

“Гүргэм” тарилгын эмэнд гидроксисафлор шар А тодорхойлох өндөр идэвхт шингэний хроматографийн аргын баталгаажилт

*Балжинням И.¹, Цэндбадам Б.¹, Баттулга Б.², Мөнхцэцэг Р.¹,
Бадамцэцэг С.², Баянмөнх А.², Цэцэгмаа С.², Лхаасүрэн Р.²*

¹“Цомбо” фарм ХХК

²Эм судлалын хүрээлэн

*E-mail: ivanbaljinnyam@gmail.com

Abstract

Method validation of hydroxysafflor yellow A in “*Carthamus tinctorius*” injection by High-performance liquid chromatography

*Baljinnyam I.¹, Tsendbadam B.¹, Battulga B.², Munkhtsetseg R.¹,
Badamtsetseg S.², Bayanmunkh A.², Tsetsegmaa S.², Lkhaasuren R.²*

¹“Tsombo” Pharma” Co., LTD

²Drug Research Institute

*E-mail: ivanbaljinnyam@gmail.com

Introduction

Carthamus tinctorius L. widely accepted as Safflower or false saffron, belongs to the Compositae or Asteraceae family. Hydroxysafflor yellow A is the main active chemical compound present in florets of *Carthamus tinctorius* L. A joint research team of the “Tsombo Pharm” Co., LTD and the Drug research Institute is conducting an experiment to produce a solution of “*Carthamus tinctorius*” injection prepared by *Carthamus tinctorius* L.

Goal

The aim of this study was to develop the validation method of hydroxysafflor yellow A in “*Carthamus tinctorius*” injection.

Material and Methods

As a test sample “*Carthamus tinctorius*” injection was produced by “Tsombo pharma” Co., LTD. The standard Hydroxysafflor yellow A was supplied from Sigma-Aldrich Co., Ltd. The reagent were high-performance liquid chromatography grade acetonitrile, phosphoric acid, methanol and purified water. Shimadzu HPLC (CMB-20 A, UV detector Shimadzu SPD-20A) was used as the analytical instrument and the analysis conditions were as follows Table 1.

Results

A Shimpack C18 column was used with methanol:acetonitrile:0.7% phosphoric acid as the mobile phase under the condition of gradient elution. The hydroxysafflor yellow A were analyzed by using a timed wavelength measure according to their maximum absorption wavelength. Accuracy and precision were assessed by analyzing five sets of samples, independently prepared at low (50%) middle (100%) and high (150%) concentrations. The intraday and interday precisions of the investigated compound were less than 1.59 % and the average recoveries ranged from 81.9% to 101.5%.

There were good linear correlations between the concentrations of the hydroxysafflor yellow A and its chromatographic peak areas ($R^2 = 0.998$), the proposed method was successfully applied to determine the hydroxysafflor yellow A in “*Carthamus tinctorius*” injection.

Conclusions

The results indicated that the proposed method is simple, stable, and accurate and could be readily utilized as a quality control method for manufacturing process of "Carthamus tinctorius" injection.

Key words: Safflower, injection, flavonoid, carthami

Pp. 56-63, Tables 5, Picture 2, Figures 1, References 17

Үндэслэл

Гүргэм (*Carthamus tinctorius* L.) ургамал нь Нийлмэл цэцэгтэн (*Compositae* or *Asteraceae*)-ий овгийн нэг наст өвслөг ургамал [1,2,3]. Монгол орны Алтайн өвөр говь, Олон нуурын хөндий, Монгол дагуур, Хангай зэрэг ургамал газар зүйн, хэд хэдэн тойрогт тариалж, цэцгийн сайн ургац авч эмэнд хэрглэж байна[3]. Гүргэм ургамлаас 100 гаруй нэгдлүүдийг ялгаж тодорхойлсон бөгөөд флавоноид болон хинохалкон (*quinochalcones*) нь биологийн идэвхтэй бүрэлдэхүүн хэсэг гэж үздэг[4,5]. Картамин, картаминдин, изокартаминдин, гидроксисафлор шар А, сафлор шар, сафлор шар А, сафламин С болон лютеолин нь Гүргэм ургамлын гол судлагдсан химийн бүрэлдэхүүн хэсэг юм [6]. Хэвлэлийн судалгаанаас харахад Гүргэмийн гол үйлчлэгч бодис гидроксисафлор шар А нь антиоксидант үйлчлэлээр тархины ишеми / реперфузийн гэмтлийн эсрэг мэдрэлийн хамгаалалтыг бий болгож болохыг харуулсан [7] ба паркинсоны эсрэг потенциалтай эм байх магадлалтай гэсэн таамаг дэмжүүлсэн байна [8]. Мөн цусны даралт болон зүрхний цохилтыг мэдэгдэхүйц бууруулдаг [9], мөн тархины судас тэлэх, тархины судасны нэвчилтийг сайжруулах замаар ишемийн харвалтаас хамгаалдаг зэргийг судалгаагаар тогтоосон байна [10]. Түүчлэн гидроксисафлор шар А –ын тархины фокусын ишемийг эмчлэх механизм нь тромбоз үүсэх, тромбоцитын бөөгнөрөлд дарангуйлах нөлөө үзүүлэхээс гадна PGI2/TXA2 болон цусны реологийн өөрчлөлтийг зохицуулахад сайнаар нөлөөлдөг болохыг харханд хийсэн судалгаагаар тогтоосон байна [11]. Гүргэм ургамлын цэцэгнээс цус бүлэгнэлтийн эсрэг үйлдэлтэй тариаг БНХАУ-ын эмийн стандарт WS3-B-3825-98-2012-аар Yaobao pharmaceutical group Co., Ltd.-н үйлдвэрлэсэн байдаг хэдий ч, тус тарианд гидроксисафлор шар А–н аргын баталгаажилт хийж хэвлэн нийтлүүлээгүй байна. "Цомбо фарм" ХХК болон Эм судлалын

хүрээлэнгийн хамтарсан судалгааны баг Гүргэм ургамлаас бэлтгэсэн "Гүргэм" тарилгын эм гарган авах технологийг нутагшуулах судалгааг гүйцэтгэж байгаа. Уг судалгааны дүнд гарган авсан "Гүргэм" тарилгын уусмалд агуулагдах гидроксисафлор шар А-н хэмжээг өндөр идэвхт шингэний хроматограф (ӨИШХ)-ийн аргаар тодорхойлох арга зүйг боловсруулж, арга зүйг баталгаажуулах зорилго тавьсан. Өвөрмөц/сонгомол чанар, үнэмшилт чанар, нарийвчлал (давтагдах чанар, дундаж утгын нарийвчлал), шугаман чанар, илрүүлэх хязгаар, тодорхойлогдох хязгаар зэрэг үзүүлэлтээр аргыг баталгаажилт хийх зорилт тавьсан.

Материал, арга зүй

Стандарт бодис гидроксисафлор шар А RS (98%, ӨИШХ)-ыг Sigma-Aldrich Co., Ltd –ээс, ӨИШХ-ийн цэвэршилттэй органик уусгагч (метанол, 99.9%, HPLC grade, ацетонитрил 99.9%, ӨИШХ) болон фосфорын хүчил AR, 85.9%-ийг Xilong Scientific Co., Ltd-ээс тус тус худалдан авч хэрэглэсэн. ӨИШХ (Shimadzu CMB-20 A, UV detector Shimadzu SPD-20A), Shimadzu, Shimpack 5u C18, (100A, 250*4.6 mm) багана, органик уусгагч шүүх 0.45 μм тариурын шүүлтүүр зэргийг ашиглав. Судалгаанд "Цомбо фарм" ХХК болон Эм судлалын хүрээлэнгийн туршилт үйлдэрлэлийн цехийн судалгааны материаллаг баазыг ашиглан Гүргэм ургамлын цэцэгнээс бэлтгэсэн "Гүргэм" тарилгын уусмалыг ашигласан.

Стандарт уусмал бэлтгэх: Стандарт гидроксисафлор шар А-аас 0.006 г-ыг нарийвчлалтай жинлэн авч 50 мл-ийн хэмжээст колбонд хийж хэмжээс хүртэл 25%-ийн метанол / ӨИШХ-д зориулсан/-оор сулруулна. Уг уусмалыг 0.45 мкм мембран шүүлтүүр /органик уусгагч шүүх зориулалттай, тариурын/-ээр шүүнэ.

Дээж уусмал бэлтгэх: "Гүргэм" тарилга эмээс 20 ампулыг задлан хольж, 5 мл-ийг хэмжин авч 25 мл-ийн хэмжээст колбонд хийгээд 6.25 мл цэвэр

метанол (ӨИШХ-д зориулсан) нэмээд, хэмжээс хүртэл давхар нэрсэн усаар сулруулна. Дээж уусмалыг 10 минут хэт авианы усан халаагуурт тавина. Дараа нь тасалгааны хэмд 15 минут байлгаад уусмалын хэмжээ хэмжээст колбоны хэмжээснээс доогуур болсон байвал давхар нэрсэн усаар дахин хэмжээс хүртэл дүүргэнэ. Уг уусмалыг 0.45 мкм мембран шүүлтүүр /органик уусгагч шүүх зориулалттай, тариурын /-ээр шүүнэ.

0.7%-ийн фосфорын хүчил бэлтгэх: Фосфорын хүчлээс 4.11 г-ийг нарийвчлалтай хэмжин авч

500 мл-ийн хэмжээст колбонд хийгээд хэмжээс хүртэл давхар нэрсэн усаар сулруулна. Уг уусмалыг 0.45 мкм-ийн дискэн шүүлтүүр (цаасан)-ээр шүүж ӨИШХ-ийн багажинд холбоно.

Системийн таарц: Дээж болон стандарт уусмалаас 20 мкл-ийн хэмжээгээр дараалуулан тарих бөгөөд 5 тарилтын дараах хроматограмм дахь гидроксисафлор шар А –н пикийн талбайн харьцангуй хазайлт 2.0%-иас ихгүй байна. Хроматографийн нөхцөлийг хүснэгт 1-д харуулав.

Table 1. Analytical conditions of hydroxysafflor yellow A using HPLC

Mobile phase	Methanol:Acetonitrile:0.7% phosphoric acid (26 : 2 : 72)
Column	Shimpack C18 250 mm x 4.6 mm, 5µm
Column oven temperature	25°C
Detector wavelength (PDA)	403 nm
Flow rate	1.2 мл/мин
Run time	15 min
Injection volume	20 µl

ӨИШХ-с дээж уусмалын пикийн талбайг стандарт уусмалын пикийн талбайтай харьцуулж, гидроксисафлор шар А-н агууламжийг дараах томъёогоор тооцож, нэг ампул тарилга эмэнд агуулагдах мг-ын хэмжээг гаргана.

$$X = \frac{S_x \cdot a_{cm} \cdot V_2}{S_{cm} \cdot V_1 \cdot a_x} \cdot \frac{A_{\%}}{100\%} \cdot P$$

X – Гидроксисафлор шар А-н агууламж, г/ампул

S_x – Дээж уусмалын пикийн талбай

a_{cm} – Стандарт бодисын хэмжээ, г

V_2 – Дээж уусмалын шингэрүүлэлт, 50

S_{cm} – Стандарт уусмалын пикийн талбай

V_1 – Стандарт уусмалын шингэрүүлэлт, 50

a_x – Дээжний хэмжээ, мл

$A_{\%}$ – Стандарт бодисын цэвэршилт, %

P – Дундаж эзэлхүүн, мл /2/

Статистик боловсруулалт

Аналитик аргын баталгаажуулалтын үр дүнг тайлбарлахад ашигладаг үндсэн үзүүлэлтүүд болох дундаж (mean or average), стандарт хазайлт, харьцангуй стандарт хазайлт (RSD), үнэмшилт интервал (confidence intervals),

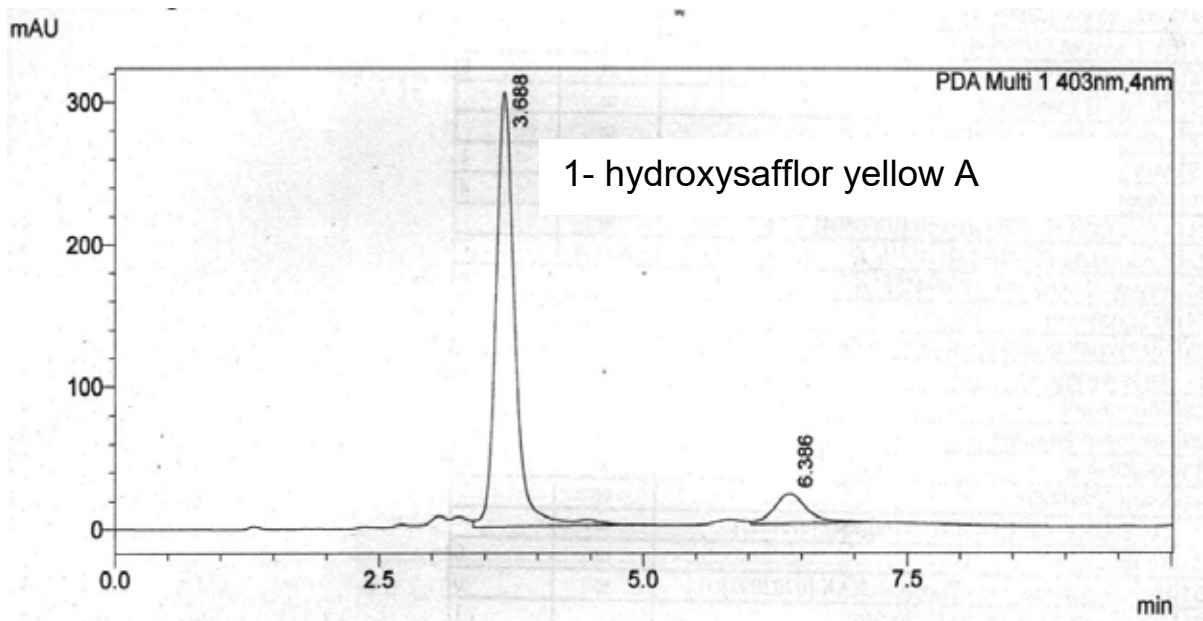
регрессийн шинжилгээг үнэлэх дисперсийн шинжилгээ R (корреляцийн коэффициент) ба R квадрат (тодорхойлох коэффициент) буюу шугаман регрессийг шугаман хэмжигдэхүүнийг хэмжиж тогтоов (ANOVA) [12]. Жишиг муруйд регрессийн анализ хийж шулууны тэгшгэлийг ашиглан уг аргын тодорхойлох хязгаар, илрүүлэх хязгаарыг тогтоов [13-14].

Үр дүн

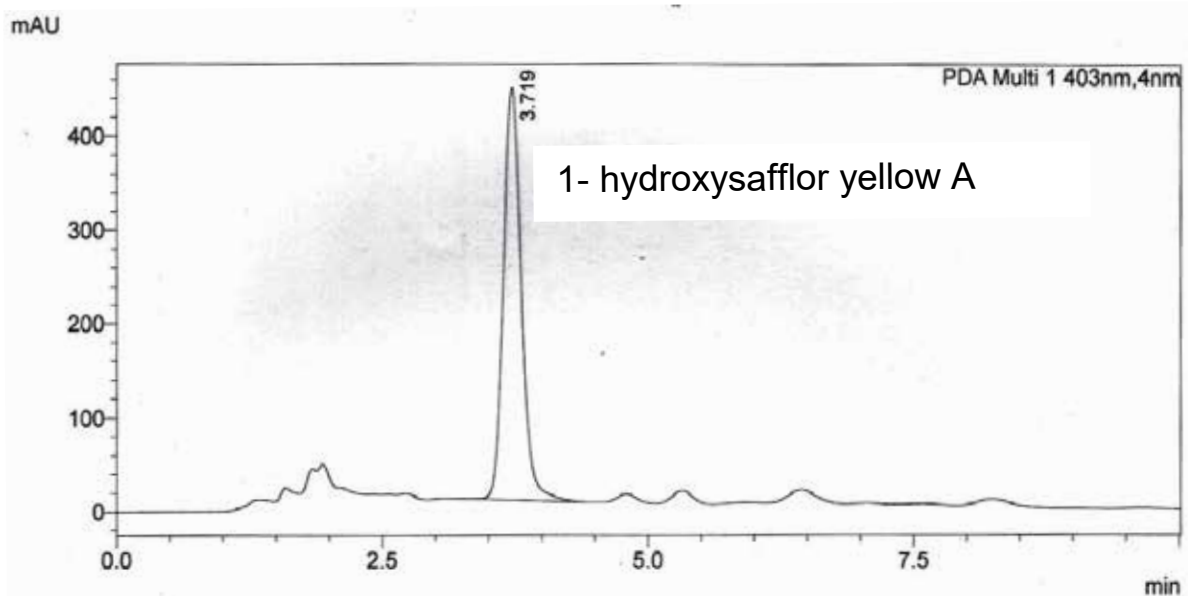
Бид судалгаандаа Гүргэм цэцэгний БНХАУ-ын фармакопей 2015-н аргад үндэслэн хөдөлгөөнт фазын системийг сонгон тохиромжтой харьцааг тогтоож, ӨИШХ-ийн багажны нөхцөлүүдийг өөрчлөн туршиж аргазүйг боловсруулж судалгааг гүйцэтгэсэн.

Өвөрмөц/Сонгомол чанар

“Гүргэм” тарилгад агуулагдах гидроксисафлор шар А-н тооны тодорхойлолтын сонгомол чанарыг шалгахдаа тооны тодорхойлолтод хэрэглэгддэг дээж болон стандарт уусмалыг тарих ба хроматографид баригдах хугацаа ижил байна. Туршилтын үр дүнг зураг 1, зураг 2 –т үзүүллээ.



Picture 1. Chromatogramm of hydroxysafflor yellow A



1-дээжийн пик

Picture 2. Chromatogramm of "Carthamus tinctorius" injection sample

Стандарт болон дээж уусмалын баригдах хугацаа ижил минутанд илэрсэн нь сонгомол чанартай бөгөөд системийн таарц сайн байгааг баталж байна. Иймд уг ӨИШХ-ийн арга тохиромжтой гэж үзэн аргыг баталгаалтыг үргэжлүүлэн хийв.

Үнэмшилт чанар

"Гүргэм" тарилгад үнэмшилт чанар тодорхойлсон үр дүнг хүснэгт 2-т үзүүллээ.

"Гүргэм" тарилгад агуулагдах гидроксисафлор шар А тодорхойлох тооны анализын үнэмшилт чанарыг тодорхойлохдоо стандарт бодистой харьцуулан 50, 100 болон 150% гэсэн гурван өөр ялгаатай концентрацитай дээж бэлтгэн явууллаа. Гурван туршилтын харьцангуй стандарт хазайлт (RSD) 1.39%, 0%, 0.25% гарч байгаа нь 2.0%-иас бага тул шаардлага хангаж байна.

Table 2. Accuracy of quantitative analysis of "Carthamus tinctorius" injection sample

No	Sample concentration, µg/ml	Result, µg/ml	Recovery, %	Mean value %	Qualified	RSD%	Qualified	
1	50%	0.73	0.72	102.8	104.26	Yes	1.39	Yes
2		0.73	0.74	105.7				
3		0.73	0.73	104.2				
Permissible amount				90-110%	Not more than 2.0%			
1	100%	1.5	1.6	106.6	106.6	Yes	0	Yes
2		1.5	1.6	106.6				
3		1.5	1.6	106.6				
Permissible amount				90-110%	Not more than 2.0%			
1	150%	2.23	2.26	101.3	98.11	Yes	0.25	Yes
2		2.23	2.26	101.3				
3		2.23	2.25	100.89				
Permissible amount				90-110%	Not more than 2.0%			

Нарийвчлал

"Гүргэм" тарилгад агуулагдах гидроксисафлор шар А-н тооны анализын нарийвчлалыг тодорхойлохдоо аргын нарийвчлал, дундаж утгын нарийвчлал зэрэг үзүүлэлтээр тодорхойлсон ба үр дүнг хүснэгт 3, 4 –т үзүүллээ.

Table 3. Method precision (Results of repeatability)

Injection Number	Retention Time (min-ute)	Peak area	Peak height
Replicate 1	3.721	446834	5253163
Replicate 2	3.718	445953	5240552
Replicate 3	3.725	443181	5254712
Replicate 4	3.712	449368	5279310
Replicate 5	3.719	448800	5239050
Replicate 6	3.701	440455	5204448
Replicate 7	3.719	458470	5212589
Replicate 8	3.708	440123	5288541
Replicate 9	3.712	445621	5246958
Replicate 10	3.714	439881	5212569
Mean	3.7149	445868.6	5243189
ST DEV	0.006999	5637.456	27902.39
RSD %	0.188409	1.264376	0.532164

"Гүргэм" 2 мл-ийн тарилгад агуулагдах гидроксисафлор шар А-н тооны тодорхойлолт хийх аргын нарийвчлалыг 10 удаагийн давталттай хэмжилтээр шалгахад RSD 2 %-иас ихгүй буюу 0.188% байгаа нь шаардлага хангаж байна.

Table 4. Results for determining intermediate precision

No	Sample	Hydroxysafflor yellow A, µg/ml	
		First analyzer/ Day 1	Second analyzer/ Day 2
1	"Carthamus tinctorius" injection sample	1.593761	1.578981
2	"Carthamus tinctorius" injection sample	1.589935	1.581451
3	"Carthamus tinctorius" injection sample	1.594231	1.604494
4	"Carthamus tinctorius" injection sample	1.601694	1.591878
5	"Carthamus tinctorius" injection sample	1.589479	1.581445

Mean (n = 5)	1.59382	1.58765
RSD % (n = 10)	0.532	
Permissible amount (n = 10)	Not more than 2.0%	
Qualified	Yes	

Дээж уусмалаас 20 мкл-ийн хэмжээгээр дараалуулан тарих бөгөөд 5 тарилтын дараах хроматограмм дахь гидроксифлор шар А-н пикийн талбайн RSD 2.0%-иас ихгүй байна. Дундаж утгын нарийвчлалыг тодорхойлоход RSD 0.532% гарч шаардлага хангасан.

Шугаман чанар

Гидроксифлор шар А-н тооны тодорхойлолтын шугаман чанарыг ажлын стандарт уусмалын концентраци (0.15 мг/мл) -ээс 25%-200% ялгаатай уусмалууд бэлтгэн тус бүрийн хроматограммын пикийн талбайг хэмжин тодорхойлоллоо. Шугаман чанар тодорхойлсон үр дүнг хүснэгт 5, диаграмм 1 –т тус тус үзүүллээ.

Table 5. Linearity of standard hydroxysafflor yellow A

№	Norminal concentration of standard , $\mu\text{g/ml}$	Peak area, mAU	Real concentration of solution, $\mu\text{g/ml}$	Recovery, %
1	28	841706	22.93335	81.90483
2	56	1834270	55.84952	99.73128
3	88	2817183	85.96789	97.69078
4	117	3779285	115.4486	98.67399
5	175	5527367	169.0132	96.57898
6	234	7769692	237.7224	101.5908
		Mean /n=6/		96.02
		SD		7.13
		Intercept		83667
		Slope		33054
		SE of intercept		96692.7
		SD of intercept		236897.1

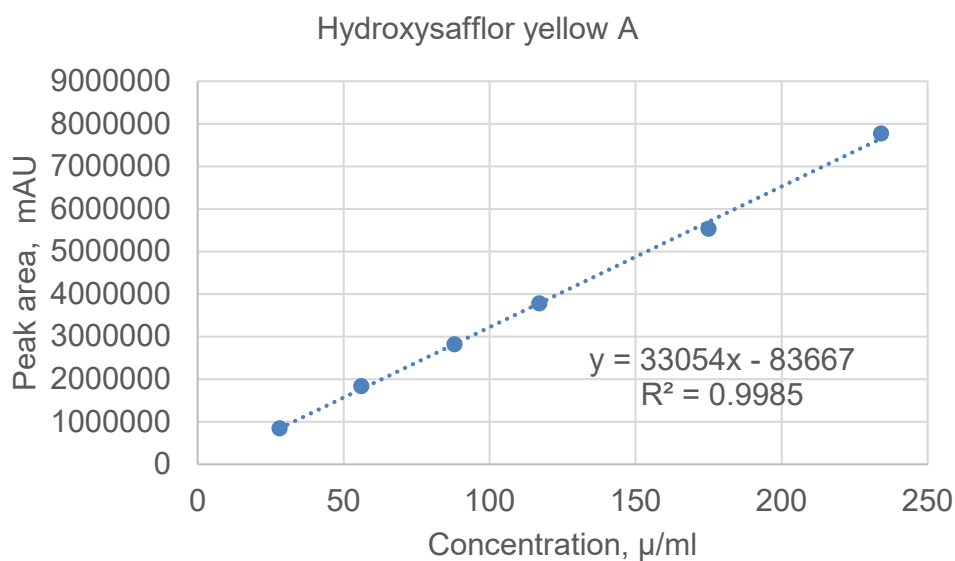


Figure 1. Linearity of standard hydroxysafflor yellow A

Дээрх үр дүнгээс харахад жиших муруйн корреляцийн коэффициент $R^2=0.998$ байсан нь шугаман хамааралтай байгааг баталж байна.

Илрүүлэх хязгаар

Илрүүлэх хязгаарыг жиших муруйн шулууны тэгшитгэл ашиглан тооцоолж, хамгийн бага илрүүлэх концентраци 23.65 мкг/мл болохыг тогтоолоо.

$$\frac{3.3 \times \sigma}{S} \rightarrow \frac{3.3 \times 236897}{33054} = 23.65 \text{ мкг/мл}$$

Энд: – SD of intercept ; – Налуу (Slope)

Тодорхойлогдох хязгаар

Тодорхойлогдох хязгаарыг жиших муруйн шулууний тэгшитгэл ашиглан тооцоолж, хамгийн бага тодорхойлох концентраци 71.66 мкг/мл болохыг тогтоолоо.

$$\frac{10 \times \sigma}{S} \rightarrow \frac{10 \times 236897}{33054} = 71.66 \text{ мкг/мл}$$

Энд: – SD of intercept ; – Налуу (Slope)

Хэлцэмж

“Цомбо фарм” ХХК болон Эм судлалын хүрээлэнгийн хамтарсан судалгааны багийн туршилт судалгааны үр дүнд гарган авсан Гүргэм тарилгын эмэнд гидроксифлор шар А тодорхойлох ӨИШХ-ын аргын батлгаажилтын судалгааг хийхдээ Гүргэм цэцэгний БНХАУ-ын фармакопей 2015-н аргад үндэслэн хөдөлгөөнт фазын системийг сонгон тохиромжтой харьцааг тогтоож, ӨИШХ-ийн багажны нөхцөлүүдийг өөрчлөн туршиж аргазүйг боловсруулж гүйцэтгэв.

Аргын баталгаажилтыг ӨИШХ-ийн аргаар хийхдээ International Council for Harmonisation of Technical Requirements for Pharmaceuticals for Human Use (ICH)-н удирдамж болон олон улсад баримталдаг бусад бичиг баримтуудын дагуу [12-15] буюу өвөрмөц чанар, үнэмшилт чанар, нарийвчлал, шугаман чанар, илрүүлэх хязгаар, тодорхойлогдох хязгаар зэрэг үзүүлэлтээр аргыг баталгаажилт хийв. Бидний хийсэн энэхүү судалгаагаар “Гүргэм” тарилгад агуулагдах гидроксифлор шар А-н тооны тодорхойлолтыг дээрх арга зүйгээр хийхэд тохиромжтой болохыг баталлаа.

Хэвлэлийн материалаас харахад Гүргэм ургамлын найрлага дахь гидроксифлорын шар А-г тодорхойлоход мэдрэмтгий, найдвартай, хурдан денситометрийн өндөр үзүүлэлттэй нимгэн үеийн хроматографийн аргаар [16] судалгаа хийсэн тарилгын эмийн хэлбэрт ӨИШХ-ын аргаар тус үйлчлэгч бодисыг тодорхойлсон дүнг нийтлээгүй байна. БНХАУ-ын үндэсний фармакопейд Гүргэм ургамлыг

гидроксифлор шар А-аар стандарчилсан байдаг бөгөөд агууламж 1%-иас багагүй байна [17] гэж тэмдэглэсэн байдаг бөгөөд одоогоор аль ч фармакопейн өгүүлэлд Гүргэм тарилгын эмийн хэлбэрт агуулагдах үйлчлэгч бодисын агууламжийг тусгаж өгөөгүй байна.

Дүгнэлт

“Гүргэм” тарилгын үүсмэлд агуулагдах гидроксифлор шар А-н хэмжээг ӨИШХ-ийн дээрх арга зүйгээр тооны анализ хийхэд тохиромжтой болохыг баталгаажуулан цаашид энэхүү аргаар шинжилгээг хийж гүйцэтгэх боломжтой болохыг тогтоолоо.

Талархал

Энэхүү судалгааг гүйцэтгэхэд судалгааны бааз нөхцөлөөр хангаж, туслаж, дэмжсэн “Цомбо” Фарма” ХХК, Эм судлалын хүрээлэн, “Монос” групп болон “Монос” Фарм ХХК-ын хамт олонд талархал илэрхийлье.

Ном зүй

1. Ram J. Singh. Genetic Resources, Chromosome Engineering, and Crop Improvement. Volume 4. 2007. CRC Press. p.168.
2. Zhou X, Tang L, Xu Y, Zhou G, Wang Z. Towards a better understanding of medicinal uses of *Carthamus tinctorius* L. in traditional Chinese medicine: A phytochemical and pharmacological review. Journal of Ethnopharmacology. 2014; 151(1): 27-43. doi: 10.1016/j.jep.2013.10.050.

3. У.Ливаа, Б.Даваасүрэн, Н.Нинжил. Монгол орны эмийн ургамлыг өрнө дорнын анагаах ухаанд хэрэглэхүй. 2005.р.145-146.
4. Le-Le Zhang, Ke Tian, Zheng-Hai Tang, Xiao-Jia Chen, Zhao-Xiang Bian, Yi-Tao Wang, Jin-Jian Lu. Phytochemistry and Pharmacology of *Carthamus tinctorius* L. *Am J Chin Med*. 2016;44(2):197-226.
5. Xidan Zhou, Liying Tang, Yilong Xu, Guohong Zhou, Zhuju Wang. Towards a better understanding of medicinal uses of *Carthamus tinctorius* L. in traditional Chinese medicine: A phytochemical and pharmacological review. *Journal of Ethnopharmacology*. Volume 151, Issue 1, 10 January 2014, p.27-43
6. Jinous Asgarpanah, Nastaran Kazemivash. Phytochemistry, pharmacology and medicinal properties of *Carthamus tinctorius* L. 2013. *Chinese Journal of Integrative Medicine* volume 19, p.153–159
7. Xinbing Wei, Huiqing Liu, Xia Sun, Fenghua Fu, Xiumei Zhang, Jin Wang, Jie An, Hua Ding. Hydroxysafflor yellow A protects rat brains against ischemia-reperfusion injury by antioxidant action. *Neuroscience Letters*. Volume 386, Issue 1, 23 September 2005, p.58-62
8. B. Han & H. Zhao. Effects of Hydroxysafflor Yellow A in the Attenuation of MPTP Neurotoxicity in Mice. *Neurochemical Research*. 2010. Volume 35, 107
9. Pei-He Nie, Lin Zhang, Wen-Hui Zhang, Wei-Fang Rong, Jian-Ming Zhi. The effects of hydroxysafflor yellow A on blood pressure and cardiac function. *Journal of Ethnopharmacology*. 2012. Volume 139, Issue 3, p.746-750
10. YangSun, Dong-Ping Xua, Zhen Qin, Peng-Yuan Wang, Bo-Han Hu, Jian-Guang Yu, Yong Zhao, Ben Cai, Yong-Ling Chen, Min Lu, Jian-Guo Liu, XiaLiu. Protective cerebrovascular effects of hydroxysafflor yellow A (HSYA) on ischemic stroke. *European Journal of Pharmacology*. 2018. Volume 818, p.604-609.
11. Hai-Bo Zhu , Ling Zhang , Zheng-Hua Wang , Jing-Wei Tian , Feng-Hua Fu , Ke Liu & Chang-Ling Li. Therapeutic effects of hydroxysafflor yellow A on focal cerebral ischemic injury in rats and its primary mechanisms. *Journal of Asian Natural Products Research*. 2005. Volume 7, Issue 4, p.607-613
12. Soumia Belouafa*, Fatima Habti, Sand Benhar, Boucharb Belafkih, Souad Tayane, Souad Hamdouch, Ahmed Bennamara and Abdelmjid Abourriche. Statistical tools and approaches to validate analytical methods: methodology and practical examples. *Int. J. Metrol. Qual. Eng*. 2017. Volume 8, 9-10
13. Register UFF. Text on Validation of Analytical Procedures. Definitions and Terminology. 1995;60.
14. Register UFF. International Conference on Harmonization (ICH), Q2B: Validation of Analytical Procedures. Methodology. 1997; 62
15. Validation of Compendial Methods, <1225> U.S. Pharmacopoeia 26-National Formulary 21, United States Pharmacopoeial Convention, Rockville MD, 2003. Volume No.31(2) p.549
16. Ting He, Ya Zeng, and Xiaoying Zhou. Qualitative and quantitative analysis of hydroxysafflor yellow A in safflower by using high-performance thin-layer chromatography. *JPC - Journal of Planar Chromatography - Modern TLC*. Volume 31: Issue 2 p.129–134.
17. Pharmacopoeia of The People Republic of China. 2015. Volume I. p.95-96.

*Танилцаж, нийтлэх санал өгсөн:
Анагаахын шинжлэх ухааны доктор,
профессор Ч.Чимэдрагчаа*