

Định lượng wedelolactone trong cao đặc cỏ mực *Eclipta prostrata* L. (Asteraceae) bằng phương pháp sắc ký lỏng hiệu năng cao

Cát Huy Khôi* và Phan Nguyễn Thu Xuân

Trường Đại học Quốc Tế Hồng Bàng

TÓM TẮT

Đặt vấn đề: Nhóm hợp chất flavonoid trong dược liệu cỏ mực (*Eclipta prostrata* L.) có hoạt tính kháng khuẩn, kháng nấm, cầm máu, giải độc gan,... Có nhiều phương pháp định lượng hợp chất flavonoid toàn phần ở Việt Nam và trên thế giới, riêng dược liệu cỏ mực và các dạng bào chế chiết xuất từ dược liệu cỏ mực có thể được định lượng flavonoid toàn phần bằng phương pháp đo quang hoặc định lượng wedelolactone bằng phương pháp HPLC với pha động methanol: acid acetic 0.5% với mục đích đánh giá chất lượng nguyên liệu hay cao định chuẩn chiết từ dược liệu này. Vì vậy việc xây dựng và thẩm định quy trình định lượng wedelolactone trong cao đặc cỏ mực là cần thiết. **Nghiên cứu này** tiến hành xây dựng và thẩm định quy trình định lượng wedelolactone trong cao cỏ mực bằng phương pháp HPLC, đầu dò UV – Vis. **Mục tiêu:** Xây dựng và thẩm định quy trình định lượng wedelolactone trong cao đặc cỏ mực bằng phương pháp HPLC. **Đối tượng và phương pháp nghiên cứu:** Cao đặc cỏ mực, tiến hành xây dựng và thẩm định quy trình định lượng wedelolactone trong cao đặc cỏ mực bằng phương pháp HPLC. **Kết quả:** Bằng phương pháp sắc ký lỏng hiệu năng cao (HPLC) với điều kiện sắc ký: HPLC Shimadzu Prominence-i LC-2030, Cột sắc ký: Shimadzu C18 (250 x 4.6 mm, 5 μ m). Dung môi pha động: methanol - nước acid acetic 0.5% 70:30 (TT/TT), kiểu rửa giải: đẳng dòng, tốc độ dòng: 1.0 mL/phút, thể tích tiêm mẫu: 20 μ L, bước sóng phát hiện: 350 nm. Đã xây dựng được quy trình định lượng với các tiêu chí: Tính tuyến tính của phương pháp đạt trong khoảng nồng độ 2 – 15 μ g/mL. Giới hạn phát hiện (LOD) là 0.15 μ g/mL, giới hạn định lượng (LOQ) là 0.45 μ g/mL. Độ chính xác có RSD (%) = 1.162%. Độ đúng của phương pháp được xác định bằng % tỷ lệ phục hồi trong khoảng: 99.58 % - 100.53%. **Kết luận:** Do đó có thể áp dụng phương pháp này để định lượng Wedelolactone trong cao đặc cỏ mực.

Từ khóa: cỏ mực, *Eclipta prostrata* (L.), wedelolactone, HPLC

1. ĐẶT VẤN ĐỀ

Cỏ mực có tên khoa học là *Eclipta prostrata* L. từ lâu đã được sử dụng trong dân gian làm thuốc bổ máu, cầm máu, có tác dụng giải độc gan, bổ thận, ... Một trong những thành phần có hoạt tính sinh học quan trọng có tác dụng chữa bệnh của cỏ mực là wedelolactone. Cao đặc thường được ứng dụng làm nguyên liệu đầu vào sản xuất các dạng bào chế như viên nang, viên nén, siro thuốc,... với ưu điểm: dễ dàng lưu trữ, vận chuyển và hàm lượng hoạt chất trong cao thường cao hơn nhiều so với dịch chiết. Từ một số tài liệu có liên quan đến hợp chất flavonoid toàn phần bài báo hướng đến định lượng hàm lượng flavonoid toàn phần trong cao đặc cỏ

mực bằng phương pháp HPLC [1-3]. Việc kiểm tra hàm lượng thành phần có trong dược liệu là bước quan trọng, cần thiết để đánh giá chất lượng nguồn nguyên liệu đầu vào trong sản xuất, cũng như định lượng hàm lượng hoạt chất có trong các chế phẩm lưu hành trên thị trường. Mục tiêu nghiên cứu là xây dựng và thẩm định quy trình định lượng wedelolactone trong cao đặc cỏ mực.

2. ĐỐI TƯỢNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Đối tượng nghiên cứu

Đối tượng: Cao đặc cỏ mực được cung cấp bởi bộ môn Bào Chế, Trường Đại học Quốc Tế Hồng Bàng [4].

Tác giả liên hệ: Cát Huy Khôi

Email: cathuykhoi@gmail.com

Chất chuẩn: Wedelolactone, độ tinh khiết: 99.27 % (Sigma - Aldrich).

Hóa chất: Methanol loại dùng cho HPLC, nước cất 2 lần, các dung môi hoá chất phù hợp với mục đích sử dụng.

Trang thiết bị: HPLC Shimadzu Prominence-i LC-2030, đầu dò UV, Cột sắc ký Shimadzu C18 (250 x 4.6 mm, 5 μ m), cân phân tích có độ chính xác 0.01mg, các dụng cụ thủy tinh chính xác sử dụng trong phòng thí nghiệm,...

2.2. Phương pháp nghiên cứu: [2, 3, 5, 6]

2.2.1. Điều kiện sắc ký lỏng hiệu năng cao (HPLC-UV)

+ Cột sắc ký: Shimadzu C18 (250 x 4.6 mm, 5 μ m)

+ Thành phần pha động: methanol – dung dịch acid acetic 0.5% với tỷ lệ 70:30 (TT/TT)

+ Tốc độ dòng: 1.0 mL/phút.

+ Bước sóng phát hiện: 350 nm

+ Nhiệt độ buồng cột: 35°C

+ Thể tích tiêm: 20 μ L.

2.2.2. Chuẩn bị mẫu

Mẫu thử: Cân 0.1000 gam mẫu cao đặc cỏ mực (độ ẩm 11.69%) cho vào cốc có mỏ 100mL, thêm khoảng 10 ml pha động, siêu âm trong 10 phút, chuyển dung dịch vào bình định mức 25 mL, tráng becher và thêm pha động vào bình định mức đến vạch, lắc đều. Sau đó hút 4 mL vào bình định mức 20 mL, thêm pha động đến vạch.

Mẫu trắng: pha động

Mẫu chuẩn: cân chính xác 10 mg chất chuẩn wedelolactone hòa tan bằng pha động trong bình định mức 10 mL được chuẩn gốc 1000 μ g/mL. Lấy chính xác 1 mL cho vào bình định mức 10 mL định mức thêm pha động ta được chuẩn thứ cấp 100 μ g/mL. Từ chuẩn thứ cấp, xây dựng dãy chuẩn làm việc theo Bảng 1:

Bảng 1. Dãy dung dịch chuẩn làm việc

STT	Thể tích hút (μ L)	Bình định mức (mL)	Nồng độ (μ g/mL)
1	200	10	2
2	400	10	4
3	600	10	6
4	800	10	8
5	1000	10	10
6	1200	10	12
7	1500	10	15

2.3. Thẩm định quy trình định lượng wedelolactone trong cao đặc cỏ mực bằng phương pháp HPLC theo hướng dẫn của ICH: [7]

2.3.1. Tính tương thích hệ thống

Lặp lại 6 lần tiêm dung dịch chuẩn 6 μ g/mL vào hệ thống sắc ký đã nêu. Ghi lại diện tích pic và thời gian lưu. Yêu cầu: giá trị RSD của thời gian lưu không quá 1% và của diện tích không quá 2%.

2.3.2. Tính đặc hiệu

Tiến hành tiêm mẫu trắng, mẫu thử và mẫu chuẩn vào hệ thống sắc ký. Yêu cầu:

- Sắc ký đồ mẫu trắng không xuất hiện pic có thời gian lưu tương ứng với thời gian lưu của pic wedelolactone trong mẫu chuẩn.

- Sắc ký đồ mẫu thử xuất hiện pic có thời gian lưu tương ứng với thời gian lưu của pic wedelolactone trong sắc ký đồ mẫu chuẩn. Trên sắc ký đồ mẫu thử pic wedelolactone tách khỏi hoàn toàn với các pic khác.

- Trong sắc ký đồ mẫu chuẩn và mẫu thử có pic wedelolactone giống nhau và có độ tinh khiết đạt yêu cầu (pic purity index ≥ 0.999).

2.3.3. Tính tuyến tính - khoảng xác định

Pha 7 dung dịch chuẩn có nồng độ lần lượt là 2, 4, 6, 8, 10, 12, 15 μ g/mL như Bảng 1. Tiến hành sắc ký các dung dịch trên, ghi nhận diện tích pic, vẽ đồ thị biểu diễn mối tương quan giữa nồng độ và diện tích pic, xác định phương trình hồi quy và hệ số tương quan, đánh giá tính thích hợp của phương trình hồi quy và ý nghĩa của các hệ số bằng công cụ Regression (MS – Excel 2017). Yêu cầu: hệ số $R^2 \geq 0.995$.

2.3.4. Giới hạn phát hiện (LOD) và giới hạn định lượng (LOQ):

$$\text{Giới hạn phát hiện: LOD} = 3,3 \times \frac{\sigma}{S}$$

$$\text{Giới hạn định lượng: LOQ} = 10 \times \frac{\sigma}{S}$$

Trong đó:

σ là độ lệch chuẩn của diện tích pic

S là độ dốc của đường chuẩn

2.3.5. Độ chính xác

Tiến hành sắc ký 6 mẫu thử cao khác nhau có nồng độ như yêu cầu. Tính hàm lượng wedelolactone có trong mẫu thử. Yêu cầu: Giá trị RSD (%) kết quả định lượng wedelolactone có trong các mẫu $\leq 2.0\%$.

$$\text{Hàm lượng Wedelolactone (\%)} = \frac{C_{\text{Wedelolactone thử}}}{m_{\text{cao đặc}} \times (100\% - \text{độ ẩm})} \times 25 \times 10^{-6} \times \text{ĐPL} \times C\% \times 100$$

Trong đó:

$C_{\text{wedelolactone thử}}$: Nồng độ Wedelolacton dựa theo đường chuẩn.

Bình định mức 25 ml

10^{-6} : đổi đơn vị từ μg sang g

ĐPL = 5

Độ ẩm cao đặc: 11.69%

C%: Độ tinh khiết của chất chuẩn (99.27%).

2.3.6. Độ đúng

Thêm vào mẫu thử một lượng chất chuẩn có hàm lượng bằng 80, 100, 120% hàm lượng wedelolactone có trong mẫu thử cao. Mỗi mẫu thực hiện 3 lần, tiến hành sắc ký các mẫu trên, xác định tỷ lệ thu hồi. Yêu cầu: Độ đúng hay tỷ lệ thu hồi của phương pháp phải nằm trong khoảng 98.0 – 102.0% và giá trị RSD $\leq 2.0\%$.

2.3.7. Định lượng wedelolactone

theo công thức (1): Định lượng wedelolactone trong mẫu cao theo quy trình đã xây dựng.

3. KẾT QUẢ - BÀN LUẬN

3.1. Tính tương thích hệ thống

Tiến hành tiêm lặp lại 6 lần dung dịch chuẩn wedelolactone có nồng độ 6 $\mu\text{g/mL}$ vào hệ thống HPLC, đầu dò UV – Vis. Kết quả như trong Bảng 2.

Bảng 2. Kết quả tính tương thích hệ thống

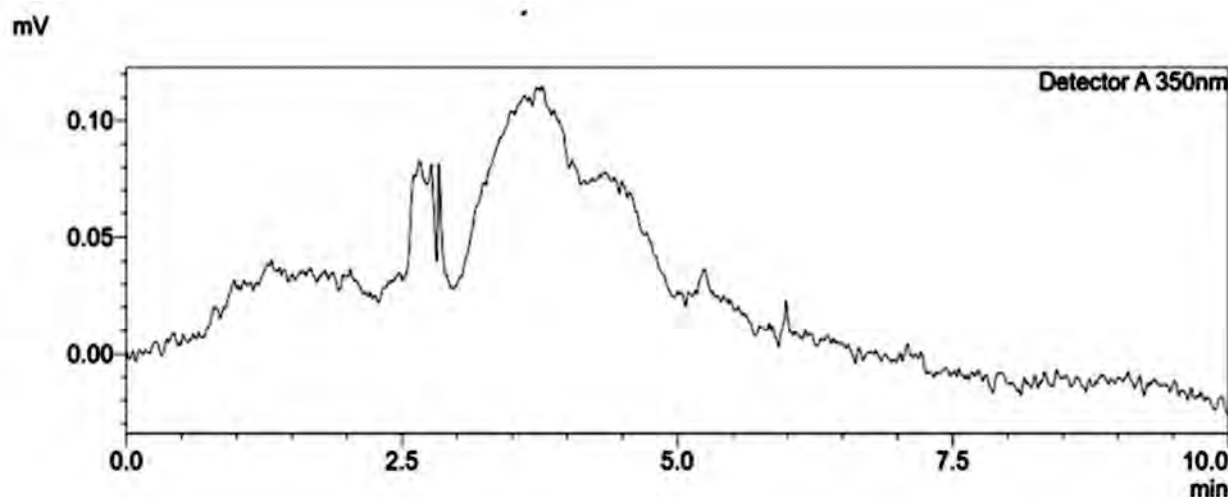
STT	Thời gian lưu t_R (Phút)	Diện tích pic
1	5.129	311653
2	5.076	314701
3	5.126	308698
4	5.078	313785
5	5.073	312654
6	5.131	309558
Trung bình	5.102	311841.5
RSD (%)	0.57	0.76

Giá trị RSD (%) của thời gian lưu là $0.57\% < 1\%$ và của diện tích pic là $0.76\% < 2\%$

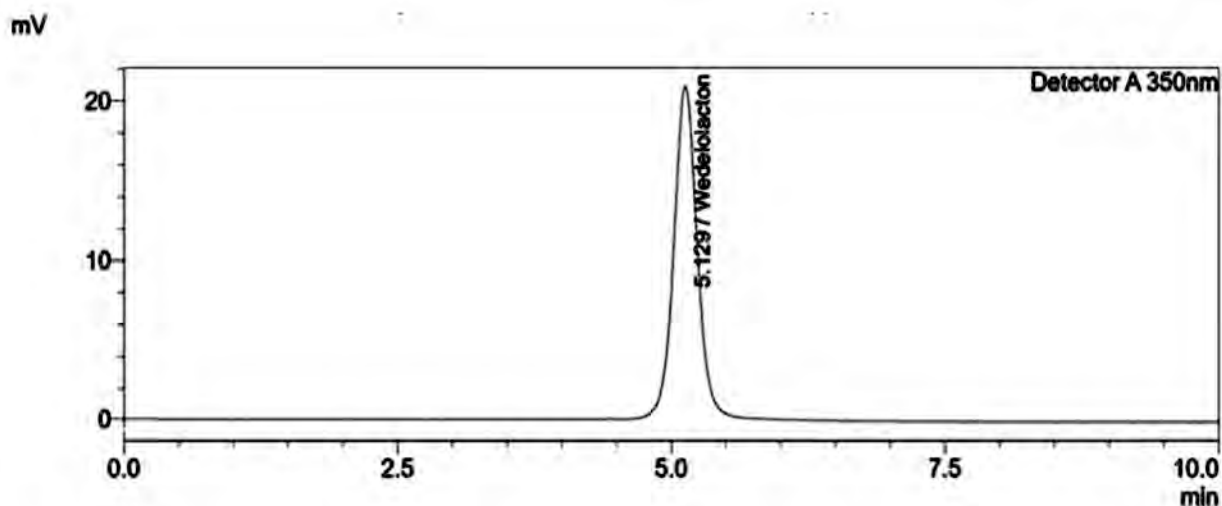
Nhận xét: Quy trình đạt tính tương thích hệ thống.

3.2. Tính đặc hiệu

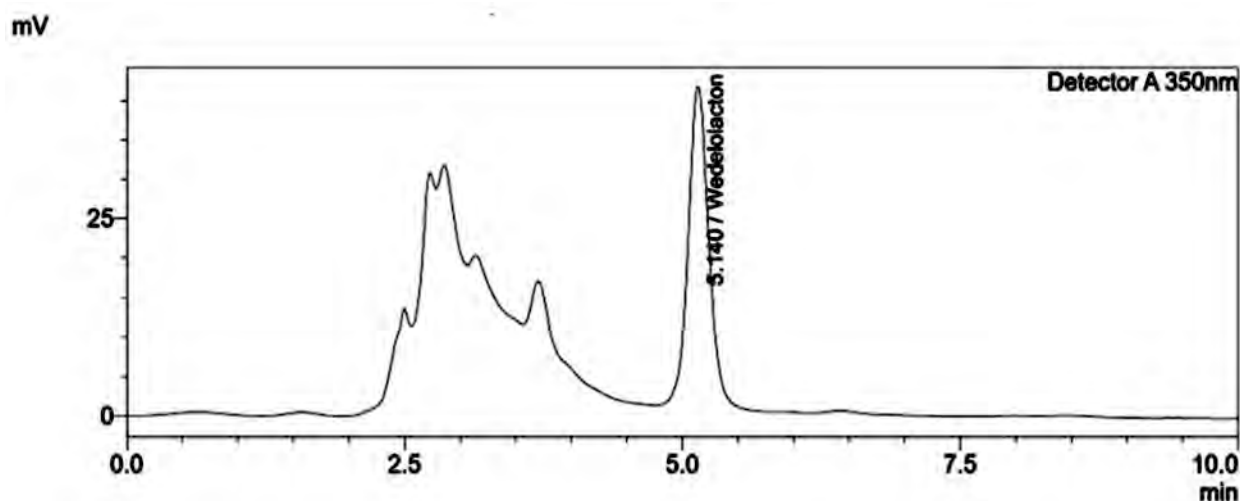
Sắc ký đồ của mẫu trắng, mẫu chuẩn và mẫu thử lần lượt được trình bày ở Hình 1, Hình 2 và Hình 3:



Hình 1. Sắc ký đồ mẫu trắng



Hình 2. Sắc ký đồ mẫu chuẩn



Hình 3. Sắc ký đồ mẫu thử

Nhận xét:

- Sắc ký đồ mẫu trắng không xuất hiện pic có thời gian lưu tương ứng với thời gian lưu của pic wedelolactone có trong mẫu chuẩn.
- Sắc ký đồ pic wedelolactone của mẫu thử có thời gian lưu tương tự với pic wedelolactone trong sắc ký đồ mẫu chuẩn.
- Phổ UV của pic wedelolactone trong sắc ký đồ

mẫu chuẩn và mẫu thử giống nhau.

- Độ tinh khiết của pic wedelolactone trong mẫu chuẩn và mẫu thử đạt yêu cầu.

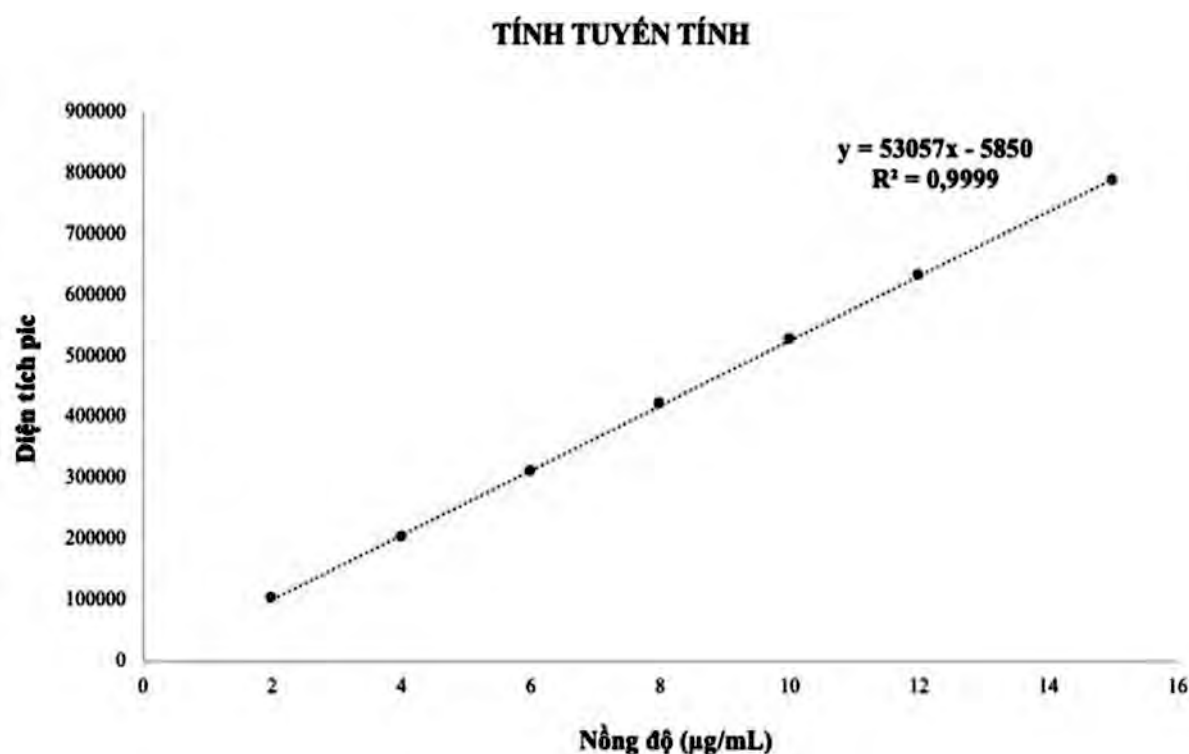
Kết luận: quy trình đạt yêu cầu về tính đặc hiệu.

3.3. Tính tuyến tính

Kết quả xác định phương trình hồi quy tuyến tính và hệ số tuyến tính được trình bày trong Bảng 3 và Hình 4.

Bảng 3. Số liệu Phương trình tuyến tính định lượng wedelolactone

STT	Nồng độ chuẩn (µg/mL)	Diện tích pic
1	2	101403
2	4	203191
3	6	311653
4	8	420815
5	10	526143
6	12	632600
7	15	787510



Hình 4. Đường biểu diễn mối tương quan tuyến tính giữa nồng độ và diện tích pic

Dùng công cụ Regression (MS-Excel) kiểm tra tính thích hợp của phương trình hồi quy và kiểm tra ý nghĩa của các hệ số hồi quy.

Phương trình thích hợp với độ tin cậy 95% ($P < \alpha = 0.05$).

$P_a = 1.993 \times 10^{-11} < \alpha = 0.05$. Hệ số a có ý nghĩa.

$P_b = 0.03 < \alpha = 0.05$. Hệ số b có ý nghĩa.

Kết luận: Bình phương hệ số tương quan $R^2 = 0.9999 > 0.995$ nên phương pháp định lượng wedelolactone đạt tính tuyến tính trong khoảng 2 – 15 µg/mL.

Phương trình hồi quy tuyến tính giữa nồng độ wedelolactone và diện tích pic có dạng:

$Y = 53057x - 5850$; $R^2 = 0.9999$.

3.4. Giới hạn phát hiện (LOD) và giới hạn định lượng (LOQ)

Sử dụng công cụ Data Analysis / Regression trong MS Excel ta có:

Độ lệch chuẩn của diện tích pic là: $\sigma = 2383.55$.

Độ dốc của đường chuẩn là: $S = 53057.27$.

Giới hạn phát hiện: $LOD = 3,3 \times \frac{\sigma}{S} = 0.15 \mu\text{g/mL}$.

Giới hạn định lượng: $LOQ = 10 \times \frac{\sigma}{S} = 0.45 \mu\text{g/mL}$.

3.5. Độ chính xác trung gian

Được thực hiện với 6 mẫu dung dịch thử (cao đặc cỡ mực) được thể hiện trong Bảng 4:

Bảng 4. Độ chính xác với wedelolactone trong mẫu thử cao đặc cỡ mực

STT	Khối lượng cân cao đặc (g)	Diện tích pic	Nồng độ Wedelolactone (µg/mL)	Hàm lượng Wedelolactone (%) trong cao đặc
1	0.1011	297046	5.708	0.793
2	0.0995	284627	5.475	0.773
3	0.1022	301832	5.798	0.797
4	0.1014	299812	5.761	0.798
5	0.0989	289103	5.559	0.790
6	0.0985	289011	5.557	0.793
Trung bình			5.643	0.791
RSD (%)				1.162

Kết luận: Độ lặp lại tốt $RSD(\%) = 1.162\% (< 2\%)$, quy trình đạt yêu cầu về độ chính xác trung gian. Thu được kết quả: hàm lượng Wedelolactone trong cao đặc là 0.791%.

3.6. Độ đúng

Thực hiện ở các mức nồng độ thêm chất chuẩn từ 80–120%.

Chuẩn bị mẫu thêm chuẩn: Cân 0.1000 gam mẫu cao đặc cỡ mực cho vào cốc có mỏ 100 mL, thêm

khoảng 10mL pha động, siêu âm trong 10 phút, chuyển dung dịch vào bình định mức 25 mL, tráng cốc có mỏ và thêm pha động vào bình định mức đến vạch, lắc đều. Sau đó hút 4 mL vào bình định mức 20 mL. Thêm V (mL) dung dịch chuẩn 100 ($\mu\text{g/mL}$) theo bảng 5. Thực hiện 9 lần chuẩn bị mẫu thêm chuẩn (mỗi nồng độ 3 mẫu). Tính toán % tỷ lệ phục hồi và đánh giá kết quả. Kết quả độ đúng được thể hiện trong Bảng 5.

Bảng 5. Kết quả khảo sát độ đúng đối với wedelolactone trong mẫu cao đặc cỡ mực

Mức chuẩn thêm vào (%)	Khối lượng cân cao đặc (g)	Nồng độ Wedelolactone ($\mu\text{g/mL}$) trong bình định mức 20 mL (~ nồng độ trong vial)	Thể tích chuẩn 100 $\mu\text{g/mL}$ (mL)	Nồng độ chuẩn sau khi đã thêm vào ($\mu\text{g/mL}$)	Diện tích pic thu từ sắc ký đồ	Nồng độ Wedelolactone theo đường chuẩn ($\mu\text{g/mL}$)	Tỷ lệ phục hồi (%)	Tỷ lệ phục hồi (%) Trung bình
80	0.1013	5.7003	0.9	4.5	534682	10.1878	99.72	100.14
	0.0987	5.5540	0.9	4.5	532328	10.1434	101.99	
	0.0992	5.5821	0.9	4.5	526007	10.0243	98.71	
100	0.1006	5.6609	1.1	5.5	592624	11.2798	101.16	99.58
	0.0989	5.5652	1.1	5.5	578206	11.0081	98.96	
	0.0995	5.5990	1.1	5.5	579022	11.0235	98.63	
120	0.0986	5.5483	1.3	6.5	641581	12.2026	101.37	100.53
	0.1003	5.6440	1.3	6.5	638179	12.1384	99.91	
	0.1018	5.7284	1.3	6.5	644030	12.2487	100.31	

Nhận xét: độ phục hồi trung bình của wedelolactone từ 99.58% - 100.53% độ phục hồi nằm trong khoảng cho phép từ 98% - 102%. Kết luận: quy trình đạt yêu cầu về độ đúng.

3.7. Định lượng

Kết quả định lượng cao đặc cỡ mực được theo quy trình đã được thẩm định được thể hiện qua bảng 6.

Bảng 6. Kết quả định lượng wedelolacton

Mẫu cao	m cân (g)	Diện tích pic	Hàm lượng Wedelolactone (%)	Trung bình	RSD (%)
1	0.1032	298046	0.780	0.788	1.037
2	0.0923	271627	0.796		
3	0.1123	328832	0.789		

Qua kết quả khảo sát hàm lượng Wedelolactone (%) trong cao đặc cỡ mực (có độ ẩm 11.69%) thu được kết quả là 0.788%. Hàm lượng Wedelolactone trong dược liệu tươi cỡ mực dao động từ 0.320 - 0.402% [8]. Từ kết quả định lượng: hàm lượng wedelolactone trong cao đặc cỡ mực cao gấp 2 lần so với dược liệu tươi.

4. KẾT LUẬN

Nghiên cứu này đã xây dựng và thẩm định

phương pháp phân tích, giúp định lượng Wedelolactone trong cao đặc cỡ mực bằng phương pháp HPLC đã đáp ứng các tiêu chí về: Tính tuyến tính của phương pháp đạt trong khoảng nồng độ 2 - 15 $\mu\text{g/mL}$. Giới hạn phát hiện (LOD) là 0.15 $\mu\text{g/mL}$, giới hạn định lượng (LOQ) là 0.45 $\mu\text{g/mL}$. Độ chính xác có $RSD\% = 1.162\%$. Độ đúng của phương pháp được xác định bằng % tỷ lệ phục hồi trong khoảng: 99.58% - 100.53%. Do đó có thể áp dụng phương pháp này để định

lượng Wedelolactone trong cao đặc cỏ mực.

Định hướng cho nghiên cứu tiếp theo: Khảo sát điều kiện chiết tách diterpenlactone từ một số loài có hàm lượng cao như các loài thuộc chi *Wedelia*

và phân tích định tính, định lượng wedelolactone chiết được bằng phương pháp sắc ký lỏng hiệu năng cao (HPLC, đầu dò UV - Vis) đã được xây dựng và thẩm định phương pháp.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

[1] Bộ Y Tế, Dược điển Việt Nam V, lần xuất bản thứ 5, tập 2, tr. 1117, Nxb Y học, 2017.

[2] Nguyễn Minh Túy, Phan Hiền Lương và Ngô Thanh Hoà, “Nghiên cứu định lượng wedelolactone trong cao khô dược liệu Cỏ nhọ nôi bằng phương pháp HPLC”, *Tạp chí Khoa học và Công nghệ Việt Nam*, 2015.

[3] Sunita Shailajan, Sasikumar Menon, Dipti Singh và Gauri Swar, “Validated analytical RP-HPLC method for quantitation of wedelolactone from *Eclipta alba* and marketed Ayurvedic formulations”, *Pharmacogn.J.*, 2016.

[4] Cát Huy Khôi, Nguyễn Ngọc Vân Anh, Nguyễn Thanh Đẹp, Trương Thuý Huỳnh và Nguyễn Thị Mai, “Định lượng flavonoid toàn phần trong cao đặc cỏ mực *Eclipta prostrata* L. (Asteraceae) bằng phương pháp quang phổ UV – VIS”, *Tạp chí Khoa học Trường Đại học Quốc tế Hồng Bàng*, số 27, 1/2024.

[5] H. A. Việt, D. T. Đ. Thanh, N. T. K. Oanh, N. H. L. Thuỷ và V. T. B. Huệ, “Tối ưu hóa quy trình thủy phân flavonoid và xây dựng quy trình định lượng flavonoid từ dịch chiết thủy phân lá trinh nữ hoàng cung bằng phương pháp HPLC”, *Tạp chí Y học TP. Hồ Chí Minh*, số 1, 2011.

[6] Bùi Hồng Cường và Nguyễn Thị Hoài, “Định lượng Sophoricosid trong cao đặc hoè giác bằng sắc ký lỏng hiệu năng cao”, *Tạp chí Dược liệu*, tập 26, số 4, 2021.

[7] ICH, Validation of analytical procedures Text and methodology Q2R1, 2005.

[8] Phạm Thị Lý, Nguyễn Trọng Chung và Nhữ Mai Thuật, “Đánh giá đặc điểm nông sinh học, năng suất, chất lượng của 30 mẫu giống cỏ nhọ nôi (*Eclipta prostrata* L.)”, *Tạp chí Khoa học và Công nghệ Trường Đại học Hùng Vương*, tập 30, số 1, 2023.

Quantitative wedelolactone in *Eclipta prostrata* L. (asteraceae) extracts using high performance liquid chromatography

Cat Huy Khoi and Phan Nguyen Thu Xuan

ABSTRACT

Background: Flavonoid compounds in the herb *Eclipta prostrata* L. exhibit antibacterial, antifungal, hemostatic, hepatoprotective, and detoxifying activities. Various quantitative methods for total flavonoid compounds exist in Vietnam and globally. Specifically, for *Eclipta prostrata* herbal material and its extracts, total flavonoid compounds can be quantified using spectrophotometric methods or by quantifying wedelolactone using HPLC with a mobile phase of methanol: 0.5% acetic acid. This aims to assess the quality of raw materials or standardized extracts derived from this herbal material. Therefore, the development and validation of a procedure for quantifying wedelolactone in *Eclipta prostrata* L. extracts are essential. This study focuses on establishing and validating a method for quantifying wedelolactone in *Eclipta prostrata* extracts using HPLC, UV – Vis detector. **Objective:** Constructing and validating a procedure for quantifying wedelolactone in concentrated *Eclipta prostrata* extracts using HPLC methodology. **Subjects and methods:** The concentrated extract of *Eclipta prostrata* is subject to the establishment and validation of a method for quantifying wedelolactone using HPLC methodology.

*Results: Using high-performance liquid chromatography (HPLC) methodology under the chromatographic conditions: Shimadzu Prominence-i LC-2030 HPLC system, equipped with a Shimadzu C18 column (250 x 4.6 mm, 5 μ m). The mobile phase consisted of methanol - 0.5% acetic acid solution in water at a ratio of 70:30 (v/v). The isocratic elution mode was employed, with a flow rate of 1.0 mL/min, an injection volume of 20 μ L, and a detection wavelength of 350 nm. A quantification method has been developed with the following criteria: Linearity was achieved within the concentration range of 2 – 15 μ g/mL. The limit of detection (LOD) was determined to be 0.15 μ g/mL, while the limit of quantification (LOQ) was 0.45 μ g/mL. The method's precision was assessed with a relative standard deviation (RSD) of 1.162%. The accuracy of the method was determined by % recovery within the range of 99.58 % - 100.53%. Conclusion: Therefore, it is feasible to apply this method for quantifying wedelolactone in concentrated *Eclipta prostrata* L. extracts.*

Keywords: *Eclipta prostrata* L., wedelolactone, HPLC

Received: 26/03/2024

Revised: 28/04/2024

Accepted for publication: 02/05/2024