

Định lượng catalpol trong củ giống Địa hoàng 19 thu hái ở Phú Thọ bằng sắc ký lỏng hiệu năng cao

Phạm Thanh Loan*

Viện Nghiên cứu Ứng dụng và Phát triển, Trường Đại học Hùng Vương, phường Nông Trang, TP Việt Trì, tỉnh Phú Thọ, Việt Nam

Ngày nhận bài 19/9/2022; ngày chuyển phản biện 22/9/2022; ngày nhận phản biện 3/10/2022; ngày chấp nhận đăng 7/10/2022

Tóm tắt:

Hoạt chất catalpol trong củ giống Địa hoàng 19 là thành phần hóa học quan trọng có tác dụng hạ đường huyết, lợi tiểu, nhuận tràng; dùng trong hỗ trợ điều trị bệnh đái tháo đường, thiếu máu não cục bộ, mất trí nhớ và được Dược điển Việt Nam V (2017) quy định làm chất đánh dấu để kiểm tra chất lượng dược liệu. Nghiên cứu này nhằm xây dựng quy trình định lượng catalpol trong củ giống Địa hoàng 19 bằng sắc ký lỏng hiệu năng cao (HPLC) để phục vụ công tác đánh giá chất lượng dược liệu. Kết quả đã lựa chọn được điều kiện sắc ký phù hợp là sử dụng cột gemini C18 (250x4,6 mm, 5 μ m), detector 210 nm, pha động acetonitrile - acid phosphoric 0,1%, tốc độ dòng 0,6 ml/phút. Diện tích pic và nồng độ catalpol có tương quan tuyến tính chặt ($r=0,9999$), dạng hàm $Y = 21887X + 26213$. Quy trình có độ đúng, độ lặp lại tốt với $RSD < 2\%$. Kết quả định lượng catalpol trong củ giống Địa hoàng 19 đạt 1,25%. Phương pháp HPLC được áp dụng là phù hợp để định lượng catalpol trong củ giống Địa hoàng 19.

Từ khóa: catalpol, địa hoàng 19, định lượng, sắc ký lỏng hiệu năng cao (HPLC).

Chỉ số phân loại: 1.6

1. Mở đầu

Giống Địa hoàng 19 được công nhận là giống mới và lưu hành ở Việt Nam từ tháng 8/2020 [1]. Ở Việt Nam nguồn giống và dược liệu Địa hoàng đều được nhập từ Trung Quốc, nên các mẫu nghiên cứu để đánh giá, xây dựng chất lượng cho dược liệu này cơ bản là được phân tích trên mẫu nhập nội [2-4]. Hiện tại, chưa có công bố đánh giá chất lượng dược liệu gây trồng từ giống Địa hoàng 19 tại Việt Nam. Hoạt chất catalpol là thành phần hóa học quan trọng, được Dược điển Việt Nam V năm 2017 [4] quy định làm chất đánh dấu để kiểm tra chất lượng dược liệu Địa hoàng. Hoạt chất catalpol thuộc nhóm iridoid glycosid, có tác dụng hạ đường huyết, lợi tiểu, nhuận tràng [5, 6], hỗ trợ điều trị bệnh thiếu máu não cục bộ, mất trí nhớ [7, 8]. Catalpol kích thích làm tăng sử dụng glucose thông qua tăng tiết β -endophin từ tuyến thượng thận và khả năng tổng hợp glycogen ở chuột đái tháo đường, do đó làm tăng sử dụng glucose để giảm đường huyết [9, 10]. Catalpol có tác dụng ức chế các phản ứng viêm trong tế bào hình sao thông qua ức chế hoạt động của nf-kB - yếu tố quyết định lớn đối với cơ chế chống viêm dây thần kinh [11]. Do vậy, hoạt chất catalpol đang được quan tâm nghiên cứu, phát triển thành nguyên liệu thuốc. Kết quả nghiên cứu góp phần xây dựng phương pháp đánh giá chất lượng dược liệu gây trồng từ giống Địa hoàng 19 tại Việt Nam.

*Email: loandhvh@gmail.com

2. Vật liệu và phương pháp nghiên cứu

2.1. Vật liệu

Mẫu nghiên cứu là củ trồng từ giống Địa hoàng 19 được thu hoạch tại xã Dân Quyền, huyện Tam Nông, tỉnh Phú Thọ vào tháng 3/2021, chế biến theo Dược điển Việt Nam V, chuyên luận Địa hoàng [4], mã số ĐH1901, mẫu được lưu tại Trung tâm Dược liệu, Viện Nghiên cứu Ứng dụng và Phát triển.

2.2. Hóa chất, nguyên liệu

Chất chuẩn catalpol đạt độ tinh khiết 98,2% (Chengdu Herbpurify, Trung Quốc), số lô RFS-Z0051180315, mẫu được lưu tại Trung tâm Dược liệu, Viện Nghiên cứu Ứng dụng và Phát triển. Các hóa chất khác gồm acetonitril (Merck), acid phosphoric (Merck), methanol (Merck), nước cất hai lần đạt tiêu chuẩn chạy máy HPLC.

2.3. Thiết bị, dụng cụ

Máy HPLC Shimadzu, cân điện tử (Thụy Sĩ).

2.4. Điều kiện sắc ký

Cột gemini C18 (250x4,6 mm, 5 μ m), detector ở bước sóng 210 nm, tốc độ dòng 0,6 ml/phút, thể tích tiêm 10 μ l, pha động acetonitril (ACN) - acid phosphoric 0,1% (5/95, v/v) [4].

Quantification of catalpol in root of *Rehmannia glutinosa* varieties 19 collected in Phu Tho province by high-performance liquid chromatography

Thanh Loan Pham*

Institute of Applied Research and Development,
Hung Vuong University, Nong Trang Ward, Viet Tri City, Phu Tho Province, Vietnam

Received 19 September 2022; revised 3 October 2022; accepted 7 October 2022

Abstract:

The active ingredient catalpol in the *Rehmannia glutinosa* variety 19 roots is an important chemical component. Catalpol has hypoglycemia, diuretic, and laxative effects; it is used to support the treatment of diabetes, ischemic cerebral, and dementia, and it is regulated by Vietnamese Pharmacopoeia V (2017) as a marker to check the quality of medicinal herbs. This study aimed to develop a procedure for quantifying catalpol in the root of *Rehmannia glutinosa* varieties 19 by high-performance liquid chromatography (HPLC) to evaluate the quality of medicinal herbs. The research results have selected suitable chromatographic conditions using the Gemini C18 column (250x4.6 mm, 5 μ m), detector at 210 nm, mobile phase acetonitrile - phosphoric acid 0.1%, and flow rate at 0.6 ml/min. The peak area and catalpol concentration have a strong linear correlation with $r=0.9999$, $Y = 21887X + 26213$. The procedure has good accuracy and repeatability with a relative standard deviation (RSD) <2%. Quantitative results of catalpol in the root of the *R. glutinosa* varieties 19 reached 1.25%. The HPLC method is suitable for quantifying catalpol in the root of *R. glutinosa* varieties 19.

Keywords: catalpol, high-performance liquid chromatography (HPLC), quantification, *Rehmannia glutinosa* varieties 19.

Classification number: 1.6

2.5. Dung dịch chuẩn

Hòa tan catalpol chuẩn trong methanol để được dung dịch có nồng độ 1000 μ g/ml.

2.6. Dung dịch thử

Tiến hành cân 0,8 g bột dược liệu, thêm 50 ml MeOH, cho trong bình, lắc đều rồi cân. Đưa mẫu vào chiết hồi lưu 1,5 giờ, để nguội và cân lại, rồi thêm MeOH vừa đủ đến lượng ban đầu, lắc đều, lọc qua màng 0,45 μ m [4].

2.7. Thẩm định quy trình định lượng

Thẩm định quy trình định lượng catalpol gồm các chỉ tiêu như độ thích hợp, độ đặc hiệu, độ lặp, tương quan tuyến tính, độ đúng, giới hạn phát hiện (LOD) và giới hạn định lượng (LOQ) theo Thông tư số 32/2018/TT-BYT của Bộ trưởng Bộ Y tế năm 2018 [12] và Quyết định số 07/2013/QĐ-QLD của Cục Quản lý Dược, Bộ Y tế [13].

Độ thích hợp: Chuẩn bị dung dịch catalpol chuẩn (nồng độ 200 μ g/ml), tiến hành sắc ký 6 lần. Xác định các thông số thời gian lưu (T_{lu}), diện tích pic (S_{pic}), giá trị bình quân, độ lệch chuẩn tương đối (RSD) của S_{pic} . Nếu $RSD < 2\%$ thì hệ thống có tính thích hợp cao [12, 13].

Độ đặc hiệu: Tiến hành phân tích các mẫu trắng, dung dịch catalpol chuẩn, dung dịch thử, dung dịch thử thêm chuẩn catalpol. Mẫu trắng phải không được cho tín hiệu phân tích [12, 13].

Độ lặp: Tiến hành sắc ký 6 lần đối với dung dịch thử. Nếu $RSD \leq 2\%$ thì quy trình có độ lặp tốt [12, 13].

Tương quan tuyến tính: Từ dung dịch chuẩn 1000 μ g/ml tiến hành pha 5 mẫu có nồng độ 25, 50, 100, 200 và 400 μ g/ml rồi tiến hành phân tích HPLC. Khảo sát sự tương quan của S_{pic} với nồng độ catalpol theo hàm $Y = aX + b$ bằng phương pháp bình phương tối thiểu. Nếu hệ số tương quan $r \geq 0,999$ thì quy trình định lượng có độ tuyến tính tốt [12, 13].

Độ đúng: Nghiên cứu sử dụng dung dịch thử làm dung dịch không thêm chuẩn. Dung dịch thêm chuẩn được tạo ra bằng việc lấy dung dịch thử và thêm một lượng catalpol chuẩn ở các nồng độ 10, 50 và 100 μ g/ml vào mẫu thử. Mỗi mức thêm chuẩn lặp lại 6 lần. Hàm lượng catalpol được tính dựa vào hàm $Y = aX + b$. Độ đúng phải nằm trong khoảng 98-102%, khoảng xác định có $RSD \leq 2\%$ [12, 13].

Giới hạn phát hiện (LOD) và giới hạn định lượng (LOQ): Dung dịch thử được pha loãng thành các mẫu LOD1, LOD2, LOD3, LOD4... Lần lượt tiêm 10 μ l từng mẫu vào hệ thống HPLC. Xác định tỷ lệ S/N (Signal to Noise ratio), S là chiều cao tín hiệu của chất catalpol, N là nhiễu đường nền. LOD được chấp nhận tại nồng độ có S/N=3. LOQ được chấp nhận tại nồng độ có S/N=10 [12-14].

3. Kết quả

3.1. Khảo sát quy trình định lượng

Quy trình định lượng catalpol được tiến hành khảo sát các điều kiện sắc ký trên hệ thống phân tích HPLC [4], kết quả đã lựa chọn điều kiện sắc ký phù hợp là sử dụng cột gemini C18 (250 $\times$ 4,6 mm, 5 μ m), detector 210 nm, pha động Acetonitril (ACN) - acid phosphoric 0,1% (5/95, v/v), tốc độ dòng 0,6 ml/phút, thể tích tiêm 10 μ l, thời gian phân tích 17,8 phút.

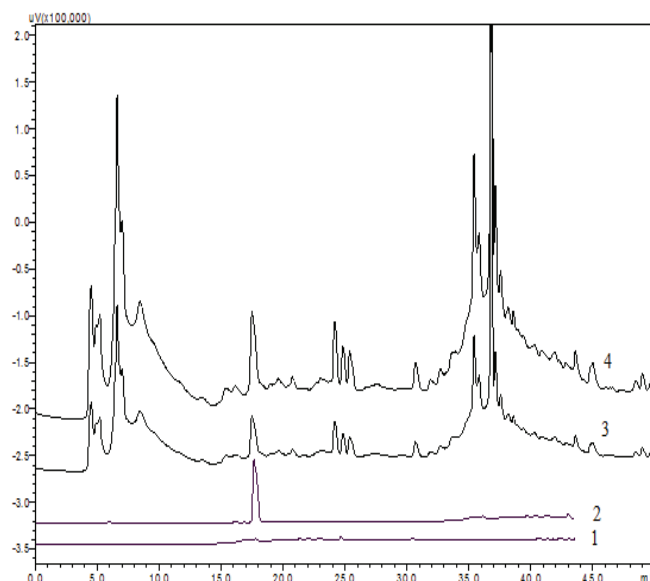
3.2. Thẩm định quy trình định lượng

Độ thích hợp: Kết quả đánh giá độ thích hợp của quy trình được tổng hợp trong bảng 1 cho thấy, độ lệch chuẩn tương đối của $T_{lưu}$ (RSD=0,17) và S_{pic} (RSD=0,21) đều <2%, hệ thống HPLC có tính thích hợp cao và đảm bảo độ ổn định của quy trình định lượng catalpol [13].

Bảng 1. Kết quả thẩm định tính thích hợp của hệ thống HPLC.

Thứ tự	Thời gian lưu (phút)	Diện tích pic (mAU.s)
1	17,9	4372062
2	17,93	4382001
3	17,95	4389020
4	17,88	4393934
5	17,87	4390001
6	17,91	4398390
Xtb	17,91	4387568
RSD (%)	0,17	0,21

Độ đặc hiệu: Kết quả đánh giá độ đặc hiệu của quy trình được thể hiện trên sắc ký đồ (SKĐ) ở hình 1 cho thấy, mẫu trắng (1) không cho pic nào trên SKĐ. Trên SKĐ dung dịch thử (3), dung dịch thử thêm chuẩn (4) cho một pic có thời gian lưu tương ứng so với của catalpol trên SKĐ dung dịch chuẩn (2), $T_{lưu}$ của catalpol ở 3 mẫu (2, 3, 4) là tương đương nhau (khoảng 17,8 phút). Quy trình định lượng và hệ thống HPLC có độ đặc hiệu cao [13].

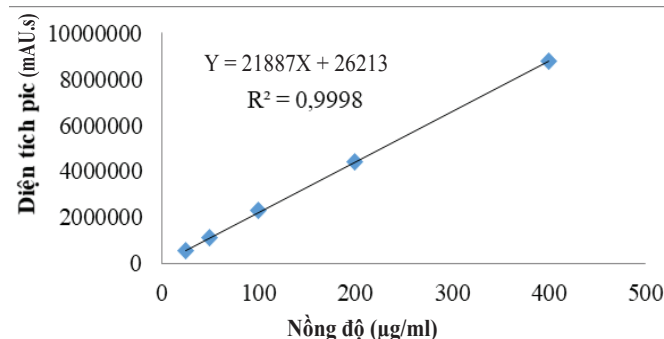


Hình 1. Sắc ký đồ đánh giá độ đặc hiệu của quy trình. 1: mẫu trắng; 2: dung dịch chuẩn catalpol; 3: dung dịch thử được liệu; 4: dung dịch thử được liệu thêm catalpol.

Tương quan tuyến tính: Kết quả đánh giá tương quan giữa S_{pic} với nồng độ catalpol cho thấy, chúng có tương quan tuyến tính rất chặt ($r=0,9999>0,9990$) và được mô phỏng bằng hàm $Y = 21887X + 26213$ [13] (bảng 2, hình 2).

Bảng 2. Tương quan giữa S_{pic} với nồng độ catalpol.

Nồng độ (μ g/ml)	25	50	100	200	400
S_{pic} (mAU.s)	548627	1091755	2291810	4385020	8776140
$Y = 21887X + 26213$					
$R^2=0,9998; r=0,9999$					



Hình 2. Đồ thị biểu diễn mối tương quan giữa S_{pic} với nồng độ catalpol.

Độ lặp: Độ lặp của quy trình được đánh giá qua 6 lần thử lặp mẫu, kết quả cho thấy, hàm lượng trung bình của catalpol trong mẫu được liệu Địa hoàng 19 là 1,249%, với RSD=0,59%<2% (bảng 3), như vậy quy trình có độ lặp cao [13].

Bảng 3. Kết quả đánh giá độ lặp lại dung dịch thử.

Chỉ tiêu	Lặp 1	Lặp 2	Lặp 3	Lặp 4	Lặp 5	Lặp 6
Khối lượng được liệu (mg)	0,820	0,881	0,813	0,842	0,818	0,836
Hàm lượng catalpol (%)	1,242	1,246	1,251	1,253	1,255	1,264
Hàm lượng trung bình (%)	1,249					
RSD (%)	0,59					

Độ đúng: Kết quả đánh giá độ đúng của quy trình cho thấy, tỷ lệ thu hồi catalpol đạt 98,13-100,4% (bảng 4) và nằm trong giới hạn cho phép (98-102%) với RSD 0,83-1,51% ($RSD \leq 2\%$) cho thấy quy trình có độ đúng cao [13].

Bảng 4. Độ đúng của quy trình.

Thực hiện	Nồng độ chuẩn thêm ($\mu\text{g/ml}$)	Nồng độ thu hồi ($\mu\text{g/ml}$)	Độ đúng (%)	RSD (%)
Trong ngày (n=6)	10	9,89	98,90	0,85
	50	49,85	99,70	0,94
	100	98,13	98,13	1,48
Các ngày liên tiếp (n=6)	10	9,84	98,40	1,06
	50	49,84	99,68	0,83
	100	100,40	100,40	1,51

LOD và LOQ của catalpol: Giá trị LOD và LOQ của catalpol đã được xác định tại nồng độ 2 $\mu\text{g/ml}$ cho tỷ lệ S/N là 3 ($LOD=2,0 \mu\text{g/ml}$), tại nồng độ 6,6 $\mu\text{g/ml}$ cho tỷ lệ S/N là 10 ($LOQ=6,6 \mu\text{g/ml}$).

4. Bàn luận

Quy trình định lượng catalpol được thực hiện bằng phương pháp HPLC có ưu điểm về độ nhạy cao, tính chính xác, độ tin cậy, dễ thực hiện, chi phí hợp lý. Hiện nay, tại Việt Nam, các trung tâm kiểm nghiệm và phòng kiểm nghiệm của các công ty dược phẩm đều được trang bị hệ thống phân tích HPLC. Do vậy quy trình này dễ áp dụng, có tính phổ biến cao trong thực tiễn kiểm nghiệm dược liệu, phục vụ công tác đánh giá chất lượng của cơ quan quản lý nhà nước và hoạt động sản xuất của các công ty dược phẩm.

Nghiên cứu đã tiến hành thẩm định quy trình định lượng catalpol, kết quả cho thấy, quy trình đạt tính thích hợp của hệ thống, độ đặc hiệu tốt, tương quan tuyến tính chặt ($r=0,9999$), tỷ lệ thu hồi cao (99,2%) và có độ đúng, độ lặp cao ($RSD < 2\%$), đáp ứng yêu cầu của Bộ Y tế [12, 13]. Kết quả này tương đồng với nghiên cứu của T.H. Won và cs (2010) [15] khi định lượng catalpol trong 21 mẫu củ Địa hoàng thu thập tại Trung Quốc, Hàn Quốc bằng HPLC

đã xác lập tương quan tuyến tính chặt giữa S_{pic} và nồng độ catalpol ($r=0,9985$), độ thu hồi đạt 100,1%, hàm lượng catalpol trung bình là 0,91%. C.Y. Guo và cs (2004) [16] cũng đã xác lập tương quan tuyến tính chặt ($r=0,9997$), độ thu hồi đạt 98,7% trong nghiên cứu định lượng catalpol trong củ Địa hoàng. Trong một nghiên cứu khác, Y. Wang và cs (2016) [17] đã định lượng catalpol trong lá cây Địa hoàng bằng HPLC, kết quả cho thấy có tương quan tuyến tính chặt ($r=0,9998$), độ thu hồi đạt 102,6%. Như vậy, phương pháp định lượng catalpol trong củ và lá Địa hoàng bằng HPLC là phù hợp.

Nghiên cứu này đã lựa chọn thành phần pha động, tỷ lệ acetonitril (ACN) - acid phosphoric 0,1% (5/95, v/v) là thích hợp, đơn giản và hiệu quả để xác định sự hiện diện và hàm lượng của catalpol bằng HPLC. Hệ dung môi dùng trong nghiên cứu khác biệt với hệ dung môi pha động được sử dụng trong một số nghiên cứu khác như nước - acetonitril (95/5, v/v) [17], nước - acetonitril (99,6/0,6, v/v) [16], nước - acetonitril (90/10, v/v) [15], etyl acetat - n-butanol - nước (2:1:3, v/v/v) [18].

Phương pháp chiết mẫu hồi lưu 1,5 giờ với methanol rồi lọc qua màng 0,45 μm được sử dụng trong nghiên cứu là đơn giản, tiết kiệm thời gian, chi phí thấp so với phương pháp chiết mẫu trong phân tích sắc ký đối dòng tốc độ cao là mẫu thử chiết hồi lưu 2 lần với ethanol 75%, được cô đặc và hòa tan lại trong nước rồi chiết xuất với etyl acetat và n-butanol [18].

Áp dụng quy trình xây dựng trong nghiên cứu vào định lượng catalpol của củ Địa hoàng 19 đã cho kết quả là hàm lượng catalpol đạt 1,25%, cao hơn gấp 6 lần theo quy định của Dược điển Việt Nam V (2017) (hàm lượng catalpol $\geq 0,2\%$) [4] và cao hơn 1,4 lần so với kết quả định lượng trong nghiên cứu của T.H. Won và cs (2010) [15]. Như vậy, dược liệu gây trồng đảm bảo chất lượng tốt, làm cơ sở để mở rộng gây trồng giống Địa hoàng 19 tại khu vực trung du miền núi phía Bắc, góp phần tạo nguồn nguyên liệu chất lượng tốt cho các công ty dược phẩm.

Hiện tại, chưa có các công bố của tác giả khác về xây dựng quy trình định lượng và đánh giá chất lượng dược liệu gây trồng từ giống Địa hoàng 19. Kết quả nghiên cứu này góp phần xây dựng quy trình định lượng catalpol cho dược liệu Địa hoàng 19 tại Việt Nam.

5. Kết luận

Nghiên cứu đã xây dựng được quy trình định lượng catalpol trong củ giống Địa hoàng 19 thu hái tại Phú Thọ bằng HPLC với điều kiện sắc ký cột gemini C18 (250x4,6 mm, 5 μm), detector 210 nm, pha động acetonitril - acid

phosphoric 0,1%, tốc độ dòng 0,6 ml/phút. Kết quả thẩm định quy trình cho thấy có sự tương quan tuyến tính chặt giữa S_{pic} và nồng độ chất dạng hàm $Y = 21887X + 26213$, $r=0,9999$. Quy trình có tính thích hợp hệ thống tốt với các thông số sắc ký đạt $RSD < 2\%$; độ đặc hiệu cao, độ lặp lại tốt với $RSD < 2\%$; LOD là 2 $\mu\text{g/ml}$, LOQ là 6,6 $\mu\text{g/ml}$, phù hợp để định lượng catalpol trong củ Địa hoàng 19.

LỜI CẢM ƠN

Kết quả nghiên cứu được tài trợ kinh phí từ đề tài độc lập cấp quốc gia, mã số ĐTĐL.CN-03/17. Tác giả xin chân thành cảm ơn.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- [1] Department of Crop Production, Ministry of Agriculture and Rural Development (2020), *Notification No. 909/TB-TT-CLT Dated on 31 July 2020 on Circulation of Rehmannia Glutinosa Varieties 19* (in Vietnamese).
- [2] N.B. Hoat, N.D. Thuan (2005), *Techniques for Growing, Using and Processing Medicinal Plants*, Agricultural Publishing House, pp.74-84 (in Vietnamese).
- [3] D.T. Loi (2012), *Vietnamese Medicinal Plants and Herbs*, Medical Publishing House, pp.837-841 (in Vietnamese).
- [4] Ministry of Health (2017), *Vietnam Pharmacopoeia V, Monograph Rehmannia Glutinosa*, Medical Publishing House, 1100pp (in Vietnamese).
- [5] R.X. Zhang, M.X. Li, Z.P. Jia (2008), “*Rehmannia glutinosa*, review of botany, chemistry, and pharmacology”, *Journal of Ethnopharmacology*, **117**(2), pp.199-214, DOI: 10.1016/j.jep.2008.02.018.
- [6] G.C. Liu, H.Q. Du, L. Liang (1992), “Determination of catalpol in *Rehmannia glutinosa* Libosch. by HPLC”, *Chinese Traditional and Herbal Drugs*, **23**(2), pp.71-73.
- [7] D.Q. Li, Y.L. Duan, Y.M. Bao, et al. (2004), “Neuroprotection of catalpol in transient global ischemia in gerbils”, *Neuroscience Research*, **50**(2), pp.169-177, DOI: 10.1016/j.neures.2004.06.009.
- [8] H. Yu, K. Hashi, T. Tanaka, et al. (2006), “*Rehmannia glutinosa* induces glial cell line-derived neurotrophic factor gene expression in astroglial cells via cPKC and ERK1/2 pathways independently”, *Pharmacological Research*, **54**(1), pp.39-45, DOI: 10.1016/j.phrs.2006.01.014.
- [9] J.P. Shieh, K.C. Cheng, H.H. Chung, et al. (2011), “Plasma glucose lowering mechanisms of catalpol, an active principle from roots of *Rehmannia glutinosa*, in streptozotocin-induced diabetic rats”, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **59**(8), pp.3747-3753, DOI: 10.1021/jf200069t.
- [10] W.J. Huang, H.S. Niu, M.H. Lin, et al. (2010), “Antihyperglycemic effect of catalpol in streptozotocin-induced diabetic rats”, *Journal of Natural Products*, **73**(6), pp.1170-1172, DOI: 10.1021/jn9008317.
- [11] J. Bi, B. Jiang, A. Zorn, et al. (2013), “Catalpol inhibits LPS plus IFN- γ -induced inflammatory response in astrocytes primary cultures”, *Toxicol. in Vitro*, **27**(2), pp.543-550, DOI: 10.1016/j.tiv.2012.09.023.
- [12] Ministry of Health (2018), *ASEAN Guidelines on The Appraisal of Analytical Processes, Circular 32/2018/TT-BYT Dated on 12 November 2018, on Regulating The Registration of Circulation of Drugs And Medicinal Ingredients* (in Vietnamese).
- [13] Drug Administration of Vietnam, Ministry of Health (2013), *Appendix 8 - Appraisal of Analytical Procedures by High-Performance Liquid Chromatography (HPLC), Dated on Decision No. 07/QĐ-QLĐ 11 January 2013, on Issuing Issuance of The Drug Registration Manual* (in Vietnamese).
- [14] International Council on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use (2005), *Validation of Analytical Procedures, Text, and Methodology*, Q2(R1), 17pp.
- [15] T.H. Won, S.K. Ryu, S.S. Kang, et al. (2010), “Simultaneous analysis of bioactive metabolites from *Rehmannia glutinosa* by HPLC-DAD-MS/MS”, *Natural Product Sciences*, **16**(2), pp.116-122.
- [16] C.Y. Guo, X.M. Bai, W.M. Zang, et al. (2004), “Determination of catalpol in dried rehmannia root and Taohong Siwu Decoction with high-performance liquid chromatography”, *Journal of Chinese Integrative Medicine*, **2**(2), pp.135-137, DOI: 10.3736/jcim20040218.
- [17] Y. Wang, D. Liao, M. Qin, et al. (2016), “Simultaneous determination of catalpol, aucubin, and geniposidic acid in different developmental stages of *Rehmannia glutinosa* leaves by high-performance liquid chromatography”, *Journal of Analytical Methods in Chemistry*, **49**, pp.565-589, DOI: 10.1155/2016/4956589.
- [18] S. Tong, L. Chen, Q. Zhang, et al. (2015), “Separation of catalpol from *Rehmannia glutinosa* Libosch. by high-speed countercurrent chromatography”, *Journal of Chromatographic Science*, **53**(5), pp.725-729, DOI: 10.1093/chromsci/bmu114.