

OPTIMASI DAN VALIDASI METODA PENGUJIAN WEDELOLAKTON SECARA KROMATOGRAFI CAIR KINERJA TINGGI DENGAN TEKNIK DETEKSI FLUORESENSI (KCKT – F)

Trisna Yuliana^{1*}, Yosi Aristiawan³, Iwan Hastiawan²,
Julia J. Kantasubrata³, Muljadji Agma²

¹Kopertis Wilayah IV Jabar – Banten, Bandung, Jawa Barat, Indonesia

²Universitas Padjadjaran, Bandung, Jawa Barat, Indonesia

³PPKimia – LIPI, Bandung & Serpong, Jawa Barat, Indonesia.

Email: *trisyuliana@yahoo.com

Diterima : 15 Desember 2011; Disetujui : 10 Januari 2012

ABSTRAK

Wedelolakton memiliki berbagai aktifitas biologis sehingga banyak digunakan untuk pengobatan berbagai penyakit. Dalam penelitian ini telah dikembangkan metoda analisis wedelolakton dalam ekstrak herbal *Eclipta alba L. Hask* sebagai kandidat bahan acuan *inhouse*. Penentuan kandungan wedelolakton dalam sampel uji dilakukan secara KCKT fasa terbalik menggunakan detektor fluoresensi (KCKT-F) dan campuran metanol : asam asetat 0,35% sebagai fasa gerak. Telah dilakukan juga validasi metoda terhadap penetapan wedelolakton ini. Paramater validasi yang dilakukan meliputi konfirmasi identitas (selektifitas), linieritas (rentang kerja), presisi, recovery, sensitifitas, batas deteksi dan kuantitasi. Analisis statistik data menunjukkan bahwa metoda ini cukup reproduksibel dan selektif untuk penentuan wedelolakton.

Kata kunci: Wedelolakton, KCKT-F, optimasi metode, validasi metode, batas konfidensi.

ABSTRACT

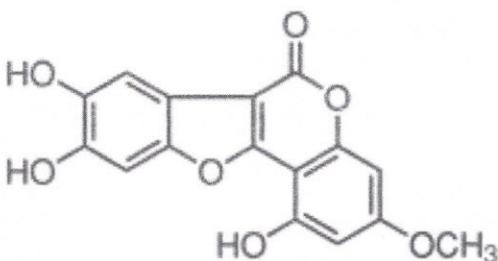
*Wedelolakton has a wide range of biological activities and used for the treatment of various ailments. In the present study an experiment of quantitative determination of wedelolactone in herbal extract of *Eclipta alba L. Hask* has been developed by using RP – HPLC – Fluorimetry technique and mixture methanol:0.35% acetic acid (H_2O) (50:50 v/v) as mobile phase, applied to the herbal extract as inhouse reference material candidate samples. The method was validated for the confirmation of identity (selectivity), linearity, precision, recovery, sensitivity, limit of detection*

and limit of quantitation. Statistical analysis of the data showed that the method is reproducible and selective for the estimation of wedelolactone determination.

Keywords: *Wedelolactone, HPLC-F, method optimization, method validation, confidence limit.*

PENDAHULUAN

Wedelolakton adalah senyawa organik turunan kumestan terkandung dalam tanaman *Eclipta alba L. Hask*. Struktur kimia wedelolakton diberikan pada Gambar 1. Wedelolakton merupakan marker bioaktif dari urang-aring yang paling banyak dicari oleh industri obat-obatan dan herbal karena memiliki berbagai fungsi. Dari hasil skrining farmakologi dari tumbuhan ataupun hasil sintesis diungkapkan bahwa wedelolakton mempunyai aktifitas sebagai antihepatotoksik⁽¹⁾, immunomodulator⁽²⁾, antioksidan⁽³⁾, anti radang⁽⁴⁾, penawar racun bisa ular⁽⁵⁻⁷⁾, penghambat virus hepatitis C⁽⁸⁾, analgesik⁽⁹⁾, antiosteoporetik⁽¹⁰⁾, menekan aktifitas dan pertumbuhan androgen dalam sel kanker prostat secara sinergis⁽¹¹⁾, efek farmakologis pada sistem saraf⁽¹²⁾, anti HIV⁽¹³⁾, dan anti bakteri⁽¹⁴⁾.



Gambar 1. Struktur kimia wedelolakton

Beberapa metoda penentuan wedelolakton telah dikembangkan. Teknik kromatografi lapisan tipis preparatif dengan deteksi menggunakan spektrofluorometer telah digunakan untuk menetapkan kandungan wedelolakton dalam ekstrak metanol urang aring⁽¹⁵⁾. Fasa gerak yang digunakan adalah campuran toluen : aseton : asam format (11 : 6 : 1) dengan fasa diam silika gel G. Pengukuran dengan spektrofluorometer dilakukan pada panjang gelombang eksitasi 384 nm dan panjang gelombang emisi 458 nm. Metoda spektrofotometri⁽¹⁶⁾ sudah dilakukan untuk penetapan kandungan wedelolakton. Pengukuran wedelolakton dilakukan pada panjang gelombang maksimum 351 nm. Teknik kromatografi lapisan tipis kinerja tinggi (KLTKT)⁽¹⁷⁾ untuk menetapkan kandungan wedelolakton sudah dilakukan dengan fasa gerak yang sama seperti yang digunakan oleh Patel & Mishra⁽¹⁵⁾. KLTKT dengan sistem deteksi fluoresensi telah dilakukan pada panjang gelombang 366 nm⁽¹⁸⁾. Pengembangan metoda KLTKT telah banyak dilakukan dengan jenis dan komposisi eluen yang berbeda⁽¹⁹⁻²²⁾. Penentuan wedelolakton dengan metoda kromatografi cair kinerja tinggi (KCKT) fasa terbalik dilakukan menggunakan teknik deteksi UV-Vis pada panjang gelombang 351 nm dan teknik elusi isokratik menggunakan metanol:asam asetat 0,5% dalam air dengan perbandingan 55:45 (v/v)⁽²³⁾. Teknik yang sama digunakan tetapi dengan sistem elusi berbeda yaitu sistem gradien dengan menggunakan pelarut MeOH:H₂O (0,1% asam asetat) dengan komposisi 10:90 hingga 80:20 (v/v) dalam waktu 40 menit⁽⁷⁾. Penentuan wedelolakton secara KCKT dengan teknik deteksi fluoresensi belum pernah dilaporkan. Oleh karenanya penelitian ini bertujuan untuk mengembangkan metoda penentuan wedelolakton dengan KCKT menggunakan detektor fluoresensi (KCKT-F).

BAHAN DAN METODA

Bahan

Bahan kimia yang digunakan adalah standar wedelolakton murni yang diperoleh melalui proses isolasi dari daun urang aring (*Eclipta alba L. Hask*) dan telah dikarakterisasi dengan ¹³C-NMR; ¹H-NMR; Spektrometri Massa. Metanol chromatography grade, asam asetat p.a., aquabidest dan disaring melalui sistem Millipore.

Peralatan

Peralatan yang digunakan adalah seperangkat alat KCKT dari Waters 2690 Alliance, kolom C18 (4,6 x 250 mm), dan detektor fluoresensi dari Waters 474, neraca analitik mikro merk Mettler Toledo AT 20 serta peralatan gelas lainnya.

Metoda

Persiapan ekstrak herbal sebagai kandidat bahan acuan wedelolakton (*inhouse*).

Kandidat bahan acuan wedelolakton berupa ekstrak dibuat dari daun *Eclipta alba L. Haask* dan dibuat dalam pelarut metanol. Sejumlah ekstrak ditimbang dengan teliti menggunakan neraca mikro sekitar 10 mg, kemudian diencerkan dalam sejumlah massa metanol. Konsentrasi wedelolakton dalam ekstrak dibuat sekitar 50 ug/g secara gravimetrik. Selanjutnya larutan kemudian dianalisis dengan KCKT-F

Optimasi metoda

Sebelum optimasi metoda dilakukan pertama-tama dilakukan optimasi terhadap sensitifitas detektor (*gain*) terlebih dahulu. Pada tahap ini dibuat variasi konsentrasi standar wedelolakton dengan rentang (10 – 100) ug/g menjadi 6 titik konsentrasi. Setiap deret konsentrasi standar diukur dengan dua *gain* yang berbeda (10x dan 1000x). Cara yang sama dilakukan dalam mengoptimasi panjang gelombang, bedanya setiap deret konsentrasi diukur dengan dua panjang gelombang eksitasi yaitu 384 nm dan 350 nm. Panjang gelombang emisi yang digunakan adalah 458 nm. Pada optimasi panjang gelombang, pengukuran dilakukan hanya dengan *gain* yang sudah optimum. Untuk mencari konsentrasi asam asetat optimum, dibuat 3 konsentrasi wedelolakton yang berbeda yaitu 10, 50 dan 100 ug/g. Larutan tersebut masing-masing diukur tiga kali ulangan dengan menggunakan campuran eluen yang konsentrasi asam asetatnya bervariasi (0,1; 0,2; 0,35; 0,5 dan 1%) dalam aquamillipore dan komposisi fasa gerak yang digunakan adalah metanol:asam asetat dengan perbandingan (50:50 v/v).

Validasi metoda

Konfirmasi identitas

Konfirmasi identitas wedelolakton dilakukan dengan metode KCKT menggunakan detektor *photometric diode array (PDA)* terhadap sampel ekstrak kandidat bahan acuan dan dibandingkan dengan standar wedelolakton. Setiap puncak yang timbul akibat pemisahan didalam sampel ekstrak kemudian diukur kurva serapan panjang gelombang maksimum. Kehadiran wedelolakton dievaluasi dengan membandingkan panjang gelombang puncak komponen target terhadap panjang gelombang puncak standar.

Linieritas (rentang kerja)

Dibuat kurva kalibrasi untuk melihat linieritas (daerah kerja), yaitu dengan cara membuat larutan standar wedelolakton dengan rentang konsentrasi 1 – 130 $\mu\text{g/g}$.

Presisi

Dilakukan penetapan konsentrasi wedelolakton di dalam sampel ekstrak herbal kandidat bahan acuan dengan enam kali pengulangan secara independen.

Batas deteksi dan batas kuantitasi pengukuran

Batas deteksi dan kuantitasi pertama tama ditentukan melalui perhitungan berdasarkan kurva kalibrasi yang diperoleh. Selanjutnya dilakukan verifikasi dengan cara membuat larutan standar dengan konsentrasi sebesar batas deteksi dan kuantitasi hasil perhitungan selanjutnya diukur dengan metode KCKT-F.

Perolehan kembali (*recovery*)

Dilakukan dengan cara menambahkan tiga tingkat konsentrasi standar wedelolakton (2000, 4000 dan 8000 $\mu\text{g/g}$) secara terpisah terhadap sampel ekstrak herbal kandidat bahan acuan yang diteliti. Campuran larutan dianalisis dengan KCKT-F dengan tiga kali ulangan secara independen untuk setiap tingkat konsentrasi.

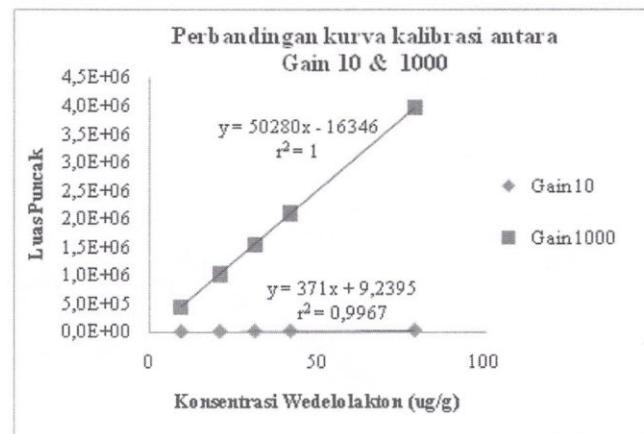
HASIL DAN PEMBAHASAN

Optimasi Metode KCKT – F.

Sensitifitas detektor (*gain*)

Penggunaan *gain* 1000x lebih baik bila dibandingkan dengan *gain* 10x. Hal ini dapat

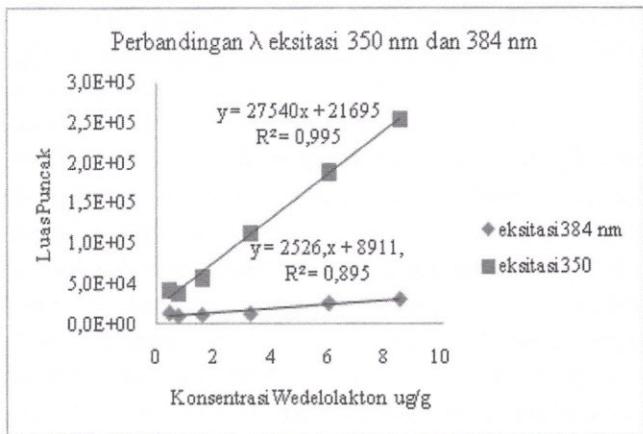
dilihat pada kurva dengan menggunakan *gain* 1000x menunjukkan sensitifitas yang lebih tinggi (Gambar 2). Sensitifitas kurva ditunjukkan oleh nilai slope kurva kalibrasi. *Gain* 1000 pun menunjukkan kinerja yang lebih baik bila dilihat dari nilai koefisien korelasi (r^2). Nilai r^2 untuk *gain* 1000x sebesar 1 dan r^2 untuk *gain* 10x sebesar 0,9967. Bila ditinjau dari simpangan baku relatif untuk slope yang diperoleh dari 6 seri konsentrasi⁽²⁴⁾, *gain* 1000x pun menunjukkan kinerja lebih baik. Nilai simpangan baku relatif slope untuk *gain* 1000 sebesar 0,3% lebih kecil bila dibandingkan untuk *gain* 10 (3,3%).



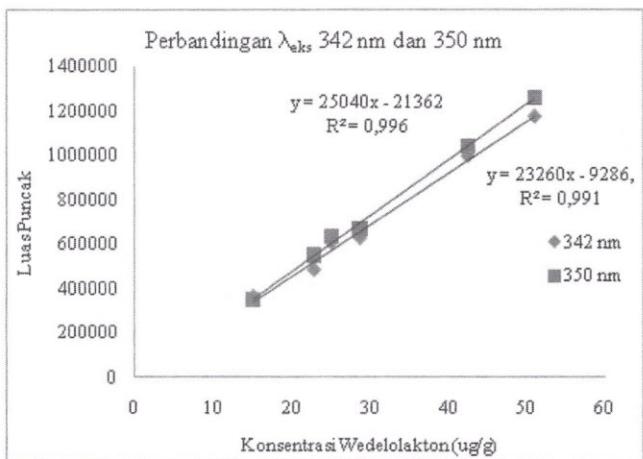
Gambar 2. Grafik perbandingan nilai *gain*

Optimasi Panjang Gelombang Eksitasi

Pengukuran panjang gelombang maksimum wedelolakton dengan spektrofotometer diperoleh data 350 nm. Saat pengukuran panjang gelombang dengan spektrofluorometer diperoleh data panjang gelombang eksitasi maksimum 342 nm dan panjang gelombang emisi 458 nm. Dari literatur diperoleh data panjang gelombang eksitasi untuk wedelolakton 384 nm dan panjang gelombang emisi 458 nm⁽¹⁵⁾. Oleh karena itu pada penelitian ini dilakukan konfirmasi terhadap tiga panjang gelombang eksitasi 350, 342 dan 384 nm untuk memperoleh panjang gelombang eksitasi yang optimum. Panjang gelombang 350 nm merupakan panjang gelombang eksitasi optimum dalam penentuan wedelolakton dengan KCKT – F. Hal ini terlihat dari kurva kalibrasi dengan λ_{eks} 350 menunjukkan sensitifitas yang lebih baik bila dibandingkan dengan λ_{eks} 384 nm (Gambar 3). Hal yang sama ditunjukkan ketika λ_{eks} 350 nm dibandingkan terhadap λ_{eks} 342 nm (Gambar 4).



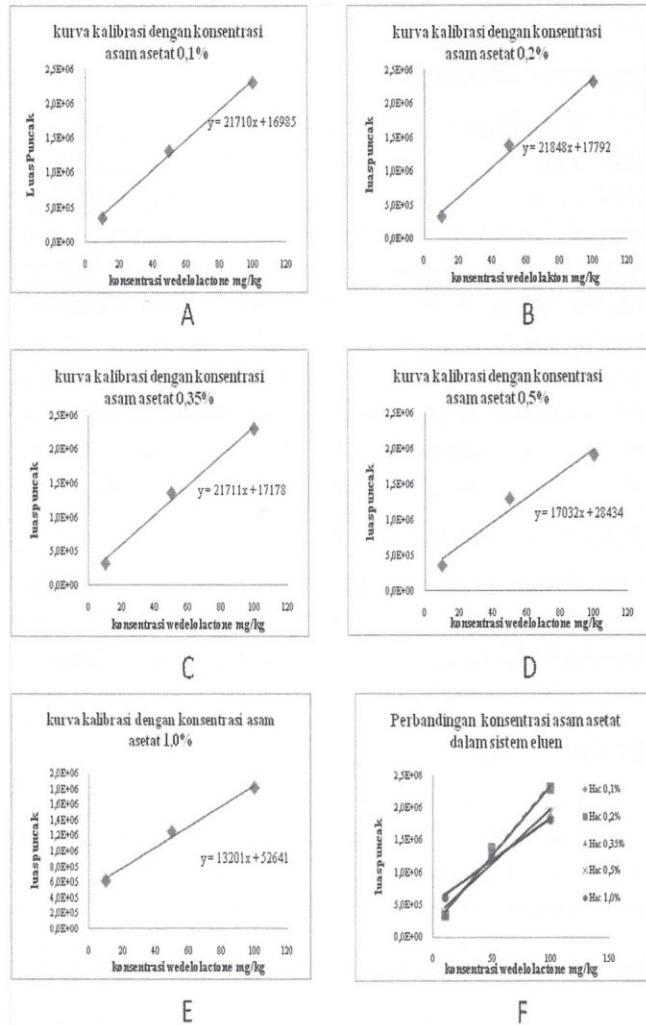
Gambar 3. Kurva kalibrasi dengan menggunakan λ_{eks} 350 nm dan 384 nm



Gambar 4 Kurva kalibrasi dengan menggunakan λ_{eks} 342 nm dan 350 nm

Optimasi Eluen

Untuk lima konsentrasi asam asetat yang dicobakan dibuat masing masing kurva antara luas puncak versus konsentrasi (Gambar 5A, 5B, 5C, 5D, 5E). Gambar 5F menunjukkan penggabungan 5 kurva perbandingan konsentrasi asam asetat dalam sistem eluen. Tiga konsentrasi asam asetat pertama (0,1; 0,2 dan 0,35%) menunjukkan perubahan luas puncak yang relatif sama terhadap perubahan konsentrasi. Hal ini terlihat dari nilai slope pada Gambar 5A, 5B dan 5C dan juga terlihat dari kurva tiga konsentrasi asam tersebut yang berhimpitan (Gambar 5F). Dari gambar tersebut pun terlihat tiga konsentrasi asam tersebut menunjukkan sensitifitas yang lebih baik bila dibandingkan dengan 2 konsentrasi asam asetat lainnya (0,5 dan 1,0%).

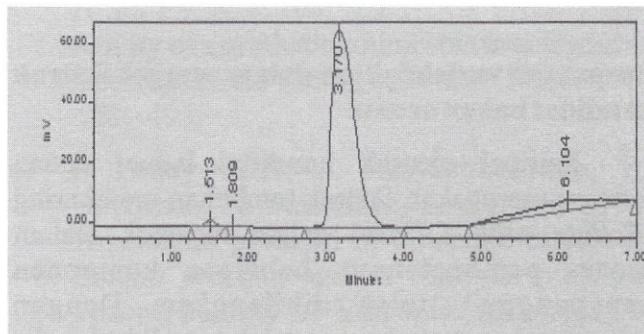


Gambar 5. Kurva perbandingan konsentrasi asam asetat dalam sistem eluen.

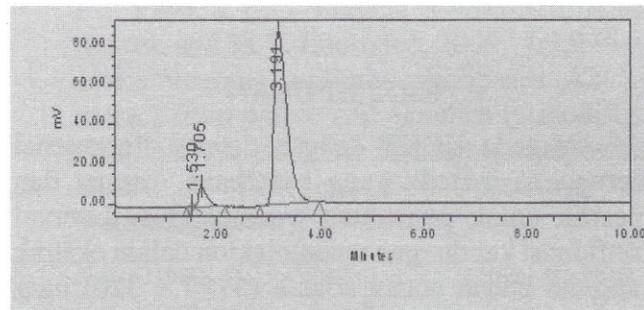
Dari Tabel 1. Konsentrasi asam asetat 0,2 dan 0,35% menunjukkan variasi yang cukup baik bila dibandingkan dengan tiga konsentrasi asam asetat lainnya (0,1; 0,5 dan 1,0%). Hal ini terlihat dari nilai rerata KV (0,4 dan 0,7%) yang diperoleh yang berasal dari tiga satuan konsentrasi wedelolakton yang berbeda yaitu 10; 50 dan 100 ug/g. Nilai rerata KV ini lebih baik dibandingkan dengan nilai rerata KV lainnya (3,4; 6,0 dan 26,6%). Nilai rerata KV untuk konsentrasi asam asetat 0,2% lebih baik bila dibandingkan dengan konsentrasi asam asetat 0,35%. Akan tetapi bila didasarkan pada bentuk kromatogram yang diperoleh (Gambar 6 dan 7) maka yang memberikan bentuk kromatogram yang paling baik adalah yang menggunakan asam asetat 0,35% sebagai campuran eluen. Oleh karenanya konsentrasi asam asetat 0,35% dianggap paling optimal sebagai campuran dalam sistem eluen.

Tabel 1. Variasi konsentrasi asam asetat (HAc) terhadap luas puncak.

Konsentrasi wedelolakton (ug/g)	HAc (%)	rerata luas puncak n=3	sd luas puncak	KV (%)	rerata KV (%)
10	0,1	3,51E+05	3,01E+04	8,6	
50	0,1	1,32E+06	1,42E+04	1,1	3,4
100	0,1	2,31E+06	1,56E+04	0,7	
10	0,2	3,34E+05	2,06E+03	0,6	
50	0,2	1,38E+06	4,90E+03	0,4	0,4
100	0,2	2,31E+06	5,50E+03	0,2	
10	0,35	3,31E+05	4,96E+03	1,5	
50	0,35	1,36E+06	7,35E+03	0,5	0,7
100	0,35	2,30E+06	4,08E+03	0,2	
10	0,5	3,63E+05	3,34E+04	9,2	
50	0,5	1,30E+06	6,16E+04	4,7	6,0
100	0,5	1,91E+06	7,87E+04	4,1	
10	1,0	6,21E+05	4,79E+04	77,0	
50	1,0	1,25E+06	2,58E+04	0,2	26,6
100	1,0	1,82E+06	4,73E+04	2,6	



Gambar 6. Kromatogram wedelolakton menggunakan konsentrasi asam asetat 0,25%



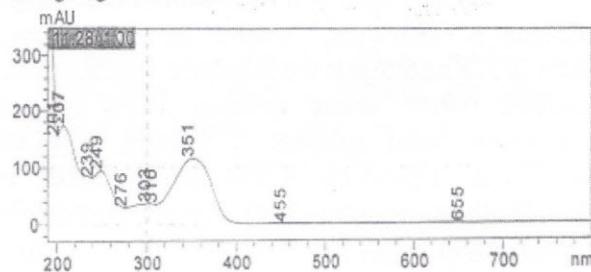
Gambar 7. Kromatogram wedelolakton menggunakan konsentrasi asam asetat 0,35%

Validasi metoda

Konfirmasi Identitas

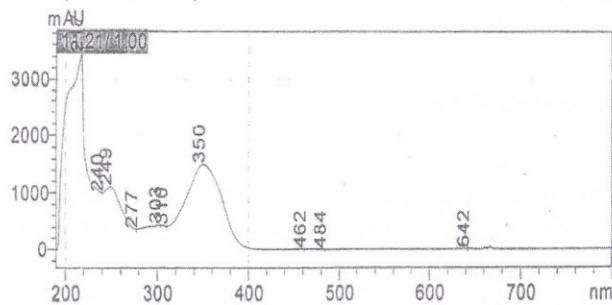
Konfirmasi identitas diperlukan untuk memastikan agar analit yang ditentukan di dalam ekstrak herbal kandidat bahan acuan adalah benar wedelolakton dan bukan senyawa lainnya. Untuk itu dilakukan analisis KCKT terhadap standar dan terhadap ekstrak herbal kandidat bahan acuan yang diteliti dengan detektor PDA. Puncak wedelolakton dalam sampel dikonfirmasi dengan membandingkan kurva serapan dari wedelolakton dalam sampel terhadap kurva serapan dari wedelolakton standar. Dari Gambar 8 dan 9 terlihat bahwa kurva serapan wedelolakton dalam sampel sesuai dengan kurva serapan standar wedelolakton.

Baku Langsung Wedelolakton



Gambar 8. Kurva serapan untuk puncak standar wedelolakton pada waktu retensi tR 11,281 menit

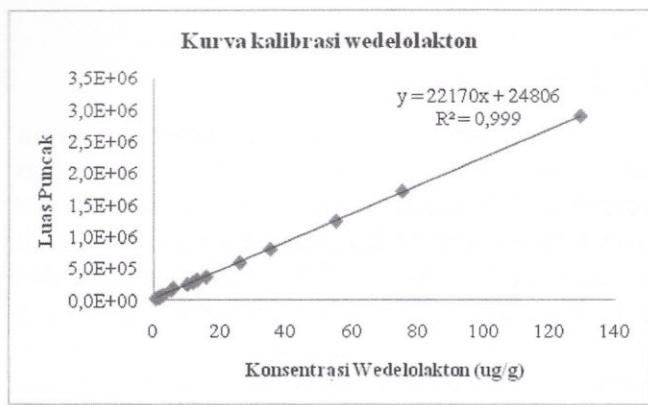
11.208 (Wedelolakton)



Gambar 9. Kurva serapan untuk puncak dengan waktu retensi tR 11,208 menit pada ekstrak herbal kandidat bahan acuan inhouse.

Rentang kerja analisis wedelolakton

Kurva kalibrasi antara luas puncak versus konsentrasi linier pada rentang 0,7 ug/g sampai 129,2 ug/g. Garis kalibrasi direpresentasikan dengan persamaan regresi linier $Y = 24806 + 22170X$ dengan nilai koefisien korelasi (r^2) = 0,9996 dan sensitifitas metode sebesar $(221,7 \pm 1,2) \times 10^2$ luas puncak/satuan konsentrasi (Gambar 10).



Gambar 10. Kurva kalibrasi standar wedelolakton

Presisi Metoda

Presisi metoda ditentukan dengan perolehan nilai KV hasil percobaan kemudian dibandingkan terhadap KV Horwitz⁽²⁵⁾ setelah dikalikan dengan faktor 2/3. Kandungan wedelolakton dalam ekstrak kandidat bahan acuan didapat 5750 ug/g dan simpangan baku sebesar 278 ug/g. KV hasil percobaan diperoleh 4,8% lebih besar bila dibandingkan dengan KV Horwitz-repeatabilitas (2,9%). Akan tetapi KV hasil percobaan ini masih cukup baik bila ditinjau dari nilai Horrat⁽²⁵⁾. Nilai Horrat merupakan rasio antara KV hasil percobaan dibagi dengan KV Horwitz-repeatabilitas. Nilai Horrat untuk penentuan wedelolakton dengan metoda KCKT-F adalah 1,7 lebih kecil dari 2.

Batas Deteksi dan Batas Kuantitasi

Batas deteksi dan kuantitasi perhitungan^(24,26) yang didasarkan pada persamaan kurva kalibrasi $Y = 24806 + 22170X$ masing masing sebesar 2,2 ug/g dan 7,2 ug/g. ICH Guide, 1996⁽²⁶⁾ mensyaratkan bahwa nilai hasil perhitungan tersebut perlu diverifikasi di laboratorium. Hasil percobaan di laboratorium untuk batas deteksi pengukuran adalah 0,3 ug/g dengan nilai KV sebesar 66,6% jauh lebih besar bila dibandingkan dengan KV Horwitz untuk repeatabilitas (12,8%). Sedang untuk batas kuantitasi pengukuran diperoleh nilai sebesar 0,7 ug/g dengan KV sebesar 7,7% relatif lebih kecil bila dibandingkan dengan KV Horwitz untuk repeatabilitas (11,2%). Hasil verifikasi menunjukkan baik batas deteksi maupun batas kuantitasi pengukuran lebih kecil dibandingkan dengan hasil perhitungan.

Recovery Metoda

Penetapan perolehan kembali (*recovery*) dilakukan dengan teknik adisi standar. Tiga tingkat konsentrasi ditambahkan pada sampel ekstrak kandidat bahan acuan. Masing masing level dibuat 3 kali pengulangan secara independen dan diukur 1 kali untuk setiap ulangannya. Persen perolehan kembali dapat dilihat pada Tabel 2.

Tabel 2. Hasil uji Recovery Wedelolakton

Wedelolakton perhitungan (ug/g)	Wedelolakton total hasil analisis (ug/g)	Wedelolakton dalam ekstrak sampel (ug/g)	Wedelolakton hasil pengukuran (ug/g)	Rerata recovery (%)	sd recovery (%)
2070,53	8221,03		2197,25		
2156,32	8030,84	6023,78	2007,06	101,94	7,68
2027,22	8185,29		2161,51		
4097,07	10204,42		4226,45		
4258,95	10252,42	5977,97	4274,45	103,88	3,93
4259,01	10582,94		4604,97		
8146,11	14631,97		8654,00		
7941,99	13542,78	5977,97	7564,81	103,18	6,93
7739,33	14340,76		8362,79		

Penentuan wedelolakton dalam sampel ekstrak kandidat bahan acuan.

Sampel ekstrak kandidat bahan acuan *inhouse* merupakan ekstrak tumbuhan urang aring (*Eclipta alba L.Hask*) dalam metanol. Dalam proses pembuatannya beberapa komponen pengganggu telah dihilangkan. Dengan menggunakan metode yang telah tervalidasi maka didapat interval konfidensi⁽²⁷⁾ kandungan wedelolakton dalam ekstrak sampel sebesar (5750 ± 320) ug/g (tingkat kepercayaan 95% dan db = 5)

KESIMPULAN

Metoda KCKT dengan deteksi fluoresensi merupakan metoda yang sederhana, cermat dan spesifik untuk penentuan wedelolakton. Interval konfidensi kandungan wedelolakton dalam ekstrak kandidat bahan acuan adalah (5750 ± 320) ug/g dengan tingkat kepercayaan 95%.

DAFTAR PUSTAKA

1. S.C. Franca, B.W. Bertoni, A.M.S. Pereira, 1995, Antihepatotoxic agent in micropropagated planlets of *Eclipta alba*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 40: 297–299.
2. M.G. Jayathirta, and S.H. Mishra, 2004, Preliminary immunomodulatory activities of methanol extracts of *Eclipta alba* and *Centella asiatica*. *Phytomedicine*, 11,(4), 361–365.
3. A.S. Majumdar, 2008, Preliminary studies on the antioxidant activity of *Tribulus terrestris* and *Eclipta alba*, *Pharmacognosy Magazine*, 4,(13), 102–107.
4. G. Arunachalam, N. Subramanian, G.P. Pazhani, and V. Ravichandran, 2009, Anti-inflammatory activity of methanolic extract of *Eclipta prostrata* L. (Asteraceae), *African Journal of Pharmacy and Pharmacology* 3(3), 097-100.
5. P.A. Melo, D.A. Pinheiro, H.D. Ricardo, F.F.A. Fernandes, M.A. Tomaz, C.Z. El-Kik, M.A. Strauch, T.F. da Fonseca, D.N. Sifuentes, S. Calil-Elias, C.D. Buarque, F.V. Brito, P.R.R. Costa, A.J.M. Da Silva, 2010, Ability of a synthetic coumestan to antagonize Bothrops snake venom activities, *Toxicon* 55, 488–496.
6. P. Phitayanukul, S. Laovachirasuwan, R. Bavovada, N. Pakmanee, R. Suttisri, 2004, Antivenom potential of butanolic extract of *Eclipta prostrata* against Malayan pit viper venom, *Journal of Ethnopharmacology* 90, 347–352.
7. L.C. Diogo, S.R. Fernandes, S. Marcussi, D.L. Menaldo, P.G. Roberto, P.V.F. Matrangulo, P.S. Pereira, S.C. Franca, S. Giulietti, A.M. Soares, and M.V. Lourenco, 2009, Inhibition snake venoms and phospholipases A2 by extract from native and genetically modified *Eclipta alba*: isolation of active compound, *Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology*, 104, 293–299.
8. N.K. Basu, A.B. Waffol T.T. Talele, A. Basu, P.R.R. Costa, A.J.M. da Silva, S.G. Sarafianos, and F. Noel, 2008, Identification and characterization of coumestans as novel HCV NS5B polymerase inhibitors, *Nucleic Acids Research*, 36, (5), 1482–1496.
9. M. Sawant, J.C. Issac and S. Narayanan, 2004 Analgesic Studies on Total alkaloids and alcohol extracts of *Eclipta alba* (Linn.) Hask. *Phytother.Res.* 18 (2): 111–113.
10. S. Annie, R.G. Prabhu, S. Malini, 2006, Activity of *Wedelia calendulacea* Less. in post-menopausal osteoporosis, *Phytomedicine* 13, 43–48.
11. F.M. Lin, L.R. Chen, E.H. Lin, F.C. Ke, H.Y. Chen, M. Tsai, and P.W. Hsiao, 2007, Compound from *Wedelia chinessnsis* synergistically suppress androgen activity and growth in prostate cancer cells, *Carcinogenesis* 28(12), 2521–2529.
12. T. Prakash, N.R. Rao A.H.M.V. Swamy, 2008, Neuropharmacological studies on *Wedelia calendulacea* Less stem extract, *Phytomedicine* 15, 959–970.
13. S. Tewtrakul, S. Subhadhirasakul, S. Cheenpracha, and C. Karalai, 2007, HIV-1 Protease and HIV-1 integrase inhibitory substances from *Eclipta prostrate*, *Phytotherapy research*, 21, 1092–1095.
14. S. Dalal, S.K. Kataria, K.V. Sastry, S.V.S. Rana, 2010, Phytochemical screening of methanolic extract and antibacterial activity of active principles of hepatoprotective herb, *eclipta alba*, *Ethnobotanical Leaflets* 14: 248–58.
15. M.B. Patel, & S.H. Mishra, 2006, A Simple Spectrofluorometric estimation of wedelolakton in methanol extract of *Eclipta alba*, *Pharmacognosy Magazine* 2, (7), 168 – 171.
16. Pallavi Rai, & S.H. Mishra, 2007, Development of a simple and sensitive spectrophotometric method for the simultaneous determination of asiaticoside and wedelolakton in a polyherbal formulation, *Pharmacognosy Magazine* 2, (7), 47–51.
17. K.P. Unnikrishnan, Anu Fhatima, K.M. Hashim, I. Balachandran, 2007, Antioxidant Studies and Determination of Wedelolakton in

- Eclipta Albae, Journal of Plant Sciences 2(4):459-464.
- 18. R.M. Thorat, V.M. Jadhav, V.J. Kadam, S.S. Kamble, K.P. Salaskar, 2009, Development of HPTLC method for estimation of Wedelolakton, Quercetin and Jatamason in Polyherbal Formulation, International Journal of ChemTech Research CODEN (USA), 1 (4), 1079-1086.
 - 19. M.D. Phale, P.D. Hamrapurkar, M.A. Chachad, 2010, Precise and Sensitive HPTLC Method for Quantitative Estimation of Wedelolactone in Eclipta Alba Hassk, Pharmacophore, 1 (2), 103-111.
 - 20. N.S. Wani, T.A. Desmukh, V.R. Patil, 2010, A Rapid Densitometric Method for Quantification of Wedelolactone in Herbal Formulation using HPTLC, J. Chem. Metrol. 4(1), 28-33.
 - 21. K. Savita, K. Prakashchandra, 2011, Optimization of Extraction Conditions and Development of Sensitive HPTLC Method for Estimation of Wedelolactone in different extracts of Eclipta alba, International Journal of Pharmaceutical Sciences and Drug Research, 3(1): 56-61.
 - 22. M.N. Prajapati, T.A. Deshmukh, V.R. Patil, B.K. Shrikhande, 2011, Development and Validation of HPTLC Method for Simultaneous Determination of Wedelolactone and Phyllanthin in Hepasuport Tablet, Der Pharmacia Sinica, 2(4):140-147.
 - 23. H. Yuan, Yunli, Zhao, Xiaoying, Wang, Qian Tang, Xiaoxia Gao, Zhiguo Yu, 2007, Simultaneous determination of *wedelolactone* and isodemetyl-*wedelolactone* in herba eclipta by reverse-phase high performance liquid chromatography, Se Pu, 25(3), 371-373.
 - 24. K. Danzer 2010, Analytical Chemistry, Theoretical and Metrological Fundamentals, Springer-Verlag, Berlin Heidelberg.
 - 25. AOAC, 2000, Official Methods of Analysis of AOAC International, 17 th ed, AOAC International, Gaithersburg, Maryland, USA.
 - 26. ICH-Q2B, 1996, Validation of Analytical Procedures: Methodology, Guidance for Industry, International Conference of Harmonization, Geneva.
 - 27. T. Farrant, 1997, Practical Statistic for the Analytical Scientist, The Royal Society of Chemistry, LGC Teddington, Cambridge.