

**ЯГААН ЦЭЭНИЙН (*PAEONIA ANOMALA L.*) ХАНДМАЛЫН
ТООНЫ ШИНЖИЛГЭЭНИЙ АРГА, АРГА ЗҮЙН БАТАЛГААЖУУЛАЛТ**

Д. Оюунцэцэг, Г. Одонтуяа*

Эм Зүйн Шинжлэх Ухааны Их Сургууль

*odontuya.g@monos.mn

**THE QUANTITATIVE ANALYSIS METHODS VALIDATION OF
PAEONIA ANOMALA L. TINCTURE**

D. Oyuntsetseg, G. Odontuya*

Mongolian University of Pharmaceutical Sciences

*odontuya.g@monos.mn

ABSTRACT

Introduction: The development of analytical methods for evaluation of quality standard parameters of drugs and other health prophylactic, diagnostic, and therapeutic products is essential from the beginning in the process to release to the market finished product. Validation of developed analytical methods is one crucial part of the analysis.

Quantitative determination methods of the total main active compounds of the tincture prepared from the root and the herb of *Paeonia anomala* L. were developed. In order to verify whether the analytical procedure is suitable for its intended purpose parameters – accuracy, reproducibility, intermediate precision, and linearity were validated.

Materials and methods: The total phenolics in the tincture were determined by the reaction with Folin Chicolteau reagent and total monoterpene glycosides by the reaction with hydroxylamine in alkaline solution and ferric (III) chloride following spectrophotometric examination, respectively. Based on the achieved results of the developed quantitative methods which were validated according to the accepted and pursued technical documents in our country the Eurachem guide “The Fitness for Purpose of Analytical Methods” and Russian Pharmacopoeia 13 “Validation of analytical methodology”, where parameters as accuracy, precision – reproducibility, intermediate precision, and linearity are involved.

Conclusions: Statistical analysis of total phenolic compounds and total monoterpene glycosides in the *Paeonia anomala* tincture demonstrated that the bias calculated was for accuracy 0.674% and 0.703%, relative standard deviations were for reproducibility 0.896% and 0.798%, for intermediate precision 0.922% and 0.696%, respectively and the linearity – $R^2=0.9985$ and $R^2=0.9997$. All achieved results validated the appropriateness of the developed quantitative methods for the intended purpose.

Key words: *Validation, accuracy, precision, stability, linearity, SOP*

Судалгааны ажлын үндэслэл

Эм, биологийн идэвхт бүтээгдэхүүн, хүнсний бүтээгдэхүүний үйлдвэрлэлд хэрэглэгддэг түүхий эд, туслах бодисууд нь чанар, аюулгүйн бүх үзүүлэлтээрээ Монгол Улсын Фармакопей болон бусад улсын холбогдох фармакопейн өгүүллийн шаардлага хангаж байх ёстой. Бүтээгдэхүүний хүчинтэй хугацааны туршид тэдгээрийн аюулгүй, идэвхтэй, үр дүнтэй байдлыг баталгаажуулсан шинжилгээний арга, арга зүйгээр шалгадаг. Иймд эмийн шинжилгээний лабораторид ашиглахаар төлөвлөж буй шинжилгээний арга, арга зүйг хэрэглэхийн өмнө баталгаажуулсан байх ёстой байдаг. Шинжилгээний арга, арга зүйн баталгаажуулалт гэдэг нь тухайн арга, арга зүй нь хэрэглэх зорилгодоо нийцэж байгааг батлах үйл явц юм. Эмийн олон хэлбэрийн шинжилгээний үзүүлэлтүүдээс үйлчлэгч гол бодисыг илрүүлэн таних урвал ба тоо хэмжээг тодорхойлсон шинжилгээний дүн, хольцын тухай мэдээлэл, тоо хэмжээ нь зайлшгүй шалган баталгаажуулах үзүүлэлтүүд юм.

Бүтээгдэхүүний чанарын стандартыг тодорхойлох талаар чиглүүлж, шинжилгээний аргыг баталгаажуулдаг олон байгууллага бий. Манай улсад эм, биологийн идэвхт бүтээгдэхүүн, түүхий эдийн шинжилгээний аргыг Еврахими (Анализ Химийн Европын Нийгэмлэг) “Шинжилгээний аргын зорилгод нийцэх байдал” удирдамж¹ ба ОХУ-ын 13-р фармакопей дэх “Шинжилгээний арга, арга зүйн баталгаажуулалт”² фармакопейн өгүүлэлд заасан үзүүлэлтүүдийг шалган баталгаажуулдаг. Үүнд тухайн аргыг үнэмшилт чанар (accuracy), нарийвчлал (precision) – аргын нарийвчлал (тохирц - repeatability, завсрын нарийвчлал - intermediate precision), найдвартай чанар (ruggedness), таарц (reproducibility), шугаман чанар (linearity),

илрүүлэлтийн хязгаар (limit of detection, LOD), тоо хэмжээний хязгаар (limit of quantitation, LOQ), өвөрмөц онцлог байдал (specificity), шинжилгээний муж (range), тогтвортой чанар (robustness) гэсэн үзүүлэлтүүдээр баталгаажуулдаг.

Шинжилгээний арга, арга зүйн баталгаажуулалтыг дээж авах, дээжийг шинжилгээнд бэлтгэх, шинжилгээ хийх, үр дүнг үнэлэх, тайлагнах гэсэн үе шаттай явуулдаг. Арга, арга зүйн баталгаажуулалтыг техник үзүүлэлтийн хэмжээнд байгаа, шаардлага хангасан, тохируулга хийгдсэн, зөв ажилладаг багаж, тоног төхөөрөмжийг ашиглан хийдэг ба шинжилгээ, хэмжилтийг гүйцэтгэж буй ажилтан нь тухайн хийж буй ажилтай холбоотой онолын хангалттай мэдлэгтэй, туршилт, шинжилгээг гүйцэтгэх ур чадвартай, дадлага туршлагатай, шинжилгээ судалгааны явц дахь ажиглалтууддаа тулгуурлан зохих дүгнэлт, шийдвэр гаргах чадвартай, статистик боловсруулалт хийх зохих мэдлэгтэй, мэргэшсэн байх ёстой. Шинжилгээний үр дүн нь хэрэглэх зорилгодоо нийцсэн, найдвартай байх ёстой юм.

Иймд бидний бэлтгэсэн Ягаан цээнийн хандмалын үйлчлэгч бодисуудын тооны шинжилгээний арга, арга зүй нь хэрэглэх зорилгодоо нийцэж байгааг батлахын тулд баталгаажуулалтыг хийх шаардлагатай юм.

Зорилго, зорилт

Ягаан цээнийн хандмалын тооны шинжилгээний арга, арга зүйн баталгаажуулалтыг хийх зорилгын хүрээнд дараах зорилтуудыг дэвшүүлж байна.

1. Хандмалын үйлчлэгч бодис – нийт фенолт нэгдлийн тоо хэмжээг Фолин Чикольте урвалжтай, нийт монотерпений гликозидийн тоо хэмжээг

гидроксиламины шүлтийн уусмал ба төмрийн хлоридын уусмалтай үйлчлэлцүүлэн спектрофотометрийн арга, арга зүйн дагуу хийх.

2. Тооны шинжилгээний үр дүнд үндэслэн тухайн шинжилгээний арга, арга зүйг албан ёсны техникийн баримт бичигт заасны дагуу баталгаажуулж, түүнийг хэрэглэх зорилгодоо нийцэж байгааг батлах.

Арга, аргачлал

Тооны шинжилгээ: Хандмалын нийт фенолт нэгдлийн тоо хэмжээг дээжийг Фолин-Чикольте урвалжтай үйлчлэлцүүлэх^{3,4} монотерпений гликозидийн тоо хэмжээг гидроксиламины шүлтийн уусмал ба төмрийн хлоридын уусмалтай үйлчлэлцүүлэх⁵ спектрофотометрийн аргаар тус тус тодорхойлов.

1. Нийт фенолт нэгдлийн тоо хэмжээг тодорхойлох: Цээнийн хандмалаас 1 мл-ийг хэмжин 100 мл-ийн хэмжээст колбонд авч, хэмжээс хүртэл нэрсэн ус нэмнэ. Бэлтгэсэн уусмалыг тодорхой хэмжээгээр шингэрүүлэн Фолин-Чикольте урвалжтай урвалд оруулах ба үүссэн өнгөт нэгдлийн гэрэл шингээлтийг долгионы уртын 760 нм-ийн утганд спектрофотометрээр хэмжиж, стандарт бодис галлын хүчилд шилжүүлэн тодорхойлно.^{3,4,6}

2. Нийт монотерпений тоо хэмжээг тодорхойлох: Цээнийн хандмалаас 10 мл-ийг хэмжин авч, 2 г хөнгөнцагааны оксид агуулсан 10 мм-ийн голчтой шилэн багана дундуур нэвтрүүлсний дараа цэвэрлэгдсэн хандмалаас тодорхой концентрацтай уусмал бэлтгэнэ. Бэлтгэсэн уусмалыг гидроксиламины шүлтийн уусмал ба төмрийн хлоридын (III) уусмалтай урвалд оруулж, үүссэн өнгөт нэгдлийн гэрэл шингээлтийг долгионы уртын 512 нм-

ийн утганд спектрофотометрээр хэмжиж, стандарт бодис паеонифлоринд шилжүүлэн тодорхойлно.^{5,6}

Тооны шинжилгээний аргын баталгаажуулалт:

Тооны шинжилгээний үр дүнд үндэслэн аргыг Еврахими “Шинжилгээний аргын зорилгод нийцэх байдал” удирдамж, ОХУ-ын 13-р фармакопей дэх “Шинжилгээний арга, арга зүйн баталгаажуулалт”-нд заасан үнэмшилт чанар, нарийвчлал - таарц, лабораторийн тохирц, шугаман чанар гэсэн үзүүлэлтүүдээр баталгаажуулав.^{1,2,7}

Үр дүн

Бид дорно, өрнийн уламжлалт анагаах ухаанд өргөн хэрэглэгддэг Ягаан цээнэ ургамлын эмийн түүхий эд болох өвс ба үндэснээс тайвшруулах үйлдэлтэй хандмал бэлтгэсэн ба түүнийг стандартчилахдаа МУҮФ 2011⁸, ОХУ-ын 14-р фармакопейд⁹ заасан үзүүлэлтүүдийг тодорхойлон Үйлдвэрлэгчийн Фармакопейн Өгүүлэл боловсруулан баталгаажуулсан ҮФӨ-0327-2017⁶ болно. Эмийн шинжилгээний арга, арга зүй боловсруулах ба баталгаажуулах нь өөр хоорондоо хамааралтай, зайлшгүй хийж байх ёстой ажил юм.

Гарган авсан Ягаан цээнийн хандмал дахь үйлчлэгч бодис – нийт фенолт нэгдлийн тоо хэмжээг Фолин-Чикольте урвалжтай үйлчлэлцүүлэх буюу урвалж дахь $Mo(VI) + e = Mo(V)$ ангижрах^{3,4,6} ба нийт монотерпений гликозидийн тоо хэмжээг гидроксиламины шүлтийн уусмал ба төмрийн хлоридын (III) уусмалтай урвалд оруулан комплекс нэгдэл үүсгэн спектрофотометрийн аргаар тодорхойлов.^{5,6} Тооны шинжилгээний үр дүнд үндэслэн аргыг манай улсад шинжилгээний арга, арга зүйг баталгаажуулахад удирдамж

болгон мөрдөж буй Еврахими “Шинжилгээний аргын зорилгод нийцэх байдал” удирдамж¹, ОХУ-ын 13-р фармакопей дэх “Шинжилгээний арга, арга зүйн баталгаажуулалт”-нд² заасны дагуу үнэмшилт чанар, нарийвчлал – таарц, лабораторийн тохирц, шугаман чанар гэсэн үзүүлэлтүүдээр баталгаажуулав.

Нийт фенолт нэгдлийн тооны шинжилгээний аргын баталгаажуулалтын үр дүнг хүснэгт 1, 2, 3, зураг 1-д, нийт монотерпений гликозидийн тооны шинжилгээний аргын баталгаажуулалтыг хүснэгт 1, 2, 4, зураг 2-т тус тус үзүүлэв.

Table 1. Accuracy of methods determination of total phenolic compounds and total monoterpene glycosides

Repetition of analysis	Total phenolic compounds, %	Bias	Bias, %	Total monoterpene glycosides, %	Bias	Bias, %
1	0.346	0	0	1.08	0.01	0.917
2	0.350	-0.004	1.156	1.101	-0.011	1.009
3	0.348	-0.002	0.578	1.085	0.005	0.458
4	0.340	0.006	1.734	1.082	0.008	0.734
5	0.348	-0.002	0.578	1.102	-0.012	1.101
6	0.346	0	0	1.09	0	0
Average	0.346±0.0031	-0.00033	0.674	1.09±0.0087	0	0.703

Хандмал дахь нийт фенолт нэгдлийн тооны шинжилгээний үр дүнгийн алдаа -0.004-өөс 0.006-ын хооронд буюу дунджаар 0.674%, нийт монотерпений гликозидийн

тооны шинжилгээний үр дүнгийн алдаа -0.012-оос 0.01-ийн хооронд буюу дунджаар 0.703% байгаа тул эдгээр арга, арга зүйн үнэмшилт чанар тохирч байна.

Table 2. Precision - repeatability of determination methods of total phenolic compounds and total monoterpene glycosides

Repetition of analysis	Total phenolic compounds, %	Total monoterpene glycosides, %
1	0.346	1.08
2	0.350	1.101
3	0.348	1.085
4	0.340	1.082
5	0.348	1.102
6	0.346	1.09
Average	0.346±0.0031	1.09±0.0087
Standard deviation, S	0.0031	0.0087
Relative standard deviation, RSD, %	0.896	0.798

Нийт фенолт нэгдэл ба нийт монотерпений гликозидийн тооны шинжилгээний үр дүнгийн стандарт хазайлтын утга 0.0031 ба 0.0087, харьцангуй стандарт хазайлт нь 0.896%

ба 0.798% байгаа тул энэ арга, арга зүй нь нарийвчлалтай буюу нарийвчлалын таарц тохирч байна.

Table 3. Precision - Intermediate precision of the determination method of total phenolic compounds

Repetition of analysis	Operator 1		Operator 2	
	Day 1	Day 2	Day 1	Day 2
1	0.344	0.346	0.342	0.344
2	0.352	0.351	0.348	0.346
3	0.346	0.348	0.346	0.344
4	0.342	0.344	0.350	0.352
5	0.351	0.346	0.346	0.345
6	0.348	0.349	0.351	0.352
Average	0.3471±0.003	0.3473±0.002	0.3471±0.002	0.3471±0.004
Repeatability, S	0.00392	0.0025	0.0026	0.004
Intermediate reproducibility, S			0.0032	
Relative standard deviation, RSD, %			0.922	

Нэг лабораторийн хоёр шинжлэгчийн утга 0.0032, харьцангуй стандарт хазайлт нь тодорхойлсон нийт фенолт нэгдлийн тооны 0.922% байгаа тул лабораторийн тохирц нь шинжилгээний үр дүнгийн стандарт хазайлтын таарч байна.

Table 4. Precision - Intermediate precision of the determination method of total monoterpenes glycosides

Repetition of analysis	Operator 1		Operator 2	
	Day 1	Day 2	Day 1	Day 2
1	1.09	1.088	1.09	1.098
2	1.1	1.101	1.101	1.1
3	1.08	1.081	1.09	1.091
4	1.085	1.09	1.084	1.082
5	1.102	1.101	1.101	1.094
6	1.08	1.09	1.09	1.091
Average	1.0895±0.009	1.091±0.007	1.092±0.006	1.092±0.006
Repeatability, S	0.00967	0.0078	0.0068	0.0063
Intermediate reproducibility, S			0.0076	
Relative standard deviation, RSD, %			0.696	

Нэг лабораторийн хоёр шинжлэгчийн гликозидийн тоо хэмжээг паеонифлоринд тодорхойлсон нийт монотерпений шилжүүлэн тус тус тодорхойлсон ба стандарт гликозидийн тооны шинжилгээний үр дүнгийн бодисуудын уусмалын жиших муруйг зураг 1, стандарт хазайлтын утга 0.0076, харьцангуй 2-т үзүүлэв. стандарт хазайлтын утга 0.696% байгаа тул лабораторийн тохирц нь таарч байна.

Хандмал дахь нийт фенолт нэгдлийн тоо хэмжээг галлын хүчилд, нийт монотерпений

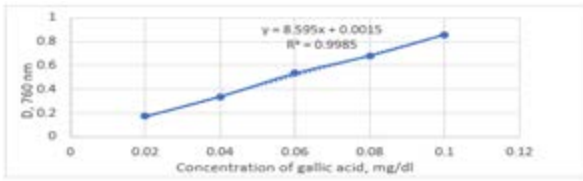


Figure 1. Reference curves of standard gallic acid

Fig 1. Reference curve of standard gallic acid

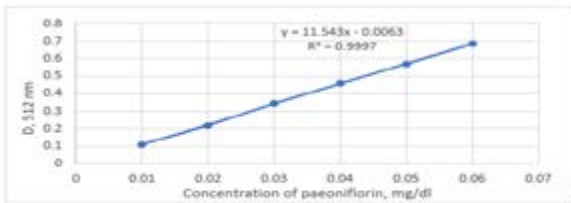


Figure 2. Reference curves of standard paeoniflorin

Fig 2. Reference curve of standard paeoniflorin

Стандарт галлын хүчил ба пaeонифлорины уусмалын концентрацийн өөрчлөлт нь хэмжилт хийж буй гэрлийн долгионы утга дахь шингээлттэй шууд хамааралтай буюу регрессийн коэффициент $R^2=0.9985$ ба $R^2=0.9997$ байна. Иймд стандарт бодисуудын жиших муруйг ашиглаж хандмал дахь үйлчлэгч бодисуудын тооны шинжилгээг хийж болно.

Хэлцэмж

Эм, бэлдмэл, биологийн идэвхт ба хүнсний бүтээгдэхүүн үйлдвэрлэлийн технологийн үе шат бүрт түүхий эд, завсрын болон эцсийн бүтээгдэхүүний чанарыг шинжлэн, үйлчлэгч бодис ба туслах бодисуудын чанар шаардлага хангаж байгаа эсэх, тоо хэмжээ нь үйлчлэх тунгийн хэмжээнд байгаа эсэхийг тодорхойлон хянаж байх нь зах зээлд чанартай бүтээгдэхүүн нийлүүлэхэд чухал ач холбогдолтой.

Эмийн шинжилгээнд боловсруулан хэрэглэсэн арга, арга зүй нь зорилгодоо нийцсэн байх нь нэн чухал тул бид Ягаан цээнийн өвс, үндэс түүхий эдээс бэлтгэсэн хандмал дахь үйлчлэгч бодис – нийт фенолт нэгдэл ба нийт монотерпений гликозидийн тоо хэмжээг олон улсад хүлээн зөвшөөрөгдсөн

аргаар тодорхойлж, бүтээгдэхүүний стандарт (ҮФӨ-0327-2017) боловсруулан батлуулав.^{3,4,5,6} Хандмал дахь үйлчлэгч бодисуудын тооны шинжилгээний арга, арга зүйг техникийн баримт бичгүүдэд заасан үнэмшилт чанар, нарийвчлалыг таарц, лабораторийн тохирц, шугаман чанар гэсэн үзүүлэлтүүдээр баталгаажуулав (Хүснэгт 1-4, зураг 1).^{1,2}

Дээрх техникийн баримт бичгүүдэд шинжилгээний үр дүнгүүдийн алдааны дундаж утга, тухайлбал үнэмшилт чанарын хувьд 5%-иас ихгүй, нэг шинжлэгч богино хугацаанд нэг дээжийг ижил нөхцөлд олон давтан шинжилсэн үр дүнгүүдийн харьцангуй стандарт хазайлт буюу таарц 2%-иас ихгүй, нэг лабораторийн хоёр ба түүнээс олон шинжлэгч нэг дээжийг өөр өөр хугацаанд давтан шинжилсэн үр дүнгүүдийн харьцангуй стандарт хазайлтын утга буюу лабораторийн тохирц 2%-иас ихгүй, регрессийн коэффициент буюу шугаман чанар $R^2=0.99-1.01$ бол шинжилгээний арга, арга зүй нь хэрэглэх зорилгодоо нийцэж байна гэж заасан байдаг.^{1,2,7} Бидний бэлтгэсэн Ягаан цээнийн хандмал дахь нийт фенолт нэгдэл ба монотерпений гликозидийн тооны шинжилгээний үр дүнд статистик боловсруулалт хийхэд үнэмшилт чанарын алдаа 0.674% ба 0.703%, таарц 0.896% ба 0.798%, лабораторийн тохирц 0.922% ба 0.696%, шугаман чанар $R^2=0.9985$ ба $R^2=0.9997$ байгаа тул энэхүү хандмалын тооны шинжилгээний арга, арга зүй нь хэрэглэх зорилгодоо нийцэж байна.

Дүгнэлт

Ягаан цээнэ ургамлын үндэс ба өвснөөс бэлтгэсэн тайвшруулах үйлдэлтэй хандмалын стандартыг боловсруулан Үйлдвэрлэгчийн Фармакопейн Өгүүлэл - ҮФӨ-0327-2017 батлуулсан ба түүнд агуулагдах үйлчлэгч бодисууд болох нийт фенолт

нэгдэл, монотерпений гликозидийн тооны шинжилгээний арга, арга зүйг Монгол улсад мөрдөгдөж буй Еврахими “Шинжилгээний аргын зорилгод нийцэх байдал” удирдамж, ОХУ-ын 13-р фармакопей дэх “Шинжилгээний арга, арга зүйн баталгаажуулалт”-ын дагуу баталгаажуулав. Хандмал дахь үйлчлэгч бодисуудын тоон агууламжийг тодорхойлсон арга, арга зүй нь үнэмшилт чанар, нарийвчлал – таарц, лабораторийн тохирц, шугаман чанар гэсэн үзүүлэлтүүдээр хэрэглэх зорилгодоо нийцэж байгааг батлав.

Ном зүй

1. Eurachem. A Laboratory Guide to Method Validation and Related Topics. Geneva, Switzerland, 2014, 27-45.
2. Государственная Фармакопея Российской Федерации 13 издание, Валидация аналитических методик (ОФС.1.1.0012.15), Москва, *Издательство “Научный центр экспертизы средств медицинского применения”*, 2015, Том 1, 222-264.
3. Singleton V.L, Rossi J.A. Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic and phosphor-tungstic acid reagents. *Am. J. Enol. Vitic.*, 1965, 16, 144-153.
4. Maurya S., Singh D. Quantitative analysis of total phenolic content in *Adhadota vasica* nees extract. *Inter. J. Pharm. Tech. Res.*, 2010, 2(4), 2403-2406.
5. Фармакопейная статья, ФС-42-588-2003. Настойка Пиона уклоняющегося.
6. Үйлдвэрлэгчийн фармакопейн өгүүлэл, Ягаан цээнийн хандмал, ҮФӨ-0327-2017.
7. Тоон мэдээлэлд дүн шинжилгээ хийх гарын авлага. Улаанбаатар, Үндэсний статистикийн хороо, 2017, 98-176.
8. Монгол Улсын Үндэсний Фармакопей. Хандмал. Улаанбаатар, Соёмбо принтинг, 2011, 464-468.
9. Государственная Фармакопея Российской Федерации 14 издание, Настойка. Москва, *Издательство “Научный центр экспертизы средств медицинского применения”*, 2018, Том 2, 1968-1972.

Уншин танилцаж, нийтлэх санал өгсөн:

ЭЗУ-ы доктор, дэд профессор
Л.Уламбаяр