

**ЯГААН МҮГЭЗ (*RHODIOLA ROSEA L. RHODIOLA CRENULATA L.*) УРГАМЛЫН ХУУРАЙ
ХАНДАНД САЛИДРОЗИДИЙН ТООНЫ ТОДОРХОЙЛОЛТ ХИЙХ ӨНДӨР ИДЭВХТ
ШИНГЭНИЙ ХРОМАТОГРАФИЙН АРГА**

Баттулга Б¹., Бадамцэцэг С¹., Лхаасүрэн Р¹., Одонтуяа Г²., Хүрэлбаатар Л¹.

¹Эм судлалын хүрээлэн

²Эм Зүйн Шинжлэх Ухааны Их Сургууль

battulga@monos.mn ; battulgachem@gmail.com

Abstract

**HPLC METHOD FOR QUANTIFICATION OF SALIDROSIDE FOR QUALITY CONTROL OF
GOLDEN ROOT (*RHODIOLA ROSEA L. RHODIOLA CRENULATA L.*) DRY EXTRACT**

Battulga B¹., Badamtsetseg S¹., Lkhaasuren R¹., Odontuya G²., Khurelbaatar L¹.

¹Drug Research Institute

²Mongolian University of Pharmaceutical Science

battulga@monos.mn ; battulgachem@gmail.com

Background: The high-performance liquid chromatography (HPLC) method was developed to select salidroside in tablet formulation dietary supplements, raw material containing other components. Further, the proposed method was validated for linearity, precision (system precision, method precision, intermediate or inter-day precision), and accuracy, stability in analytical solution, system suitability, and ruggedness. The developed method exhibited the best results in terms of the validation above parameters. The other components and additives did not interfere with their determinations. The method was found to be selective, simple, economical, accurate, reproducible, rapid, and reliable for routine estimation purposes of salidroside in golden root dry extract. The goal of this study was to develop the validation method of salidroside in the dietary supplement.

Material and Methods: The *Rhodiola rosae* L. dry extract was supplied Arshin Co.ltd in People's Republic of China. The standard salidroside was supplied from Sigma Aldrich Co Ltd. We used solvents for HPLC grade (methanol, acetonitrile). Chromatographic conditions: A gradient HPLC (Shimadzu CBM20AD) with serial dual plunger pump; analytical column: Shimadzu GIST C18 150 x 4.6 mm, particle size 5 µm; flow rate: 1 ml/min; column temperature: 40°C, detection: UV 275 nm. Chromatographic procedure: 20 µl of the mixed standard preparation and assay (sample) preparation were separately injected into the chromatography, the chromatograms were recorded, and the responses for the major peaks were measured. The run time was approximately 15 minutes.

Results: The calibration curves for the salidroside were made by plotting the peak area versus the concentration for each analyte using regression analysis. Each calibration curve was obtained using six levels of concentrations in the range of 100-800 µg/mL. The linear correlation coefficient ($r^2=1$) for all calibration curves was higher than 1 for all analytes. The LOD and LOQ for salidroside were golden root dry extract in 8.788 µg/mL and 26.61 µg/mL, respectively. Accuracy and precision were assessed by analyzing five samples independently prepared at low, middle, and high concentrations. The RSD values of repeatability and intermediate precision were below 1.12%, 1.19 and 1.79%. The accuracy remains between 91 to 109%. The resulting accuracy data were satisfactory for the quantitative analysis of salidroside in golden root dry extract. This article presents a simple, accurate, reproducible, and thoroughly validated HPLC-based method for qualitative and quantitative analysis of salidroside, as part of the quality assessment of golden root dry extract.

Key-words: Salidroside, High-performance liquid chromatography, quality control, method validation
Pp 10, Table-2, Figures-12, References-9

Түлхүүр үг: Салидрозид, өндөр идэвхт шингэний хроматографи, чанарын хяналт, аргын баталгаажилт

Удиртгал
Зузаалайн овгийн Мүгээ (*Rhodiola L.*)-ийн төрөлд хамаарагдах ягаан мүгээ (*Rhodiola*

rosea L.) ургамал нь Альпийн нурууны бүс нутаг, Евроазийн эх газраар өргөн бүс нутгийг хамарч тархсан байдаг¹. Ягаан мүгээ 70 см орчим өндөртэй, махлаг сукулент навчтай, шар өнгийн бамбай баг цэцэгтэй, олон наст өвслөг ургамал юм. Ягаан мүгээ ургамлаас ойролцоогоор 140 орчим нэгдлийг ялгасан байдаг. Үүнд монотерпен ба түүний гликозидууд, флавоноидууд, флаволигнаны, проантоцианидинууд, галлийн хүчлийн уламжлалууд багтана. Эдгээр нэгдлүүдээс тирозолын гликозид болох салидрозид, циннамил алкахолын гликозидууд (розин, розарин, розавин) гэх 2 бүлэг нэгдэл тус ургамлын өвөрмөц нэгдэл болох нь олон судалгаагаар батлагдсан байдаг². Ягаан мүгээний үндэс ба үндэслэг ишийг Орос, Скандиновийн орнууд уламжлалт анагаах ухаанд эртнээс өргөн хэрэглэсээр ирсэн. Ягаан мүгээ нь адаптоген, стресс бууруулах үйлдэлтэй нэгдлүүдийг агуулдаг³. Уг ургамлыг олон төрлийн өвчинд хэрэглэдэг ба үүнд толгойн өвдөлт, нуруу үе мөчний өвдөлт, арьс хуурайшихад гол төлөв сайн нөлөө үзүүлдэг нь тогтоогдсон байдаг ба тархи мэдрэлийн системийг сэргээх, тархины ажиллах чадварыг нэмэгдүүлдэг гэж үздэг⁴. Ургамлын эмийн бүтээгдэхүүний зөвлөл (The Committee on Herbal Medicinal Products), Европын эмийн агентлаг (European Medicinal Agency) ягаан мүгээ ургамлыг удаан хугацаанд хэрэглэхэд ядаргаа, стресс, хэт мэдрэг болох эмнэл зүйн шинж тэмдэгүүдийг түр хугацаанд анагаадагт санал нийлсэн байдаг ба дээрх шинж тэмдэгийг дарах биологийн идэвхт бүтээгдэхүүн үйлдвэрлэж, тодорхой шаардлага хангасан тохиолдолд зах зээлд нэвтрүүлэх боломжтой гэж үзсэн^{5,6}. Тус ургамлыг Оросын Фармакопей (14-р хэвлэл), Америкийн Фармакопей, Эмийн ургамлын цуглуулга жагсаалт (USP, Herbal Medicines Compendium)-д салидрозидийн агууламжаар стандартчилсан байдаг ба анагаах ухаанд өргөн хэрэглэгддэг эмийн ургамал юм. Монголын үндэсний фармакопейн анхдугаар хэвлэлд ягаан мүгээийг салидрозидийн

агууламж тодорхойлох спектрофотометрийн аргаар стандартчилсан байдаг. Энэ аргын шинжилгээний явц олон үе шаттай, хугацаа их зарцуулдаг, шинжээчийн гарын алдаа гарах магадлал өндөр, үр дүнг өвөрмөц шингээлт ашиглан тооцдог учир нарийвчлал муутай үр дүн гардаг сул талтай байна. Иймд бид судалгааны хүрээнд тус ургамлын хуурай ханданд агуулагдах салидрозидийн агууламжыг тодорхойлж чанарын хяналт тавих, зорилгоор салидрозид тодорхойлох өндөр идэвхт шингэний хроматографи (ӨИШХ)-ийн аргыг хөгжүүлэх судалгааг гүйцэтгэв.

Зорилго, зорилт

Бид энэхүү судалгааны хүрээнд салидрозид тодорхойлох ӨИШХ-ийн аргыг судалж, оновчтой арга зүйг сонгон авч олон улсад хүлээн зөвшөөрөгдөхүйц шинжилгээний арга зүй хөгжүүлэх зорилго тавив.

Арга, аргачлал

Судалгаанд БНХАУ-ын “Аршина” компаний ягаан мүгээ (*Rhodiola rosea* L.) ургамлын хуурай ханд ашиглав. Стандарт бодис салидрозид (CAS: 10338-51-9; purity ≥98%)-ийг Швед улсын Sigma-Aldrich компаниас худалдан авч хэрэглэсэн. ӨИШХ-ийн цэвэршилттэй (HPLC grade) органик уусгагч (метанол, ацетонитрил) хэрэглэв.

Судалгааны ажлын үр дүнгийн статистик боловсруулалтыг майкрософт эксел (Microsoft Excel) программаар гүйцэтгэж, регрессийн анализ хийх аргаар интерсептийн алдааг тодорхойлж, илрүүлэх хязгаар (limit of quantification), тодорхойлогдох хязгаар (limit of detection), сэргээгдэх утга (recovery) тогтоов.

ӨИШХ-ийн систем нь Shimadzu CBM-20A загвар ба Диод аррей (Diode Array Detector) детектор, Shimadzu-GIST C18 багана (150 x 4.6 mm; 100A, 5μm)-аар тоноглогдсон.

Мобайл фаз А – ионгүйжүүлсэн ус (85), Б – Метанол HPLC grade, 99.9%, Sigma-Aldrich (15), урсах хурд 1 мл/мин, гүйлгэх хугацаа 15 минут, илрүүлэх гэрлийн долгионы урт 275 нм, баганын температур 40°C-д тус тус тохируулав.

Стандарт бодис салидрозидоос 10 мг-ийг нарийвчлалтай хэмжин авч 25 мл-ийн хэмжээт

колбонд хийгээд 16.25 мл метанол (HPLC grade) нэмж сайтар уусгаад, хэмжээс хүртэл ионгүйжүүлсэн усаар сулруулна. ӨИШХ-ийн багажинд суулгах дээжийн концентраци 0.4 мг/мл байна.

Ягаан мүүгээ ургамлын хуурай ханднаас 0.15 г-ыг нарийвчлалтай жигнэн авч 25 мл-ийн хэмжээст колбонд хийгээд 16.25 мл метанол (HPLC grade) нэмж сайтар уусгаад, хэмжээс хүртэл ионгүйжүүлсэн усаар сулруулна.

Дээж болон стандарт уусмалыг 0.45 μ m мембран шүүлтүүрээр шүүж бэлтгэн ӨИШХ-ийн тарина.

Аргын баталгаажилт (Method validation)-ийг Олон Улсын Тохируулгын Зөвлөл (International Council of Harmonisation)-ийн Чанарын Хөтөч (Quality Guidelines)-ийн Q2(R1) хэсэгт заасаны

дагуу тодорхойлов⁷.

Үр дүн

Арга зүйн хөгжүүлэлт:

Ягаан мүүгээ (*Rhodiola rosea* L.) ургамлын гол үйлчлэгч бодис болох салидрозид тодорхойлох арга зүйг баталгаажуулах судалгааны хүрээнд Хятадын Фармакопей 15-р хэвлэл, АНУ-ын Фармакопей 44-р хувилбарт заасан аргуудыг харьцуулж туршилт хийв. Ингэхэд АНУ-ын Фармакопейн аргаар хийсэн шинжилгээний хроматограммд стандарт бодисийн пик (peak) хэт өндөр, баригдах хугацаа (retention time) 2.091 минут буюу эрт илэрч байгаа нь дээжинд шинжилгээ хийхэд хүндрэлтэй нөхцөл үүсгэж байв. АНУ-ын Фармакопейн дагуу хийсэн шинжилгээний хроматограммыг зураг 1, 2-т үзүүлэв.

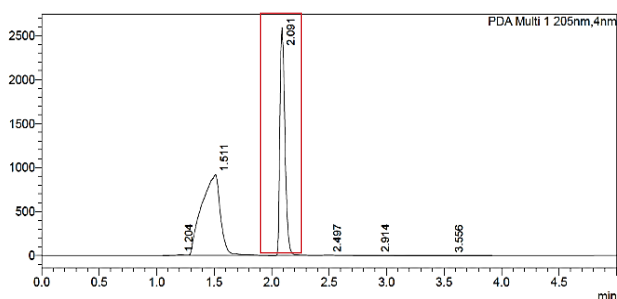


Figure 1. Salidroside peak

Стандарт салидрозидийн пик илэрч байгаа минутад дээжинд өөр нэгдэл илэрч, салидрозид салахгүй байгаа тул тооны анализ хийх боломжгүй, арга зүй тохирохгүй байна гэж үзэв. Иймд АНУ-ын Фармакопейн арга нь бидний судалгаанд ашиглаж буй ӨИШХ-ийн

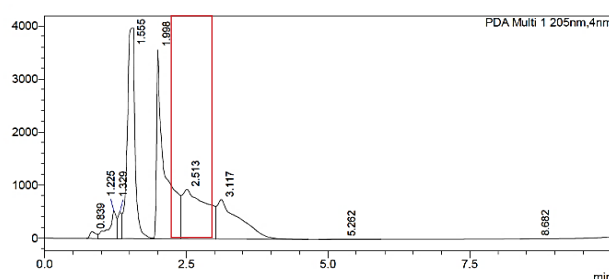


Figure 2. Dry extract sample peak

багаж, нөхцөлд тохиромжгүй байна⁸.

Хятадын Фармакопей 2015-т заасан ягаан мүүгээ ургамалд салидрозид тодорхойлох арга зүйг туршиж үзэхэд баригдах хугацаа 10 минутаас хойш, пикийн өндөр хэвийн байв. Хроматограммийг зураг 5, 6-д үзүүлэв.

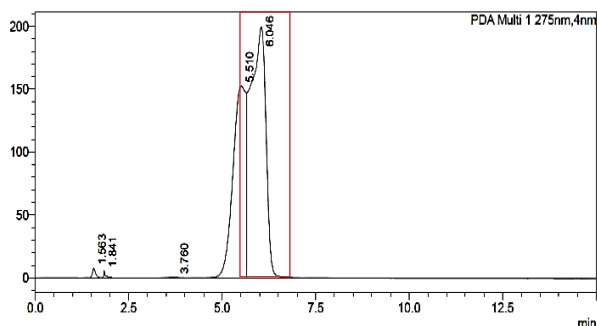


Figure 3. Salidroside peak (cleaned)

Зураг 3 болон 4-өөс харахад стандарт уусмалын концентраци ихдэх, уусгагч

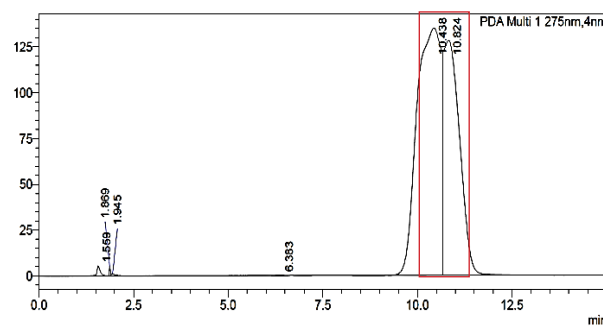


Figure 4. Salidroside peak (replicate, cleaned)

тохиромжгүй байх тохиолдолд үүсдэг салалт (split) өгсөн нь харагдаж байна. Иймд

стандарт уусмалын концентрацийг 2 дахин сулруулав. Мөн уусгагчийг 65%-ийн метанол болгон өөрчлөв. Сулруулах уусмалыг сольж,

концентрацийг бууруулсан стандарт уусмалын пикийг зураг 5-д үзүүлэв.

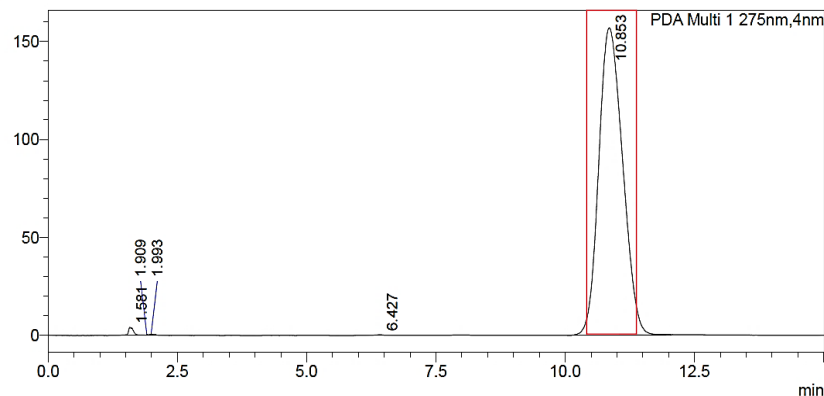


Figure 5. Peak of standard salidroside

Стандарт салидрозидийн уусмалын Зураг 5-д үзүүлсэн пикд салалт (split), фронт (front), сүүл (tailing) байхгүй, тэгш хэмтэй тооны тодорхойлолтод ашиглах боломжтой, шаардлага хангасан пик (peak) илэрсэн тул хуурай ханданд салидрозидийн тооны тодорхойлолтыг аргын тохируулга хийж

өөрчилсөн Хятадын Фармакопей 2015 заасан аргаар хийхэд тохиромжтой гэж үзэв.

Аргын тохируулга хийсэн дээрх арга зүйгээр ягаан мүгээ ургамлын хуурай ханданд тооны тодорхойлолт хийж үр дүнг зураг 6 болон хүснэгт 1-т үзүүлэв.

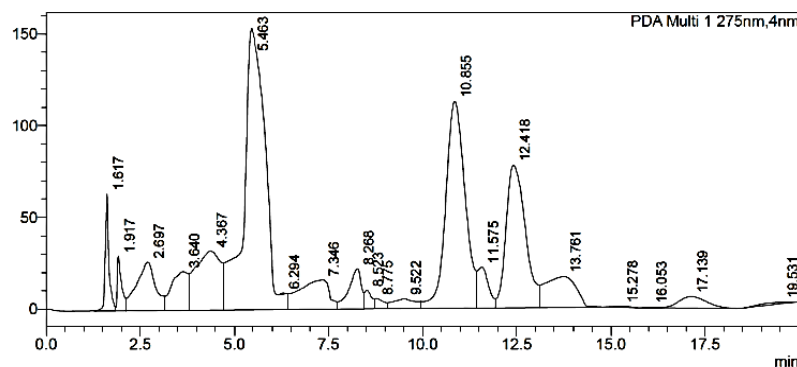


Figure 6. Dry extract (*rhodiola rosea* L.)

Table 1. Results of quantity analysis for salidroside in plant and dry extract

Items	Salidroside, %
<i>Rhodiola crenulata</i> L. dry extract	3.5±0.00036

n=3 ±SD

БНХАУ-аас татан авалт хийсэн ягаан мүгээ (*Rhodiola rosea* L.)-ийн хуурай хандны салидрозидийн агууламж дагалдах сертификатын шаардлагыг хангаж байсанаас гадна бидний аргын тохируулга хийсэн шинжилгээний арга дээжинд салидрозид тодорхойлоход тохиромжтой байв. Иймд тус арга зүйг олон улсад зөвшөөрөгдөхүйц хэмжээнд

баталгаажуулахын тулд аргын баталгаажилтын судалгааг хийв. Аргын баталгаажилт (method validation)-ийг ягаан мүгээ ургамлын хуурай ханданд, Олон Улсын Тохируулгын Зөвлөл (International Council of Harmonisation)-ийн Чанарын Хөтөч (Quality Guidelines)-ийн Q2(R1) хэсэгт заасаны дагуу гүйцэтгэв⁹.

Аргын баталгаажилт

Тодорхой үзүүлэлтүүдийн тусламжтайгаар тухайн арга дээжинд тохирч байгааг баталдаг ба үүнд: Үнэмшилт чанар (accuracy), нарийвчлал (precision), дундаж утгын нарийвчлал (intermediate precision), давтагдах чанар (repeatability), сонгомол чанар (specificity),

илрүүлэх хязгаар (detection limit), тодорхойлогдох хязгаар (quantitation limit), шугаман чанар (linearity) зэрэг үзүүлэлтүүд багтана.

Үнэмшилт чанар (accuracy)

Үнэмшилт чанар тодорхойлсон дүнг хүснэгт 2-т үзүүлэв.

Table 2. Results of accuracy

No	Sample concentration, %	Results, %	Recovery, %	Average, %	Comply	%RSD	Comply
1	50%	1.75	1.88	107.82	agreed	1.12	agreed
2		1.75	1.91	109.43			
3		1.75	1.78	102.16			
		Tolerance		90-110%			
1	100%	3.5	3.48	99.57	agreed	1.19	agreed
2		3.5	3.3	95.35			
3		3.5	3.69	105.49			
		Tolerance		90-110%			
1	150%	5.25	5.026	95.74	agreed	1.79	agreed
2		5.25	4.902	93.38			
3		5.25	4.826	91.93			
		Tolerance		90-110%			

Ажлын уусмалын концентрациас ялгаатай (50%, 100%, 150%) концентрациар, концентраци тус бүр 3 давталттай (n=3) дээж бэлтгэн шинжилэхэд сэргээгдэх утга 91-109%, харьцангуй стандарт хазайлт 50% - 1.12, 100% - 1.19, 150% - 1.79% байгаа нь ICH-ийн удирдамжын шаардлагыг хангаж байв.

Нарийвчлал (precision)

Ягаанмүгээ (*Rhodiola rosea* L.) ургамлын хуурай хандны салидрозидийн тооны тодорхойлолт хийх аргын нарийвчлалыг 2 багажинд, 2 өөр шинжээч, 2 өөр өдөр хийж тус бүр 5 удаагийн

давталттай хэмжилтээр шалгахад харьцангуй стандарт хазайлт 2%-иас ихгүй байгаа нь шаардлага хангаж байна. Мөн давтагдах чанарыг 10 дээжинд тодорхойлоход харьцангуй стандарт хазайлт 1.84% гарч шаардлага хангав.

Сонгомол чанар (Selectivity)

Дээжинд агуулагдах салидрозидийн пикийн тэгш хэм (symmetrical) сайн, илрэх хугацаа ижил, салалт сайн байгаа нь тус арга зүйн сонгомол чанар сайтайг илтгэж байна. Стандарт салидрозид болон ягаан мүгээ ургамлын хуурай хандны пикийг зураг 10, 11-т үзүүлэв.

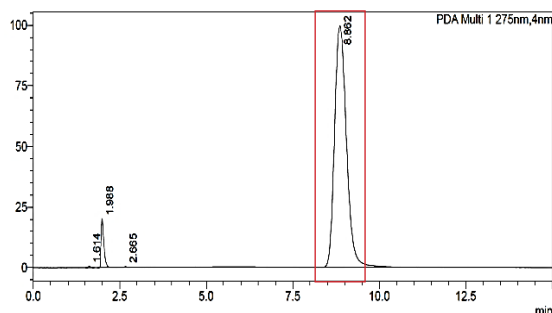


Figure 7. Salidroside (reference subs) peak

Шугаман чанар (linearity)

Салидрозидийн шугаман чанарыг тодорхойлохдоо 100, 200, 300, 400, 600,

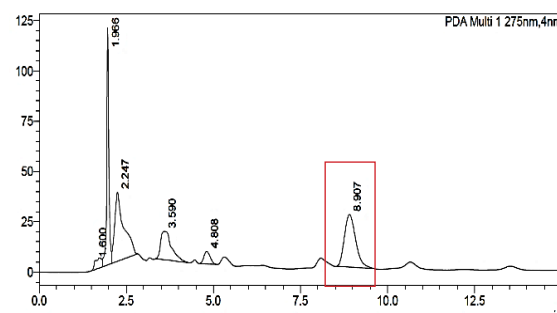


Figure 8. Dry extract (*Rhodiola rosea* L.) peak

800, мкг/мл концентрацитай стандарт салидрозидийн уусмал бэлтгэн шугаман чанар тодорхойлоход корреляцийн коэффициент R2 =

1 байсан нь стандарт бодисийн концентраци, пикийн талбай нь шууд хамааралтайг баталж

байв. Шугаман чанар тодорхойлсон жиших муруйг зураг 12-т үзүүлэв.

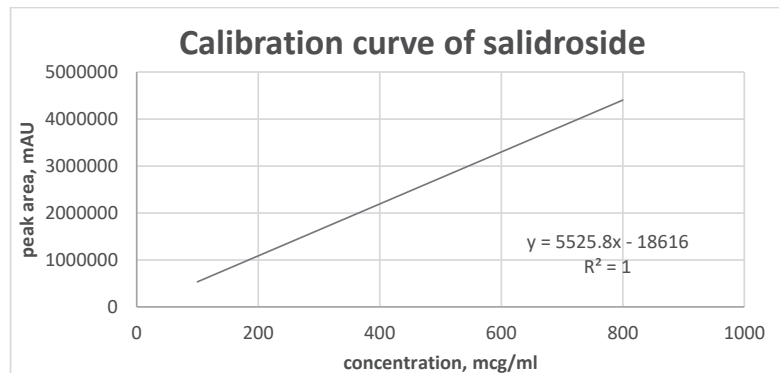


Figure 9. Calibration curve of salidroside

Илрүүлэх хязгаар, тодорхойлогдох хязгаар
(LOD, LOQ)

Илрүүлэх хязгаар, тодорхойлогдох хязгаарыг жиших муруйн шулууны тэгшитгэл ашиглан тооцоолж, хамгийн бага илрүүлэх концентраци 8.781 мкг/мл, хамгийн бага тодорхойлох концентраци 26.61 мкг/мл болохыг тогтоов.

Хэлцэмж

Ягаан мүгээ (*Rhodiola rosea* L.) ургамал нь Америкийн Нэгдсэн Улсын Фармакопей (USP 44; NF-39)-д ургамал, хуурай ханд, БНХАУ ын Фармакопей (CP2015)-д ургамал байдлаар стандартчилагдсан байдаг^{8,9}. Ингэхдээ Америкийн Фармакопейд хуурай хандандаа салидрозидийн агууламж 2%-иас багагүй, ургамлын үндэс, үндэслэг ишинд 0.6%-иас багагүй, Хятадын Фармакопейд ургамалдаа 0.5%-иас багагүй байхаар тус тус стандартчилагдсан байна. Бидний судалгаанд ашигласан ягаан мүгээ (*Rhodiola rosea* L.)-ийн хуурай ханд Америкийн Фармакопейн шаардлагыг хангаж байна. Мөн тус хуурай хандад хийсэн аргын баталгаажилтын судалгааны үр дүн шаардлага хангаж байгаа тул дээрх арга зүйг цаашид эм, биологийн идэвхт бүтээгдэхүүний түүхий эдийг стандартчилахад боломжтой нь тогтоогдов.

Ном зүй

1. В.И.Грубов “Монголын гуурст ургамал таних бичиг” Улаанбаатар, 2008 он, хуудас-160
2. Panossian, A., Wikman, G., Sarris, J., 2010. Rosenroot (*Rhodiola rosea*): traditional use.

chemical composition, pharmacology and clinical efficacy. *Phytomedicine* 17, 481–493.

3. Peter Ajdert., Larisa Jan., Robert Burman
Liquid chromatographic method for the quantification of salidroside and cinnamyl alcohol glycosides for quality control of golden root (*Rhodiola rosea* L.) Medicinal and aromatic plants 26 (2022) 100364
4. Booker, A., Jalil, B., Frommenwiler, D., Reich, E., Zhai, L., Kulic, Z., Heinrich, M., 2006a. The authenticity and quality of *Rhodiola rosea* products. *Phytomedicine* 23, 754–762.
5. European Medicines Agency (EMA), 2011. Assessment report on *Rhodiola rosea* L., rhizome et radix. EMA/HMPC/232100/2011.
6. United States Pharmacopeia (USP), 2014. Herbal Medicines Compendium. *Rhodiola rosea* L Root and Rhizome, version 1.0
7. International Conference on Harmonization (ICH), Q2A: Text on Validation of Analytical Procedures: Definitions and Terminology, Vol. 60, US FDA Federal Register, 1995.
8. U.S. Pharmacopoeia : USP 44; NF-39, DSC, *Rhodiola crenulata* Root and Rhizome Dry Extract
9. Pharmacopoeia of People's Republic of China; CP2010, *Rhodiola crenulata* Radix et Rhizoma, 2010, Vol 1, p-376

Уншин танилцаж, нийтлэх санал өгсөн:
ЭЗУ-ы доктор, профессор Э.Сэлэнгэ