

doi:10.11937/bfyy.20171118

穿心莲中二萜类内酯的 TLC 鉴别及 HPLC 含量测定

连瑞丽¹, 李宇伟¹, 马霞¹, 耿元邦², 刘永录¹, 张国祖^{1,2}

(1. 河南牧业经济学院, 河南 郑州 450046; 2. 河南省康星药业股份有限公司, 河南 郑州 451464)

摘要:以穿心莲为试材, 采用薄层色谱法(TLC)对穿心莲内酯与脱水穿心莲内酯进行定性鉴别, 以三氯甲烷-乙酸乙酯-甲醇(4:3:0.4)为展开剂, 以2%的3,5-二硝基苯甲酸乙醇溶液-2 mol·L⁻¹氢氧化钾溶液(1:1)混合溶液为显色剂; 并采用高效液相色谱法(HPLC)测定穿心莲内酯、脱水穿心莲内酯的含量, 使用Hypersil BDS C₁₈ (4.6 mm×250 mm, 5 μm)为色谱柱, 以甲醇-水(65:35)为流动相, 柱温30℃, 穿心莲内酯检测波长为225 nm, 脱水穿心莲内酯检测波长为254 nm。结果表明: 建立的薄层色谱法能检出穿心莲内酯与脱水穿心莲内酯, HPLC法能够准确测定穿心莲中穿心莲内酯与脱水穿心莲内酯的含量。使用薄层色谱鉴别及高效液相色谱法快速、准确, 重复性好, 可用于穿心莲药材的质量控制。

关键词:穿心莲; 穿心莲内酯; 脱水穿心莲内酯; 薄层色谱法; 高效液相色谱法

中图分类号:S 567.23⁺9 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2017)24-0165-06

穿心莲一般指爵床科植物穿心莲(*Andropogon paniculata* (Burm. f.) Nees)的干燥地上部^[1], 秋初茎叶茂盛时采割, 具有清热解毒^[2]、抗菌、消炎^[3]、抗肿瘤^[4]、抗病毒、凉血、消肿^[5-6]等功效。穿心莲药材中的有效成分有二萜内酯类和黄酮类化合物, 穿心莲叶子中主要含二萜内酯类成分, 穿心莲根中主要含黄酮类成分, 叶中黄酮类成分含量甚低^[2-3], 制剂生产中采用的穿心莲药材也是以穿心莲茎叶为主, 故评价穿心莲药材质量的活性成分也就主要以二萜内酯类成分为主。其中二萜内酯类成分有: 穿心莲内酯、去氧穿心莲内

酯、新穿心莲内酯、高穿心莲内酯、脱水穿心莲内酯、穿心莲甙、穿心莲宁、穿心莲潘甙等, 药理试验及临床报道较多的主要是穿心莲内酯与脱水穿心莲内酯^[2-7], 同时也是目前穿心莲制剂的主要活性成分, 因此穿心莲内酯与脱水穿心莲内酯的含量是评价穿心莲药材质量的重要指标^[1,7-8]。为更好地开发和利用穿心莲药材, 该试验对穿心莲药材中穿心莲内酯及脱水穿心莲内酯进行薄层色谱鉴别和含量测定的研究, 以期中药材穿心莲的质量控制提供技术参考。

1 材料与方法

1.1 试验材料

供试穿心莲药材购于河南禹州市凯旋药业有限公司。

穿心莲内酯对照品(批号:110854-201313, 质量分数99.9%)、脱水穿心莲内酯对照品(批号:110797-200307, 质量分数99.9%)均购于中国药品生物制品检定所。甲醇(天津四友精细化学品

第一作者简介:连瑞丽(1976-), 女, 硕士, 研究方向为药物制剂研发。E-mail: ywli@sibs.ac.cn.

责任作者:马霞(1978-), 女, 博士, 副教授, 现主要从事药物制剂等研究工作。E-mail: zzmzywli@126.com.

基金项目:河南省科技攻关计划资助项目(162102310434); 河南省中草药组培快繁及资源开发利用科技团队资助项目(C20150033); 河南牧业经济学院科技创新团队资助项目(HUAHE2015009)。

收稿日期:2017-07-14

有限公司)为色谱纯,三氯甲烷(天津市富宇精细化工有限公司)、乙酸乙酯(天津市富宇精细化工有限公司)、乙醇(天津市富宇精细化工有限公司)等试剂均为分析纯;水为超纯水。

P230 型液相色谱仪,包括 UV230+型可变波长紫外检测器、P230 型高压恒流泵、ZW II 型注温箱、EC2000 工作站(大连依利特分析仪器有限公司);薄层自动点样仪、薄层色谱扫描仪(上海科哲生化科技有限公司);电热恒温水浴锅(巩义市瑞德仪器设备有限公司);AUW220D 型电子天平(日本岛津国际贸易有限公司);KQ3200 型超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司);Milli-Q 超纯水系统(美国 Millipore 科技有限公司);硅胶 GF₂₅₄ 薄层板(山东青岛海洋化工厂)。所用的玻璃器皿等用具均经 10% 硝酸浸泡 48 h 后,用超纯水洗净。

1.2 试验方法

1.2.1 穿心莲的薄层色谱法(TLC)鉴别

溶液制备。混合对照品溶液:取穿心莲内酯对照品、脱水穿心莲内酯对照品适量,精密称定,加无水乙醇制成质量浓度为 $1 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的混合溶液,即得。供试品溶液:取穿心莲粉末适量,以 75% 乙醇为提取溶剂,3 倍量乙醇 40 °C 提取 1 h,挤压并冲洗出提取液,过滤,滤液浓缩至质量浓度为 $0.5 \text{ g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的溶液;取上述溶液 2 mL,加无水乙醇 30 mL,超声处理 30 min,过滤,滤液浓缩至 5 mL,即得。对照药材溶液:另取穿心莲对照药材 0.5 g,同法制成对照药材溶液。

TLC 鉴别。吸取混合对照品溶液、供试品溶液、对照药材溶液各 10 μL ,依次分别点于同一硅胶 GF₂₅₄ 薄层板上,以三氯甲烷-乙酸乙酯-甲醇(4:3:0.4)的上层溶液为展开剂,展开,取出,晾干,喷以 2% 的 3,5-二硝基苯甲酸乙醇溶液-2 mol $\cdot \text{L}^{-1}$ 氢氧化钾溶液(1:1)混合溶液(临用配制),立即置紫外光灯下检视 TLC 鉴别结果^[5-8]。

1.2.2 二萜类内酯含量的测定

混合对照品溶液的制备。用电子天平精密称定穿心莲内酯对照品、脱水穿心莲内酯对照品适量,加甲醇配制成质量浓度各 $0.1 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的混合溶液,即得。

供试品溶液的制备。取穿心莲粉末适量,以

75% 乙醇为提取溶剂,3 倍量乙醇 40 °C 提取 1 h,挤压并冲洗出提取液,过滤,滤液浓缩至质量浓度为 $0.5 \text{ g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的溶液;精密量取上述溶液 1 mL,置中性氧化铝柱(200~300 目,5 g,内径 1.5 cm)上,用乙醇 20 mL 洗脱,收集滤液,加乙醇定容至 25 mL,摇匀,即得供试品溶液。

色谱条件与系统适用性试验。色谱柱: Hypersil BDS C₁₈ (4.6 mm \times 250 mm,5 μm);流动相:以甲醇-水(65:35)为流动相;填充剂:以十八烷基硅烷键合硅胶为填充剂;柱温 30 °C;穿心莲内酯检测波长为 225 nm,脱水穿心莲内酯检测波长为 254 nm;进样量 10 μL 。理论塔按理论板数按穿心莲内酯和脱水穿心莲内酯峰计算,均应不低于 2 000;分析时间 30 min。

线性关系考察。精密称取穿心莲内酯对照品 10.24 mg,脱水穿心莲内酯对照品 10.94 mg,置 100 mL 容量瓶中,加入甲醇,超声(56 kHz,80 W)使溶解,放冷并定容,配制成含有穿心莲内酯 $0.1024 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 、脱水穿心莲内酯 $0.1094 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的混合对照品溶液。再分别精密吸取上述混合溶液 1、3、5、8、10、12、15 μL ,注入高效液相色谱仪,按上述色谱条件测定,分别以穿心莲内酯和脱水穿心莲内酯的进样量为横坐标,以峰面积为纵坐标绘制标准曲线,进行线性回归,考察线性关系。

精密度试验。精密吸取混合对照品溶液,按上述色谱条件水平重复进样 6 次,计算 6 次进样峰面积的平均值和峰面积积分值的相对标准偏差(RSD),考察仪器稳定性。

重复性试验。取同一批次穿心莲,平行称取 6 份样品,按上述色谱条件进行测定,记录峰面积并计算样品含量,计算 RSD,考察方法的重复性。

稳定性试验。取同一供试品溶液在室温下放置,分别在 0、1、3、6、9、12、24 h 内进样 5 μL ,按照上述 HPLC 色谱条件下检测,并记录峰面积,计算 RSD,考察处理后供试品溶液的稳定性。

回收率试验。称取已知含量样品 9 份,每份 0.5 mL,每 3 份为 1 组。每组分别添加穿心莲内酯和脱水穿心莲内酯的混合对照品溶液,添加量分别为各自含药量的 80%、100%、120%,按照供试品溶液处理方法处理,浓度检测后计算 2 种组分的回收率。

样品测定。分别取 10 批样品, 每批样品取 3 份, 并按色谱条件进行分析, 测定峰面积, 检测并计算出样品中穿心莲内酯和脱水穿心莲内酯的含量。

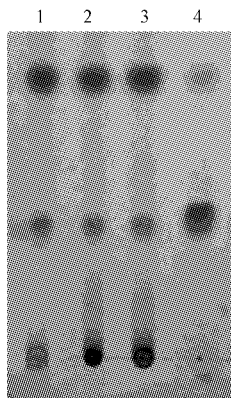
1.3 数据分析

试验数据采用 Excel 软件进行处理及分析。

2 结果与分析

2.1 穿心莲的 TLC 鉴别

分别吸取混合对照品溶液、供试品溶液、对照药材溶液各 10 μL , 依次分别点于同一硅胶 GF₂₅₄ 薄层板上, 以三氯甲烷-乙酸乙酯-甲醇(4:3:0.4)的上层溶液为展开剂, 展开, 取出, 晾干, 喷以 2% 的 3,5-二硝基苯甲酸乙醇溶液-2 mol \cdot L⁻¹ 氢氧化钾溶液(1:1)混合溶液(临用配制), 立即置波长为 254 nm 的紫外光灯下检视^[5-8]。由图 1 可知, 供试品中的穿心莲内酯与脱水穿心莲内酯成分可与其它成分有效分离开, 并与对照药材和穿心莲内酯与脱水穿心莲内酯对照品相对应的位置上, 显示出相同颜色的斑点。可知此鉴别方法可以作为穿心莲中二萜类内酯的薄层鉴别方法。



注: 1. 穿心莲对照药材; 2、3. 穿心莲样品(批号: 2014070408、2014070409); 4. 穿心莲内酯和脱水穿心莲内酯混合对照品。

Note: 1. Contrast medicinal materials of *Andrographis paniculata* Nees; 2 and 3. *Andrographis paniculata* Nees samples(batch: 2014070408, 2014070409); 4. Mixed reference substance of andrographolide and dehydroandrographolide.

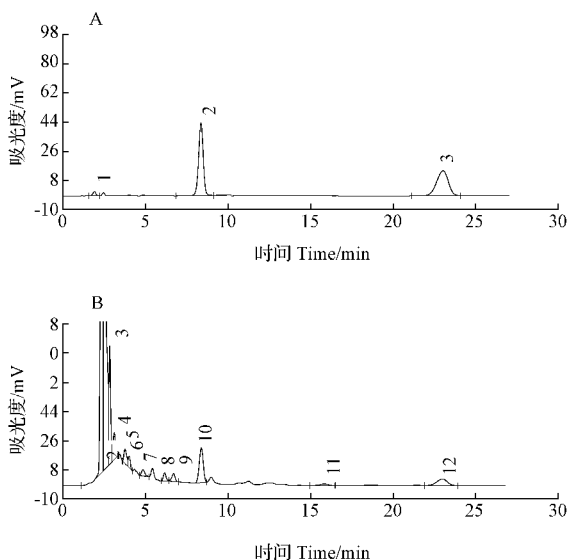
图 1 穿心莲的薄层色谱图

Fig. 1 TLC chromatogram of *Andrographis paniculata* Nees

2.2 含量测定

2.2.1 色谱条件与系统适用性试验

由图 2 可知, 穿心莲样品分离效果好, 穿心莲内酯和脱水穿心莲内酯与杂质分离完全。穿心莲内酯、脱水穿心莲内酯保留时间分别约为 8、23 min, 表明此法在测定穿心莲中穿心莲内酯和脱水穿心莲内酯的含量时具有较好的系统适用性。



注: A. 混合对照品溶液, B. 穿心莲样品。

Note: A. Mixed reference solution; B. *Andrographis paniculata* Nees sample.

图 2 穿心莲中二萜类内酯的 HPLC 色谱图

Fig. 2 HPLC chromatogram of diterpenelactone in *Andrographis paniculata* Nees

2.2.2 线性关系考察

分别精密吸取上述混合溶液 1、3、5、8、10、12、15 μL , 注入高效液相色谱仪, 按上述色谱条件测定, 分别以穿心莲内酯和脱水穿心莲内酯的进样量为横坐标, 以峰面积为纵坐标绘制标准曲线, 进行线性回归, 计算得到穿心莲内酯、脱水穿心莲内酯的线性回归方程分别为: $Y = 0.7307X - 9.7578$, $R^2 = 0.9998$ 和 $Y = 0.632X - 12.351$, $R^2 = 0.9999$ 。结果表明, 穿心莲内酯进样量在 0.1024~1.5360 μg 、脱水穿心莲内酯进样量在 0.1094~1.6410 μg 与峰面积积分值具有良好的线性关系。

2.2.3 精密度试验

精密吸取混合对照品溶液,计算6次进样峰面积的平均值和峰面积积分值的相对标准偏差(RSD),穿心莲内酯的进样峰面积RSD为0.7%、脱水穿心莲内酯的进样峰面积RSD为0.8%。

2.2.4 重复性试验

取同一批次穿心莲,平行称取6份样品,制备供试品溶液,按色谱条件进行测定,结果表明,穿心莲内酯和脱水穿心莲内酯含量平均值的RSD分别为0.8%和0.9%,表明该方法重现性较好。

2.2.5 稳定性试验

取同一供试品溶液在室温下放置,分别在0、1、3、6、9、12、24 h内进样5 μ L,按色谱条件进行测定,结果穿心莲内酯、脱水穿心莲内酯峰面积的RSD分别为1.1%和1.3%,表明供试溶液在室温条件下放置24 h比较稳定。

2.2.6 回收率试验

称取已知含量样品9份,每份0.5 mL,每3

份为1组。每组分别添加穿心莲内酯和脱水穿心莲内酯的混合对照品溶液,添加量分别为各自含药量的80%、100%、120%,每组重复3次,制备供试品溶液,并按色谱条件进行测定,测得穿心莲内酯、脱水穿心莲内酯含量的平均回收率分别为99.9%和101.9%,RSD分别为1.2%和1.4%。

2.2.7 样品测定

分别取10批样品,每批样品取3份,分别制备供试溶液并按色谱条件进行分析,测定峰面积,检测并计算出样品中穿心莲内酯和脱水穿心莲内酯的含量。由表1可以看出,穿心莲内酯平均含量为1.309%,脱水穿心莲内酯含量0.105%,总内酯平均含量为1.414%,高于国家药典中规定穿心莲药材中含穿心莲内酯和脱水穿心莲内酯的总量不得少于0.80%^[1]的含量要求,其中只有一批穿心莲药材中总内酯含量较少,为0.532%,这可能是该批药材(购于2013年7月)存放时间较长,造成含量降低^[8-9]。

表1

样品含量测定结果

Table 1

Determination results of samples

%

批号 Batch	穿心莲内酯含量 Content of andrographolide	脱水穿心莲内酯含量 Content of dehydroandrographolide	穿心莲总内酯含量 Content of total lactones
2013070205	0.338	0.194	0.532
2013070206	0.967	0.157	1.124
2013070301	0.873	0.168	1.041
2014070302	1.324	0.069	1.393
2014070303	1.492	0.052	1.544
2014070408	1.841	0.048	1.889
2014070409	0.983	0.154	1.137
2015020501	1.068	0.087	1.155
2015020502	1.986	0.041	2.027
2015020503	2.215	0.079	2.294
平均含量 Average content	1.309	0.105	1.414

3 讨论

3.1 薄层色谱鉴别展开剂的考察

查阅相关文献^[1,8-10],分别比较了以三氯甲烷-甲苯-甲醇(80:10:15)、乙酸乙酯-甲醇-水(10:2:1)、甲苯-乙酸乙酯-甲酸(5:2:1)、三氯甲烷-甲醇-醋酸(8:1:0.2)、乙酸乙酯-甲酸-水(10:2:3)等作为展开剂,分离效果都不理想,最终确定以三氯甲烷-乙酸乙酯-甲醇(4:3:

0.4)为展开剂,能够获得最佳的色谱效果,与相应对照药材或对照品相同的位置上出现相同颜色并且清晰的斑点。

3.2 二萜内酯含量测定供试品溶液制备方法的考察

二萜内酯含量测定时,提取方法比较了超声提取法^[1]和醇提水沉法^[11-13]对穿心莲中二萜内酯含量测定的影响,结果显示醇提水沉法提取测得二萜内酯的含量高于超声提取法,故选择醇提水

沉法;提取溶剂考察了水、乙醇溶液(30%、60%、75%、90%),结果显示75%乙醇溶液提取效率最高,故选择75%乙醇溶液为提取溶剂;乙醇用量考察了1.5、3、6、9倍量,结果显示采取3倍量乙醇时,乙醇用量少且提取时间短,故选择3倍量乙醇;提取温度考察了25、40、60℃,结果显示提取温度为40℃时,提取效率最高,测得二萜内酯的含量高,故选择了40℃作为提取温度;提取时间考察了0.5、1.0、1.5 h,结果显示1.0 h可提取完全,1.5 h提取的二萜内酯的含量反而下降,故将提取时间定为1.0 h。

3.3 含量测定检测波长和流动相的选择

穿心莲内酯和脱水穿心莲内酯分别在225 nm和254 nm附近有最大吸收,基线平稳,基线杂质干扰小,故穿心莲内酯检测波长为225 nm,脱水穿心莲内酯检测波长为254 nm。同时考察了流动相乙腈-水(30:70)、乙腈-0.1%醋酸溶液(9:91)、甲醇-水(65:35),结果显示以甲醇-水(65:35)为流动相,所得色谱峰峰形较好,分离效果最佳。

4 结论

近年来,TLC鉴别及HPLC含量测定成为中药材有效成分(有效部位)定性鉴定和定量分析的重要手段,也是对中药进行质量控制和建立质量标准的有效方法。该试验对穿心莲药材中穿心莲内酯及脱水穿心莲内酯进行薄层色谱鉴别和含量测定所建立的方法,通过验证表明,该技术方法分析快速、准确,重复性好,可用于穿心莲药材的质量控制。中国药典规定,穿心莲药材中含穿心莲内酯和脱水穿心莲内酯的总量不得少于0.80%^[1],基于这一要求,采用该方法可有效控制生产用药材的质量,为后期生产穿心莲制剂提供

可靠的保证。由HPLC法测定结果可知,穿心莲中穿心莲内酯及脱水穿心莲内酯含量差异较大。从不同批号穿心莲的测定结果来看,以叶多茎少色鲜者为佳,存放时间越长,含量则越低,因此,制剂原料及饮片最好用当年产新药材,这与前人的报道^[8-9]的结果相符。

参考文献

- [1] 中国药典委员会. 中华人民共和国药典一部[M]. 北京: 中国医药科技出版社, 2010: 251-252.
- [2] 颜玉贞, 谢培山. 穿心莲质量控制的再评价[J]. 中药新药与临床药理, 1998, 9(4): 204-206.
- [3] 肖树雄, 王晓钰, 郑剑红. 穿心莲的成分及其分析方法研究概况[J]. 中国药师, 2002, 5(11): 693-694.
- [4] 李志亨, 路新华, 龙晓英, 等. 穿心莲总内酯的研究进展[J]. 时珍国医国药, 2012, 23(11): 2854-2857.
- [5] 陈丽霞, 曲戈霞, 邱峰. 穿心莲二萜内酯类化学成分的研究[J]. 中国中药杂志, 2006, 31(19): 1594.
- [6] 龚宁波, 吕丽娟, 刘超, 等. 不同茎叶比例的穿心莲药材中穿心莲内酯与脱水穿心莲内酯的X射线衍射定量分析方法的探讨[J]. 药学报, 2010, 45(5): 673-676.
- [7] 江冬青, 罗晓红, 谢智颖, 等. 穿心莲临床药理研究概况[J]. 国际中医中药杂志, 2013, 35(11): 1030-1032.
- [8] 陈敏武, 徐德然, 王峥涛, 等. RP-HPLC法测定不同产地及采收期的穿心莲中穿心莲内酯、新穿心莲内酯的含量[J]. 中国药科大学学报, 1999, 30(4): 291-294.
- [9] 杨琳, 赵昕, 王锦, 等. HPLC法同时测定穿心莲中2种内酯的含量[J]. 中国药事, 2010, 24(7): 690-692.
- [10] 林朝展, 邓贵华, 祝晨蓁. HPLC同时测定穿心莲药材及其制剂中的6种内酯类成分[J]. 华西药理学杂志, 2011, 26(1): 67-70.
- [11] 林青, 匡艳辉, 黄琳, 等. 一测多评法测定穿心莲及其制剂中内酯类成分[J]. 中草药, 2012, 43(12): 2406-2411.
- [12] 吴爱群, 张国强. 穿心莲内酯提取工艺研究[J]. 河池学院学报, 2009, 29(5): 66-68.
- [13] 刘蕾, 许笑笑, 韩光. 均匀设计法优化穿心莲的提取工艺[J]. 河南大学学报(医学版), 2006, 25(4): 33-35.

Identification and Determination of Diterpene Lactone in *Andrographis paniculata* Nees by TLC and HPLC

LIAN Ruili¹, LI Yuwei¹, MA Xia¹, GENG Yuanbang², LIU Yonglu¹, ZHANG Guozu^{1,2}

(1. Animal Husbandry and Economy of Henan University, Zhengzhou, Henan 450046; 2. Henan Kangxing Pharmaceutical Company Limited, Zhengzhou, Henan 451464)

Abstract: With *Andrographis paniculata* as test material, andrographolide and dehydroandrographolide were identified by TLC, using chloroform-ethyl acetate-methanol(4:3:0.4) as the mobile phase and

doi:10.11937/bfyy.20171650

不同光照强度对蛹虫草 主要活性成分的影响规律

方华舟¹, 肖习明²

(1. 荆楚理工学院 生物工程学院, 湖北 荆门 448000; 2. 荆门市农业局, 湖北 荆门 448000)

摘 要:以优质蛹虫草菌株为试材, 分别以不同光照强度对蛹虫草发菌、转色、原基分化、子实体生长等阶段进行单因子对照试验, 比较不同阶段不同光照强度下的各蛹虫草试验组在蛋白质、多糖、虫草素、虫草酸等主要活性成分含量的差异及特点, 探索蛹虫草不同生长阶段的适宜光照强度及规律。结果表明: 蛹虫草发菌、转色、原基分化、子实体生长等阶段的光照强度分别约为 0~10、500~200、200~500、300~500 lx 时, 蛹虫草主要活性成分含量相对较高。说明不同生长阶段不同光照强度对蛹虫草主要活性成分的合成和积累可产生明显影响, 以各阶段相应适宜光照强度对蛹虫草进行栽培是保证和提高主要活性成分含量的重要措施之一。

关键词:蛹虫草; 光照强度; 蛋白质; 多糖; 虫草素; 虫草酸

中图分类号:S 567.3⁺5 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2017)24-0170-08

蛹虫草(*Cordyceps militaris* Link)属真菌界(*Fungi*)、双核菌亚界(*Bikarya*)、子囊菌门

(*Ascomycota*)、子囊菌纲(*Ascomycetes*)、粪壳菌亚纲(*Sordariomycetidae*)、肉座菌目(*Hypocreales*)、麦角菌科(*Clavicipitaceae*)、虫草属(*Cordyceps* Link)模式种, 又名北冬虫夏草、北虫草, 是我国宝贵的虫草资源^[1]。

第一作者简介:方华舟(1965-), 男, 本科, 教授, 研究方向为食用菌与农业微生物学。E-mail: 434761170@qq.com.

基金项目:湖北省教育厅重点科研资助项目(D 20126101); 湖北省荆门市科学技术局科研资助项目(YFYB2017003)。

收稿日期:2017-07-14

大量研究证实蛹虫草主要活性成分及医疗保健功效不仅与冬虫夏草相类似, 甚至虫草素等重要活性成分含量明显高于冬虫夏草, 因而引起人

2% 3,5-dinitrobenzoic acid ethanol-2 mol · L⁻¹ potassium hydroxide(1 : 1) as the chromogenic agent; and the content of andrographolide and dehydroandrographolide was detected by HPLC. The separation was carried out on a Hypersil BDS C₁₈ (4.6 mm × 250 mm, 5 μm) column with the mobile phase of methanol-water(65 : 35); the column temperature was at 30 °C; the detection wavelength of andrographolide and dehydroandrographolide were 225 nm and 254 nm, respectively. The results showed that andrographolide and dehydroandrographolide could be identified by TLC, the content of andrographolide and dehydroandrographolide in *Andrographis paniculata* could be accurately determined by HPLC. The established methods of TLC and HPLC might be a reliable and specific method with good reproducibility, which could be used as quality control method of *Andrographis paniculata*.

Keywords: *Andrographis paniculata* Nees; andrographolide; dehydroandrographolide; TLC; HPLC