cách tính toán lượng chất chuẩn thêm vào mẫu thử. Sau khi thêm chuẩn xong, tiến hành sắc ký và ghi lại diện tích pic của các mẫu, từ đó tính ra được lượng chất chuẩn thêm vào. Kết quả được trình bày ở bảng 4, 5 và 6.

Bảng 4. Kết quả khảo sát độ đúng của phương pháp với mẫu thử LQC.

Mẫu	Thể tích mẫu (mL)	Diện tích pic	Nồng độ (µg/mL)	Khối lượng AG (µg)	Khối lượng chuẩn thêm vào lý thuyết (µg)	Khối lượng chuẩn thêm vào thực tế (µg)	% Tìm lại
LQC	2	201744	5,2474	10,4949			
LQC + 10%	2,2	201296	5,2411	11,5305	1	1,0356	103,5614
LQC + 20%	2,4	200227	5,2261	12,5426	2	2,0477	102,3861
LQC + 30%	2,6	199633	5,2177	13,5661	3	3,0711	102,3732
% Tìm lại trung bình							102,7736
RSD%							0,6639

Bảng 5. Kết quả khảo sát độ đúng của phương pháp với mẫu thử MQC.

Mẫu	Thể tích mẫu (mL)	Diện tích pic	Nồng độ (µg/mL)	Khối lượng AG (µg)	Khối lượng chuẩn thêm vào lý thuyết (µg)	Khối lượng chuẩn thêm vào thực tế (µg)	% Tìm lại
MQC	2	572335	10,4649	20,9299			
MQC + 10%	2,2	569130	10,4198	22,9236	2	1,9937	99,6863
MQC + 20%	2,4	566655	10,3850	24,9240	4	3,9940	99,8517
MQC + 30%	2,6	565041	10,3622	26,9419	6	6,0119	100,1998
% Tìm lại trung bình							99,9126
RSD%							0,2623

Bảng 6. Kết quả khảo sát độ đúng của phương pháp với mẫu thử HQC.

Mẫu	Thể tích mẫu (mL)	Diện tích pic	Nồng độ (µg/mL)	Khối lượng AG (µg)	Khối lượng chuẩn thêm vào lý thuyết (µg)	Khối lượng chuẩn thêm vào thực tế (µg)	% Tìm lại
HQC	2	757162	13,0671	26,1343			
HQC + 10%	2,2	769778	13,2447	29,1385	3	3,0041	100,1398
HQC + 20%	2,4	780036	13,3891	32,1340	6	5,9997	99,9960
HQC + 30%	2,6	790503	13,5365	35,1950	9	9,0607	100,6750
% Tìm lại trung bình							100,2703
RSD%							0,3568

Kết quả trên cho thấy phương pháp có tỷ lệ % tìm lại nằm trong khoảng từ 99,91 - 102,77%. Điều đó chứng tỏ phương pháp HPLC đã xây dựng đủ độ tin cậy để định lượng AG trong mẫu nghiên cứu.

* *Giới hạn phát hiện và giới hạn định lượng:*

Bằng phương pháp dựa vào tỷ số giữa tín hiệu (S) và nhiễu (N) đã xác định được:

- Nồng độ mẫu thử khoảng 0,4 µg/mL là giới hạn phát hiện. Tại nồng độ này, đáp ứng pic mẫu thử có diện tích lớn gấp hơn 3 lần diện tích đáp ứng của mẫu trắng.

- Nồng độ mẫu thử khoảng 1,2 µg/mL là giới hạn định lượng dưới. Tại nồng độ này, đáp ứng pic mẫu thử có diện tích lớn gấp 10 lần diện tích đáp ứng của mẫu trắng.

KẾT LUẬN

Đã xây dựng được phương pháp định lượng Andrographolid trong mẫu hệ nano polyme bằng phương pháp HPLC với các điều kiện sắc ký như: Hệ thống HPLC Alliance Waters 2965D, cột Inert Sustain AQ (C18, 5µm, 4,6 x 150mm), detector PDA 223nm, pha động: ACN:acid acetic 0,4% (30/70, v/v), thể tích tiêm 10µL, tốc độ dòng 1 mL/phút, nhiệt độ cột là nhiệt độ phòng. Phương pháp xây dựng đã được thẩm định trên một số chỉ tiêu và đáp ứng yêu cầu của một phương pháp phân tích theo quy định của ICH. Phương pháp này có thể áp dụng để

định lượng Andrographolid trong mẫu hệ nano polyme, làm cơ sở cho các nghiên cứu tiếp theo.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Yen CC, Liang YK, Cheng CP, et al. Oral bioavailability enhancement and anti-fatigue assessment of the andrographolide loaded solid dispersion. *International Journal of Molecular Sciences*. 2020;1-18.
2. Vijaykumar K, Murthy PBS, Kannababu S, et al. Estimation of andrographolide in andrographis paniculata herb, extracts and dosage forms. *International Journal of Applied Science and Engineering*. 2007; 5(1): 27-39.
3. Xu T, Pan J, Zhao L. Simultaneous determination of four andrographolides in andrographis paniculata nees by silver ion reversed phase high performance liquid chromatography. *Journal of Chromatographic Science*. 2008; 46:747-750.
4. Sajeeb BK, Kumar U, Halder S, et al. Identification and quantification of andrographolide from andrographis paniculata (Burm. f.) Wall. ex Nees by RP-HPLC method and standardization of its market preparations. *Dhaka University Journal of Pharmaceutical Sciences*. 2015; 14(1):71-78.

5. Kumar S, Dhanani T, Shah S. Extraction of three bioactive diterpenoids from andrographis paniculata: Effect of the extraction techniques on extract composition and quantification of three andrographolides using high-performance liquid chromatography. *Journal of Chromatographic Science*. 2014; 52:1043-1050.
6. Syukri Y, Afetma DW, Sirin M, et al. Validation of A Simple HPLC-UV method for the quantification of andrographolide in self nano emulsifying drug delivery system (snedds) for dissolution study. *International Journal of Drug Delivery Technology*. 2017; 7(4):239-243.
7. Li W, Fitzloff JF. Determination of Andrographolide in commercial andrographis (*Andrographis paniculata*) products using HPLC with evaporative light scattering detection. *Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies*. 2014; 25(9):1335-1343.
8. ICH Harmonised Tripartite Guideline. Guidelines for validation of analytical procedures: Q2 (R1), Text and Methodology. 2005.