

УДК 615.32:547.9+543.544



ВОПРОСЫ СТАНДАРТИЗАЦИИ ЛЕКАРСТВЕННЫХ ПРЕПАРАТОВ РОДИОЛЫ РОЗОВОЙ

В.А. Куркин, Т.К. Рязанова

Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования
«Самарский государственный медицинский университет»
Министерства здравоохранения Российской Федерации
443099, Россия, г. Самара, ул. Чапаевская, 89

E-mail: v.a.kurkin@samsmu.ru

Получено 15.02.2021

Принята к печати 16.05.2021

Родиола розовая (*Rhodiola rosea* L.), фармакопейным сырьем которой являются корневища и корни, применяется в официальной медицине для получения лекарственных препаратов с адаптогенной активностью. Одной из распространенных проблем при производстве лекарственных препаратов из корневищ и корней родиолы розовой является использование недоброкачественного лекарственного растительного сырья, что приводит к отсутствию значимых биологически активных соединений в препаратах. Одной из возможных причин являются недостатки в существующих подходах к стандартизации сырья и препаратов родиолы розовой.

Цель. Совершенствование существующих подходов к стандартизации лекарственных препаратов корневищ и корней родиолы розовой.

Материалы и методы. В качестве объектов исследования использовали экспериментальные и промышленные образцы экстракта жидкого корневищ и корней родиолы розовой, а также стандартные образцы розавина и салидрозида. ВЭЖХ-анализ осуществляли с использованием хроматографа «Милихром-6» (НПАО «Научприбор») в следующих условиях: метод – обращенно-фазовая хроматография в изократическом режиме (стальная колонка «КАХ-6-80-4», размер 2 мм x 80 мм; Сепарон-С18 7 мкм); подвижная фаза – ацетонитрил : 1% раствор уксусной кислоты в воде в соотношении 14:86; скорость элюирования – 100 мкл/мин; объем элюента – 2000 мкл. Детекцию веществ осуществляли при длине волны 252 нм (розавин) и 278 нм (салидрозид).

Результаты. С использованием метода ВЭЖХ разработана методика количественного определения розавина и салидрозида в жидком экстракте родиолы розовой. Определено, что содержание розавина в образцах жидких экстрактов, полученных из корневищ и корней родиолы розовой фармакопейного качества, варьирует от 0,21%±0,03% до 0,32%±0,04%; салидрозида – от 1,13%±0,05% до 2,71%±0,12% соответственно. Результаты статистической обработки свидетельствуют о том, что относительная ошибка среднего результата определения розавина и салидрозида в препаратах родиолы розовой с доверительной вероятностью 95% не превышает ±6,0%.

Заключение. Таким образом, в работе обосновываются методологические подходы к анализу лекарственных препаратов корневищ и корней родиолы розовой (*Rhodiola rosea* L.), заключающиеся в количественном определении доминирующих и диагностически значимых биологически активных соединений – розавина и салидрозида.

Ключевые слова: родиола розовая; *Rhodiola rosea* L.; корневища и корни; жидкий экстракт; розавин; салидрозид; высокоэффективная жидкостная хроматография

Список сокращений: ВЭЖХ – высокоэффективная жидкостная хроматография; ТСХ – тонкослойная хроматография; УФ – ультрафиолетовая область; ФС – фармакопейная статья; ОФС – общая фармакопейная статья; ЯМР – ядерный магнитный резонанс

STANDARDIZATION PROBLEMS OF MEDICINAL PREPARATIONS FROM *RHODIOLA ROSEA* L.

V.A. Kurkin, T.K. Ryazanova

Samara State Medical University,
89, Chapayevskaya Str., Samara, Russia, 443099

E-mail: v.a.kurkin@samsmu.ru

Received 15 Feb 2021

Accepted 16 May 2021

Для цитирования: В.А. Куркин, Т.К. Рязанова. Вопросы стандартизации лекарственных препаратов родиолы розовой. *Фармация и фармакология*. 2021;9(3):185-194. DOI: 10.19163/2307-9266-2021-9-3-185-194

© В.А. Куркин, Т.К. Рязанова, 2021

For citation: V.A. Kurkin, T.K. Ryazanova. Standardization problems of medicinal preparations from *Rhodiola rosea* L. *Pharmacy & Pharmacology*. 2021;9(3):185-194. DOI: 10.19163/2307-9266-2021-9-3-185-194

Rhodiola rosea L. rhizomes and roots are pharmacopoeial raw materials, which are used in official medicine for obtaining medicines with adaptogenic activity. One of the most common problems in the production of medicines from *Rhodiola rosea* L. rhizomes and roots is the use of poor quality medicinal plant materials, which leads to the absence of biologically significant compounds in the preparations. One of the possible reasons is the shortcomings in the existing approaches to the standardization of *Rhodiola rosea* L. raw materials and preparations.

The aim of the study is the improvement of approaches to the standardization of medicinal preparations from *Rhodiola rosea* L. rhizomes and roots.

Materials and methods. Experimental and industrial samples of liquid extract from *Rhodiola rosea* L. roots, as well as reference samples of rosavin and salidroside, were used as materials of the research. The HPLC analysis was carried out using a Milichrom-6 chromatograph (NPAO Nauchpribor) under the following conditions of reversed-phase chromatography in an isocratic mode: a steel column KAKH-6-80-4 (2 mm x 80 mm; Separon-C18 7 μ m), a mobile phase – acetonitrile: 1% solution of acetic acid in water in the ratio of 14:86, the elution rate was 100 μ L/min, the eluent volume was 2000 μ L. The constituents were detected at the wavelength of 252 nm (rosavin) and 278 nm (salidroside).

Results. An assay of rosavin and salidroside in the liquid extract of *Rhodiola rosea* L. was developed using the HPLC method. It was determined that the content of rosavin in the samples of the liquid extracts obtained from *Rhodiola rosea* L. rhizomes and roots of the pharmacopoeial quality, varied from 0.21% \pm 0.03% to 0.32% \pm 0.04%, salidroside – from 1.13% \pm 0.05% to 2.71% \pm 0.12%, respectively. The results of statistical processing indicate that the relative error of the average result for the determination of rosavin and salidroside in the preparations of *Rhodiola rosea* L. with a confidence level of 95% does not exceed \pm 6.0%.

Conclusion. Thus, methodological approaches to the analysis of medicinal preparations from *Rhodiola rosea* L. rhizomes and roots have been substantiated. These methodological approaches consist of the quantitative determination of the dominant and diagnostically significant biologically active compounds – rosavin and salidroside.

Keywords: *Rhodiola rosea* L.; rhizomes and roots; liquid extract; rosavin; salidroside; high performance liquid chromatography

Abbreviations: HPLC – high performance liquid chromatography; TLC – thin-layer chromatography; UV – ultraviolet; PM – pharmacopoeial monograph; GPM – general pharmacopoeial monograph; NMR – nuclear magnetic resonance

ВВЕДЕНИЕ

Родиола розовая (*Rhodiola rosea* L.), фармакопейным сырьем которой являются корневища и корни, применяется в официальной медицине для получения лекарственных препаратов с адаптогенной активностью. [1–6]. Виды рода *Rhodiola* sp. уже длительное время используются в качестве адаптогенов в России и странах Северной Европы. В последнее время для препаратов родиолы розовой также выявлен целый ряд новых фармакологических свойств, а именно: антиоксидантная, анксиолитическая, ноотропная, антидепрессантная, иммуномодулирующая активность [7–13]. Имеются сообщения, что препараты родиолы розовой повышают физическую выносливость, снижают утомляемость и оказывают терапевтическое действие при нарушениях желудочно-кишечного тракта, сердечно-сосудистой системы и центральной нервной системы. В отдельных исследованиях показано, что препараты родиолы розовой подавляют рост злокачественных новообразований. В то же время ассортимент лекарственных препаратов на основе корневищ и корней родиолы розовой, разрешенных к применению в Российской Федерации, представлен только экстрактом родиолы жидким разных производителей¹. Экстракт родиолы жидкий разрешен к применению с 1975 г. и рекомендуется в качестве адаптогенного и тонизирующего средства, не уступающего по своей активности препаратам женьшеня [14].

Фитохимические исследования показали, что биологическая активность сырья и препаратов родиолы розовой обусловлена шестью классами соедине-

ний: фенолпропаноиды, флавоноиды, фенолоспирты, фенольные кислоты, монотерпены и стерины. Основными биологически активными соединениями, обуславливающими фармакологическую активность сырья и препаратов родиолы розовой, являются фенолпропаноиды (розавин, розин, розарин) и фенолоспирты (тирозол, салидрозид) [15–20]. Для фенолпропаноидов известна антиоксидантная, нейростимулирующая, адаптогенная активность. С наличием фенолоспиртов также связывают адаптогенную активность сырья и препаратов родиолы розовой.

Стандартизация сырья и препаратов родиолы розовой в Государственной фармакопее Российской Федерации XIV издания (ФС.2.5.0036.15 «Родиолы розовой корневища и корни» и ФС.3.4.0008.18 «Родиолы розовой корневищ и корней экстракт жидкий») предусматривает количественное определение содержания салидрозида и суммы гликозидов коричневого спирта в пересчете на розавин^{2,3} [21]. Анализ проводят методом высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) с УФ-детектированием (219 нм – определение салидрозида, 250 нм – определение суммы гликозидов коричневого спирта в пересчете на розавин) с применением колонки 250 x 4,0 мм, эндкепированный октадецилсилил (C18) силикагель для хроматографии, 5 мкм), подвижная фаза – ацетонитрил : фосфатный буфер (pH 7,0), элюирование в градиентном режиме с увеличением концентрации ацетонитрила от 11% до 60%, скорость элюирования – 1,0 мл/мин, объем вводимой пробы – 10 мкл. Время хроматографирования – 35 мин.

² ФС.2.5.0036.15 «Родиолы розовой корневища и корни».

³ ФС.3.4.0008.18 «Родиолы розовой корневищ и корней экстракт жидкий».

¹ Государственный реестр лекарственных средств [Электронный ресурс]. Режим доступа: <http://grls.rosminzdrav.ru/grls.aspx>.

В то же время вызывает сомнение целесообразность определения суммы гликозидов коричневого спирта в пересчете на розавин. Розавин является наиболее лабильным соединением, который по сравнению с другими гликозидами коричневого спирта более чувствителен к условиям получения и хранения сырья в связи с возможностью ферментативного разрушения под воздействием фермента вицианоцидазы [1, 2]. Вицианоцидаза способствует отщеплению вицианозы – углеводного фрагмента молекулы розавина – и проявляет максимальную активность в температурном интервале 40–60°C, который ранее рекомендовался для сушки сырья родиолы. Хранение недосушенных корневищ, экстракция свежего сырья этанолом при комнатной температуре также способствует разрушающему действию ферментов на состав биологических активных компонентов. Разрушение розавина приводит к образованию биологически неактивного коричневого спирта, соответственно снижается фармакологическая активность сырья и препаратов родиолы розовой [1, 2].

В связи с этим в целях стандартизации сырья более концептуально верным подходом, на наш взгляд, является количественное определение содержания не суммы гликозидов коричневого спирта, а наиболее уязвимого компонента – розавина. Уровень его содержания надежно отражает правильность условий хранения и сушки корневищ и корней родиолы розовой [1, 2].

Эти предположения подтверждаются результатами выборочного контроля качества сырья и препаратов (экстракты, гранулированные порошки) родиолы розовой [22–26]. Booker A. и соавт. в результате анализа 40 коммерческих продуктов родиолы розовой разных поставщиков, представленных на рынке Европейского Союза, выявили, что примерно одна пятая часть этих продуктов не содержит розавин, один из основных компонентов родиолы розовой. Более того, некоторые продукты не содержали салидрозид, компонент, характерный для представителей рода *Rhodiola*. Содержание розавина примерно в 80% остальных коммерческих продуктов было ниже заявленного, и, предполагается, что они были получены из других видов рода Родиола [23].

Следовательно, розавин является именно тем маркером, который позволяет достоверно оценивать качество сырья и препаратов родиолы розовой, и проблема надлежащего контроля качества сырья и препаратов родиолы розовой носит общемировой характер.

Следует также отметить, что включенные в фармакопейные статьи методики количественного определения предусматривают проведение анализа методом ВЭЖХ в градиентном режиме элюирования^{2,3} [21]. Известно, что при градиентном режиме корректировка условий является более критичной, может привести к некорректной идентификации пиков, их наложению или сдвигам, при которых анализируемые вещества могут выйти до или после указанного времени реги-

страции хроматограммы. На наш взгляд, подбор условий для проведения анализа в изократическом режиме позволит повысить воспроизводимость методики⁴ [21]. Кроме того, используемая в фармакопейной методике для детекции салидрозидов длина волны 219 нм менее специфична по отношению к сопутствующим компонентам по сравнению с другим максимумом поглощения этого соединения – 278 нм [2].

ЦЕЛЬ. Совершенствование существующих подходов к стандартизации лекарственных препаратов корневищ и корней родиолы розовой, принятых в Государственной фармакопее Российской Федерации XIV издания.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Объекты исследования

В качестве объекта исследования использовали экспериментальные и промышленные образцы экстракта жидкого корневищ и корней родиолы розовой.

Экспериментальные образцы получали методом модифицированной мацерации из лекарственного растительного сырья, заготовленного в 2016–2018 гг. (Алтайский край). Стандартный образец розавина, соответствующий требованиям ФС 42-0071-01, получен авторами статьи из корневищ и корней родиолы розовой с использованием колоночной хроматографии на силикагеле и последующей перекристаллизации из этанола 95%. Стандартный образец салидрозидов, имеющий, по данным ТСХ, УФ-, ЯМР-спектроскопии и т.п. (162–164°C), степень чистоты не менее 98,0%, получен авторами статьи из корневищ и корней родиолы розовой с использованием колоночной хроматографии на силикагеле, рехроматографии на полиамиде и последующей перекристаллизации из смеси хлороформа и этанола 95%.

В работе использовали ацетонитрил (ООО «Компонент-реактив», «Для высокоэффективной жидкостной хроматографии»); воду, полученную с использованием системы для получения воды очищенной многоступенчатой системой очистки (адсорбция, обратный осмос, мембранное фильтрование) и проверенную на чистоту в условиях хроматографического анализа. Остальные реактивы имели степень чистоты ч.д.а. или х.ч.

Приготовление растворов

Приготовление раствора стандартного образца салидрозидов. Около 0,025 г (точная навеска) государственного стандартного образца салидрозидов (содержание основного вещества 98%) помещают в мерную колбу вместимостью 50 мл, растворяют в небольшом количестве этанола 95%, доводят этанолом 95% до метки, перемешивают.

Приготовление стандартного раствора розавина. Около 0,025 г (точная навеска) государственного стандартного образца розавина (содержание основного

⁴ ОФС.1.2.1.2.0001.15 Хроматография.

вещества 98%) помещают в мерную колбу вместимостью 50 мл, растворяют в небольшом количестве этанола 95% при нагревании на кипящей водяной бане, доводят этанолом 95% до метки, перемешивают.

Условия хроматографического разделения

ВЭЖХ-анализ осуществляли с использованием хроматографа «Милихром-6» (НПАО «Научприбор») в следующих условиях: метод обращенно-фазовой хроматографии, изократический режим, колонка «КАХ-6-80-4» (2 мм × 80 мм; Сепарон-С18, 7 мкм), подвижная фаза – ацетонитрил: 1% раствор уксусной кислоты в воде в соотношении 14:86, скорость элюирования – 100 мкл/мин, объем элюента – 2000 мкл. Детекцию веществ осуществляли при длине волны 252 нм (розавин) и 278 нм (салидрозид). Объемы инжектируемых проб: 3 мкл (стандартные растворы розавина и салидрозид) и 5 мкл (экспериментальные образцы жидких экстрактов родиолы розовой).

Оценка пригодности системы

Пригодность хроматографической системы оценивали в соответствии с ОФС.1.2.1.2.0001.15 «Хроматография». Показатели пригодности хроматографической системы (эффективность колонки, разрешение между пиками, фактор асимметрии) рассчитывали по результатам 5-кратного анализа 5 мкл раствора экстракта жидкого из корневищ и корней родиолы розовой.

Результаты оценки пригодности системы подтверждают пригодность хроматографической системы для количественного определения салидрозид и розавина в сырье и препаратах родиолы розовой (таблица 1).

Методика одновременного количественного определения розавина и салидрозид в родиолы розовой корневищ и корней экстракте жидком

Около 1 мл родиолы розовой корневищ и корней экстракта жидкого помещают в мерную колбу вместимостью 25 мл, доводят водой очищенной до метки. Перед анализом аликвоту образца дополнительно фильтруют через мембранный фильтр Milipore (0,45 мкм) (испытываемый раствор).

5 мкл испытываемого раствора вводят в жидкостной хроматограф «Милихром-6» с УФ-детектором и хроматографируют, как описано в разделе «Условия хроматографического разделения».

Параллельно по 3 мкл растворов стандартных образцов салидрозид и розавина вводят в хроматограф и хроматографируют, как описано выше. Проводят определение высоты пика салидрозид на хроматограмме при длине волны 278 нм и площади пика розавина на хроматограмме при длине волны 252 нм. Рассчитывают средние значения по результатам трех параллельных определений.

Содержание салидрозид (X , в %) рассчитывают по формуле:

$$X, \% = \frac{H_i \times m_{st} \times V_1 \times V \times 100}{H_{st} \times V_{st} \times V_2 \times V_{аликвоты}},$$

где: H_i – высота пика салидрозид на хроматограмме испытываемого раствора, е.о.п.; H_{st} – высота пика салидрозид на хроматограмме стандартного раствора, е.о.п.; m_{st} – точная навеска стандарта салидрозид, г; V_{st} – объем приготовленного раствора стандартного образца салидрозид, мл; V_1 – объем вводимой пробы раствора стандартного образца, мкл; V_2 – объем вводимой пробы испытываемого раствора, мкл; V – объем мерной колбы, в которой разводили аликвоту родиолы корневищ и корней экстракта жидкого, мл; $V_{аликвоты}$ – объем аликвоты родиолы корневищ и корней экстракта жидкого, мл.

Содержание розавина (X в процентах) рассчитывают по формуле:

$$X, \% = \frac{S_i \times m_{st} \times V_1 \times V \times 100}{S_{st} \times V_{st} \times V_2 \times V_{аликвоты}},$$

где: S_i – площадь пика розавина на хроматограмме испытываемого раствора; S_{st} – площадь пика розавина на хроматограмме стандартного раствора; m_{st} – точная навеска стандарта розавина, г; V_{st} – объем приготовленного раствора стандартного образца салидрозид, мл; V_1 – объем вводимой пробы раствора стандартного образца, мкл; V_2 – объем вводимой пробы испытываемого раствора, мкл; V – объем мерной колбы, в которой разводили аликвоту родиолы корневищ и корней экстракта жидкого, мл; $V_{аликвоты}$ – объем аликвоты родиолы корневищ и корней экстракта жидкого, мл.

Валидация методики

Валидационная оценка разработанной методики проводилась по показателям: специфичность, линейность, правильность (открываемость), прецизионность. Специфичность методики определялась по соответствию времен удерживания стандартных образцов салидрозид и розавина и пиков, соответствующих этим стандартам на ВЭЖХ-хроматограмме испытываемого раствора, а также по разрешению между наиболее близкими пиками и фактору асимметрии пиков салидрозид и розавина.

Определение линейности проводили на пяти уровнях концентраций растворов стандартных образцов (с концентрациями в диапазоне от 0,1467 до 1,4667 мг/мл для салидрозид и от 0,1200 до 0,9600 мг/мл для розавина). На основании полученных данных строили график в координатах «концентрация, мг/мл – высота пика» или «концентрация, мг/мл – площадь пика» и рассчитывали уравнение линейной регрессии ($Y = ax + b$), значение коэффициента детерминации (r^2), стандартное отклонение с использованием программного обеспечения Microsoft Excel 2013.

Правильность методики тестировали путем введения в аликвоту препарата родиолы розовой навески стандартных образцов розавина и салидрозид в количестве от 80% до 120% от исходного содержания. Испытания проводили в трех повторностях.

Таблица 1 – Определение пригодности хроматографической колонки

Параметр хроматографической колонки	Значение	Нормативный показатель
Эффективность колонки (салидрозид)	5100	Не менее 5000
Эффективность колонки (розавин)	5201	теоретических тарелок
Разрешение между наиболее близкими пиками (салидрозид)	1,6	Не менее 1,5
Разрешение между наиболее близкими пиками (розавин)	2,3	
Фактор асимметрии (салидрозид)	1,47	Не более 1,5
Фактор асимметрии (розавин)	1,21	

Таблица 2 – Метрологические характеристики методики количественного определения салидрозид и розавина в жидких экстрактах родиолы розовой

Анализируемое вещество	<i>f</i>	$\bar{X},\%$	<i>S</i>	<i>P, %</i>	<i>t (P, f)</i>	$\Delta\bar{X}$	$\bar{\varepsilon},\%$
Салидрозид	10	2,02	0,160114	95	2,23	$\pm 0,11$	$\pm 5,33$
Розавин	10	0,22	0,014460	95	2,23	$\pm 0,04$	$\pm 4,43$

Примечание: *f* – число степеней свободы; \bar{X} – среднее значение; *S* – стандартное отклонение; *P* – доверительная вероятность, *t* – *t*-критерий Стьюдента, $\Delta\bar{X}$ – полуширина доверительного интервала среднего результата; $\bar{\varepsilon}$ – относительная ошибка среднего результата

Таблица 3 – Результаты определения правильности методики (салидрозид)

Исходное содержание салидрозид, мг/мл водно-спиртового извлечения	Добавлено салидрозид, мг/мл	Содержание салидрозид, мг/мл		Погрешность	
		Расчетное	Найденное	Абсолютная, мг/мл	Относительная, %
20,18	16,00	36,18	37,00	0,82	2,27
20,18	20,00	40,18	39,50	-0,68	-1,69
20,18	25,00	45,18	45,00	-0,18	-0,40

Таблица 4 – Результаты определения правильности методики (розавин)

Исходное содержание розавина, мг/мл водно-спиртового извлечения	Добавлено розавина, мг/мл	Содержание розавина, мг/мл		Погрешность	
		Расчетное	Найденное	Абсолютная, мг/мл	Относительная, %
2,19	1,75	3,94	4,00	0,06	1,52
2,19	2,20	4,39	4,25	-0,14	-3,19
2,19	2,60	4,79	4,61	-0,18	-3,76

Таблица 5 – Содержание розавина и салидрозид в экспериментально полученных и промышленных образцах жидких экстрактов родиолы розовой корневищ и корней

№ п/п	Наименование образца	Содержание салидрозид, %	Содержание розавина, %
1.	Экспериментальный образец № 1 (получен из сырья, заготовленного в 2016 г.)	2,13% \pm 0,05%	0,21% \pm 0,03%
2.	Экспериментальный образец № 2 (получен из сырья, заготовленного в 2018 г.)	2,71% \pm 0,12%	0,32% \pm 0,04%
3.	Промышленный образец № 1	1,62% \pm 0,05%	Не обнаруживался
4.	Промышленный образец № 2	2,75% \pm 0,08%	Не обнаруживался
5.	Промышленный образец № 3	2,55% \pm 0,07%	Не обнаруживался
6.	Промышленный образец № 4	1,20% \pm 0,04%	Не обнаруживался
7.	Промышленный образец № 5	1,12% \pm 0,06%	Не обнаруживался
8.	Промышленный образец № 6	0,96% \pm 0,04%	Не обнаруживался

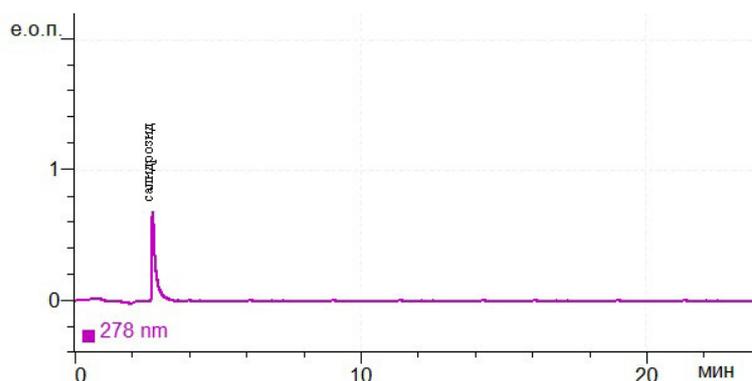


Рисунок 1 – ВЭЖХ-хроматограмма раствора стандартного образца салидрозида, 0,88 мг/мл
Примечание: детекция при длине волны 278 нм

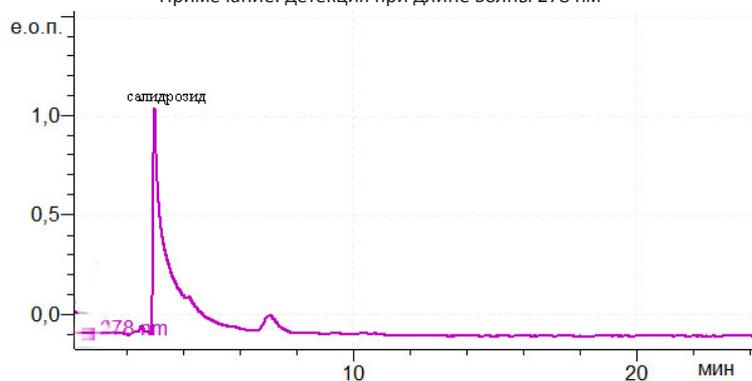


Рисунок 2 – ВЭЖХ-хроматограмма экспериментального образца экстракта жидкого из корневищ и корней родиолы розовой
Примечание: детекция при длине волны 278 нм

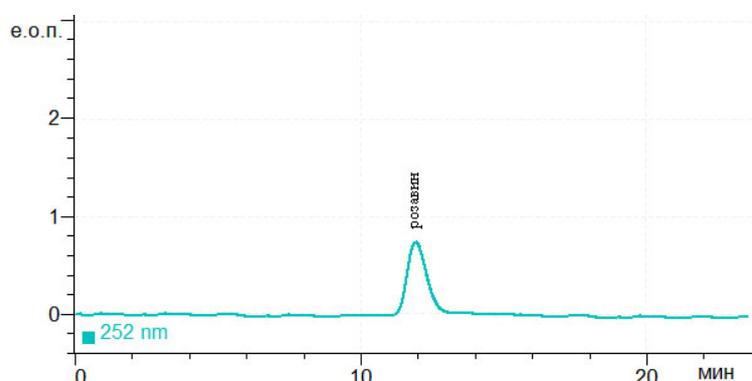


Рисунок 3 – ВЭЖХ-хроматограмма раствора стандартного образца розавина, 0,60 мг/мл
Примечание: детекция при длине волны 252 нм

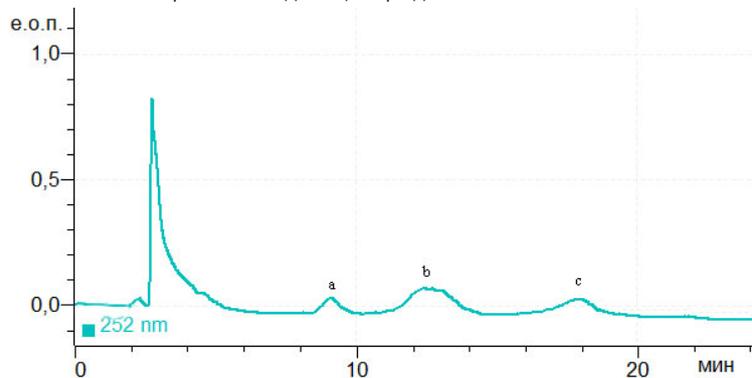


Рисунок 4 – ВЭЖХ-хроматограмма экспериментального образца экстракта жидкого из корневищ и корней родиолы розовой
Примечание: a – розарин; b – розавин; c – розин; детекция при длине волны 252 нм

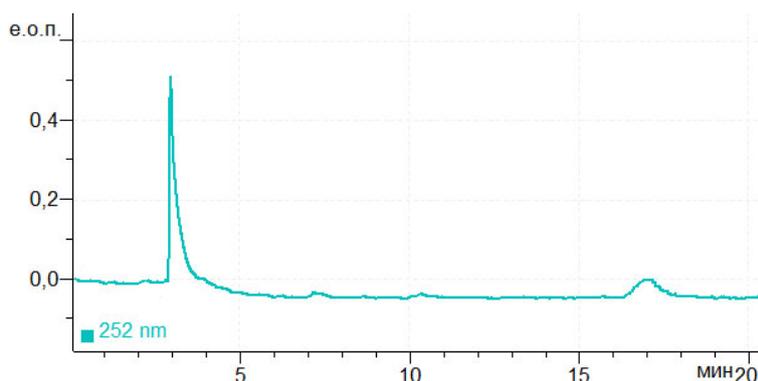


Рисунок 5 – Репрезентативная ВЭЖХ-хроматограмма промышленных образцов экстракта жидкого из корневищ и корней родиолы розовой
Примечание: детекция при длине волны 252 нм

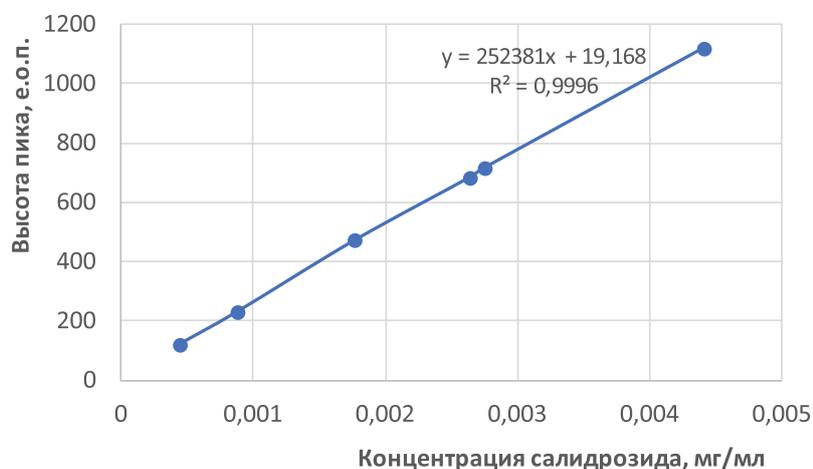


Рисунок 6 – График зависимости высоты пика от концентрации салидрозида в пробе и уравнение линейной регрессии

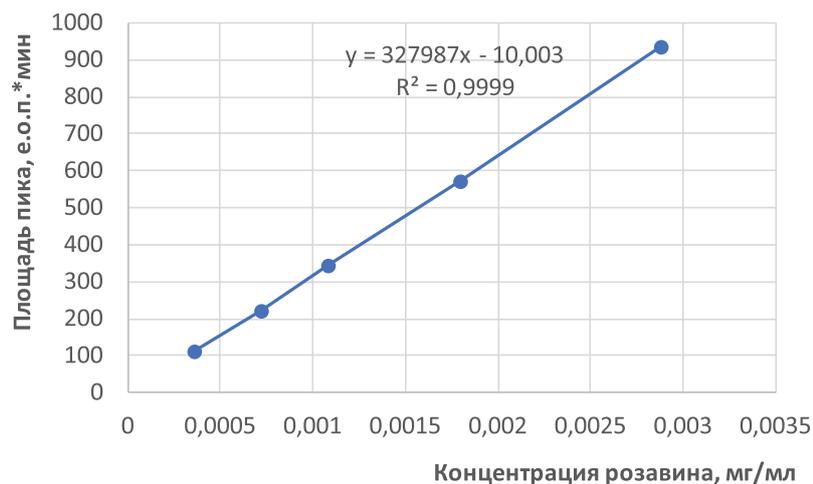


Рисунок 7 – График зависимости площади пика от концентрации розавина в пробе и уравнение линейной регрессии

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

На предварительном этапе в описанных выше условиях хроматографического разделения было проанализировано содержание розавина и салидрозида в корневищах и корнях родиолы розовой,

используемых для получения экспериментальных образцов жидкого экстракта. Определено, что содержание розавина в корневищах и корнях родиолы розовой варьировало от 1,17% ±0,04% до 1,41% ±0,06% и салидрозида – от 1,63% ±0,05% до 2,88% ±0,12%

соответственно. В образце, заготовленном в 2020 г., розавин не обнаруживался, хотя другие гликозиды коричневого спирта присутствовали, что свидетельствует о неправильных условиях хранения сырья.

В предлагаемых условиях ВЭЖХ-анализа времени удерживания пиков салидрозида на хроматограммах стандартного образца салидрозида, водно-спиртового извлечения из сырья родиолы розовой и растворов, полученных в результате разведения экспериментальных образцов экстрактов жидких родиолы розовой, составили $2,780 \pm 0,077$; $2,979 \pm 0,070$ и $(2,790 \pm 0,087$ мин соответственно (рис. 1 и 2). Для розавина соответствующие значения составили $12,424 \pm 0,080$; $12,824 \pm 0,070$ и $12,429 \pm 0,070$ мин (рис. 3 и 4). Ни в одном из 6 проанализированных промышленных образцов розавин не обнаруживался.

Зависимость высоты и площади хроматографического пика от концентрации салидрозида описывалась линейной регрессией в диапазоне концентраций от 0,1467 до 1,4667 мг/мл (рис. 6), однако коэффициент корреляции для зависимости высоты пика от концентрации салидрозида составил 0,9996, для зависимости площади пика от концентрации – 0,9888. В связи с этим расчет содержания салидрозида в испытуемых образцах проводили с использованием высоты пика.

Для зависимости высоты и площади пика от концентрации розавина в диапазоне концентраций от 0,1200 до 0,9600 мг/мл коэффициенты корреляции составили 0,9973 и 0,9999 (рис. 7). Поэтому определение содержания розавина проводили с использованием площади пика.

Указанные диапазоны концентраций салидрозида и розавина можно рассматривать как аналитические области методики.

Метрологические характеристики предлагаемой ВЭЖХ-методики свидетельствуют о том, что ошибка определения среднего результата содержания салидрозида в жидком экстракте корневищ и корней родиолы розовой с доверительной вероятностью 95% составляет $\pm 5,33\%$, розавина $\pm 4,43\%$ (таблица 2). Правильность методики определяли методом добавок путем добавления растворов салидрозида и розавина с известной концентрацией (80%, 100% и 120%) к аликвоте экспериментального препарата. При этом средний процент восстановления составил 100,06% и 98,19% соответственно (таблицы 3 и 4). Ошибки определения салидрозида и розавина в пробах с добавками стандартных образцов находились в пределах ошибки единичного определения, что свидетельствует об отсутствии систематической ошибки.

Исследование повторяемости методики указывает на сходимость полученных концентраций салидрозида и розавина: относительная ошибка среднего результата определения содержания салидрозида в корневищах и корнях родиолы розовой с доверительной вероятностью 95% составляет $\pm 5,61\%$

и $\pm 4,70\%$ соответственно, единичного определения $\pm 17,7\%$ и $\pm 14,7\%$ соответственно. При оценке внутрिलाбораторной прецизионности также показаны удовлетворительные результаты, так как относительная погрешность определения розавина и салидрозида в первый и второй дни анализа находится в диапазоне от 0,90 до 1,09.

Определено, что содержание розавина в экспериментальных образцах жидких экстрактов, полученных из корневищ и корней родиолы розовой фармакопейного качества, варьирует от $0,21\% \pm 0,03\%$ до $0,32\% \pm 0,04\%$ и салидрозида от $2,13\% \pm 0,05\%$ до $2,71\% \pm 0,12\%$ соответственно (таблица 5). В проанализированных промышленных образцах двух российских производителей содержание салидрозида варьировало от $0,96\% \pm 0,04\%$ до $2,75\% \pm 0,08\%$. Розавин ни в одном из проверенных образцов не обнаруживался.

Следовательно, отсутствие розавина в препаратах родиолы розовой, согласно полученным нами данным и другим опубликованным результатам [22–26], является распространенной проблемой. Возможными причинами является использование для получения препаратов других видов рода *Rhodiola* L. или неправильные условия заготовки, сушки и хранения лекарственного растительного сырья, а также его переработки.

Известно, что салидрозид присутствует практически во всех видах родиолы, он не подвержен ферментативному или термическому расщеплению, и его содержание в корневищах и корнях не зависит от места произрастания [27]. Розавин, в отличие от салидрозида и других фенилпропаноидов, обнаруживается только в корневищах родиолы розовой и является наиболее уязвимым её компонентов, так как подвержен избирательному ферментативному расщеплению. Сушка корневищ данного растения при температуре 50–60°C приводит к наибольшему избирательному ферментативному расщеплению розавина до агликона – коричневого спирта. В качестве оптимальных условий сушки корневищ родиолы розовой рекомендуется температурный интервал 70–80°C [1].

Выявлена вариабельность содержания розавина в зависимости от места произрастания растения. Максимальное содержание розавина и салидрозида отмечено в образцах корневищ родиолы розовой алтайского происхождения [27]. Для корневищ монгольской популяции *Rhodiola rosea* L. особенностью химического состава является высокое содержание флавоноидов (больше примерно в 200 раз по сравнению с другим образцами сырья), в особенности производных гербацептина [28].

Определено также, что розавин появляется в корневищах растения только на второй год жизни и достигает максимального значения в корневищах четырехлетних растений. Салидрозид начинает накапливаться в растениях первого года жизни, достигая

максимума, как и в случае розавина, на четвертом году жизни растения [2]. Принимая во внимание обстоятельство, что фитомасса корневищ родиолы розовой активно прирастает на 5-м и 6-м годах жизни растения на фоне сохранения высокого содержания розавина, обоснованы рекомендации по заготовке сырья именно 5–6-летних растений [2].

Следовательно, наличие розавина является надежным показателем доброкачественности сырья и препаратов родиолы розовой.

С учетом полученных данных можно рекомендовать нижний предел содержания розавина в жидких экстрактах родиолы розовой – 0,1%, салидрозида – 0,8%.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, в статье предложена ВЭЖХ-методика одновременного определения содержания двух наиболее значимых биологически активных соединений корневищ и корней родиолы розовой в

полученных на их основе лекарственных препаратах в условиях изократического режима элюирования. Ошибка определения среднего результата содержания розавина и салидрозида в сырье родиолы не превышала 6,0%.

Рассмотрены методологические подходы к разработке методик фармакопейного анализа препаратов родиолы розовой. Качество лекарственных препаратов из корневищ и корней родиолы розовой напрямую связано с качеством лекарственного растительного сырья, при этом наиболее уязвимым биологически активным компонентом, который в наибольшей степени подвержен ферментативному расщеплению при нарушении условий сушки, хранения сырья и его переработки, является розавин. В связи с этим именно этот фенилпропаноид является тем маркером качества сырья и препаратов родиолы розовой, на который в первую очередь следует обращать внимание.

ФИНАНСОВАЯ ПОДДЕРЖКА

Исследование было выполнено в рамках проекта «Разработка национальных подходов к стандартизации лекарственных растительных препаратов, лекарственного растительного сырья и фитобиотехнологических продуктов» при финансовой государственной поддержке в виде Стипендии Президента РФ для молодых ученых и аспирантов, осуществляющих перспективные научные исследования и разработки по приоритетным направлениям модернизации российской экономики».

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

АВТОРСКИЙ ВКЛАД

В.А. Куркин – концепция и дизайн исследования, редактирование; Т.К. Рязанова – сбор и обработка материала, написание текста и составление списка литературы, статистическая обработка данных

БИБЛИОГРАФИЧЕСКИЙ СПИСОК

1. Куркин В.А., Запесочная Г.Г., Кирьянов А.А. и др. О качестве сырья родиолы розовой // Химико-фармацевтический журнал. – 1989. – Т. 23, №11. – С. 1364–1367.
2. Кирьянов А.А., Бондаренко Л.Т., Куркин В.А., Запесочная Г.Г. Динамика накопления розавидина и салидрозида в корневищах родиолы розовой // Химико-фармацевтический журнал. – 1989. – Т. 23, №4. – С. 449–452.
3. Marchev A.S., Dinkova-Kostova A.T., György Z., Mirmazloum I. *Rhodiola rosea* L.: from golden root to green cell factories // Phytochem. Rev. – 2016. – Vol. 15, No.4. – P. 515–536. DOI: 10.1007/S11101-016-9453-5.
4. Ma G.P., Zheng Q., Xu M.B., Zhou X.L., Lu L., Li Z.X., Zheng G.Q. *Rhodiola rosea* L. Improves Learning and Memory Function: Preclinical Evidence and Possible Mechanisms // Front. Pharmacol. – 2018. – Vol. 4, No.9. – P. 1415. DOI: 10.3389/fphar.2018.01415.
5. Jawaid T., Tewari N., Verma L. Adaptogenic agents: a review // International Journal of Biomedical Research. – 2011. – Vol. 2, No.5. – P. 285–304. DOI: 10.7439/ijbr.v2i5.104.
6. Tao H., Wu X., Cao J., Peng Y., Wang A., Pei J., Xiao J., Wang S., Wang Y. *Rhodiola* species: A comprehensive review of traditional use, phytochemistry, pharmacology, toxicity, and clinical study // Med. Res. Rev. – 2019. – Vol. 39, No.5. – P. 1779–1850. DOI: 10.1002/med.21564.
7. Li Y., Pham V., Bui M., Song L., Wu C., Walia A., Uchio E., Smith-Liu F., Zi X. *Rhodiola rosea* L.: an herb with anticancer, anti-aging, and immunostimulating properties for cancer chemoprevention // Curr. Pharmacol. Rep. – 2017. – Vol. 3, No.6. – P. 384–395. DOI:10.1007/s40495-017-0106-1.
8. Pu W.L., Zhang M.Y., Bai R.Y., Sun L.K., Li W.H., Yu Y.L., Zhang Y., Song L., Wang Z.X., Peng Y.F., Shi H., Zhou K., Li T.X. Anti-inflammatory effects of *Rhodiola rosea* L.: A review // Biomed. Pharmacother. – 2020. – Vol. 121. – 109552. DOI: 10.1016/j.biopha.2019.109552.
9. Recio M.C., Giner R.M., Mániz S. Immunomodulatory and antiproliferative properties of *Rhodiola* species // Planta Medica. – 2016. – Vol. 82, No.11–12. – P. 952–960. DOI: 10.1055/s-0042-107254.
10. Nabavi S.F., Braidly N., Orhan I.E., Badiee A., Daglia M., Nabavi S.M. *Rhodiola rosea* L. and Alzheimer's Disease: From Farm to Pharmacy // Phytother. Res. – 2016. – Vol. 30, No.4. – P. 532–539. DOI: 10.1002/ptr.5569.
11. Khanna K., Mishra K.P., Ganju L., Singh S.B. Golden root: A wholesome treat of immunity // Biomed. Pharmacother. – 2017. – Vol. 87. – P. 496–502. DOI: 10.1016/j.biopha.2016.12.132.
12. Kurkin V.A., Dubishchev A.V., Ezhkov V.N., Titova I.N., Avdeeva E.V. Antidepressant activity of some phytopharmaceuticals and phenylpropanoids //

- Pharmaceutical Chemistry Journal. – 2006. – Vol. 42, No.10. – P. 614–619. DOI: 10.1007/s11094-006-0205-5.
13. Khanum F., Bawa A.S., Singh B. *Rhodiola rosea*: A Versatile Adaptogen // Compr. Rev. Food Sci. Food Saf. – 2005. – Vol. 4, No.3. – P. 55–62. DOI: 10.1111/j.1541-4337.2005.tb00073.x.
 14. Куркин В.А., Петрухина И.К., Акушская А.С. Исследование номенклатуры адаптогенных лекарственных препаратов, представленных на фармацевтическом рынке Российской Федерации // Фундаментальные исследования. – 2014. – № 8–4. – С. 898–902.
 15. Li Q., Wang J., Li Y., Xu X. Neuroprotective effects of salidroside administration in a mouse model of Alzheimer's disease // Mol. Med. Rep. – 2018. – Vol. 17, No.5. – P. 7287–7292. DOI: 10.3892/mmr.2018.8757.
 16. Perfumi M., Mattioli L. Adaptogenic and central nervous system effects of single doses of 3% rosavin and 1% salidroside *Rhodiola rosea* L. extract in mice // Phytother. Res. – 2007. – Vol. 21, No.1. – P. 37–43. DOI: 10.1002/ptr.2013.
 17. Tolonen A., Pakonen M., Hohtola A., Jalonen J. Phenylpropanoid glycosides from *Rhodiola rosea* // J. Jalonen, Chem. Pharm. Bull. (Tokyo). – 2003. – Vol. 51, No.4. – P. 467–470. DOI: 10.1248/cpb.51.467.
 18. Kurkin V.A., Phenylpropanoids from Medicinal Plants: Distribution, Classification, Structural Analysis, and Biological Activity // Chemistry of Natural Compounds. – 2003. – Vol. 39, No.2. – P. 123–153. DOI: 10.1023/A:1024876810579.
 19. Kurkin V.A., Dubishchev A.V., Titova I.N., Avdeeva E.V., Braslavsky V.B., Kurkina A.V., Ezhkov V.N. Phenylpropanoids of medicinal plants are perspective sources of neurotropic phytopreparations // XXIII International Conference on Polyphenols, Canada. – 2006. – P. 53–54.
 20. Kurkin V.A. Phenylpropanoids as the biologically active compounds of the medicinal plants and phytopharmaceuticals // Advances in Biological Chemistry. – 2013. – Vol. 3, No.1. – P. 26–28. DOI: 10.4236/abc.2013.31004.
 21. Государственная фармакопея Российской Федерации. XIV изд., в 4-х томах. Министерство здравоохранения Российской Федерации, 2018. [Электронный ресурс]. URL: <http://www.femb.ru/femb/pharmacopea.php>.
 22. Wang Z., Hu H., Chen F., Zou L., Yang M., Wang A., Foulsham J.E., Lan K. Metabolic profiling assisted quality assessment of *Rhodiola rosea* extracts by high-performance liquid chromatography // Planta Medica. – 2012. – Vol. 78, No.7. – P. 740–746. DOI: 10.1055/s-0031-1298373.
 23. Booker A., Jalil B., Frommenwiler D., Reich E., Zhai L., Kulic Z., Heinrich M. The authenticity and quality of *Rhodiola rosea* products // Phytomedicine. – 2016. – Vol. 23, No.7. – P. 754–762. DOI: 10.1016/j.phymed.2015.10.006.
 24. Khokhlova K., Zdoryk O. Authentication of *Rhodiola rosea*, *Rhodiola quadrifida* and *Rhodiola rosea* liquid extract from the Ukrainian market using HPTLC chromatographic profiles // Nat. Prod. Res. – 2020. – Vol. 34, No.19. – P. 2842–2846. DOI: 10.1080/14786419.2019.1591398.
 25. Kucinskaite A., Poblacka-Olech L., Krauze-Baranowska M., Sznitowska M., Savickas A., Briedis V. Evaluation of biologically active compounds in roots and rhizomes of *Rhodiola rosea* L. cultivated in Lithuania // Medicina (Kaunas). – 2007. – Vol. 43, No.6. – P. 487–494.
 26. Ganzera M., Yayla Y., Khan I.A. Analysis of the marker compounds of *Rhodiola rosea* L. (golden root) by reversed phase high performance liquid chromatography // Chem. Pharm. Bull. (Tokyo). – 2001. – Vol. 49, No.4. – P. 465–467. DOI: 10.1248/cpb.49.465.
 27. Куркин В.А., Запесочная Г.Г., Горбунов Ю.Н., Нухимовский Е.Л., Шретер А.И. Химическое исследование некоторых видов рода *Rhodiola* L. и *Sedum* L. и вопросы их хемосистематики // Растительные ресурсы. – 1986. – Т. 22, №3. – С. 310–319.
 28. Куркин В.А., Запесочная Г.Г., Нухимовский Е.Л., Климахин Г.И. Химический состав корневищ монгольской популяции *Rhodiola rosea* L., интродуцированной в Подмоскowie // Химико-фармацевтический журнал. – 1988. – Т. 22, №3. – С. 324–326.

АВТОРЫ

Владимир Александрович Куркин – доктор фармацевтических наук, профессор, заведующий кафедрой фармакогнозии с ботаникой и основами фитотерапии ФГБОУ ВО «Самарский государственный медицинский университет» Минздрава России. ORCID ID: 0000-0002-7513-9352. E-mail: v.a.kurkin@samsmu.ru

Рязанова Татьяна Константиновна – кандидат фармацевтических наук, доцент кафедры управления и экономики фармации ФГБОУ ВО «Самарский государственный медицинский университет» Минздрава России. ORCID ID: 0000-0002-4581-8610. E-mail: t.k.ryazanova@samsmu.ru