

В. А. Куркин*, Т. К. Рязанова

АКТУАЛЬНЫЕ АСПЕКТЫ СТАНДАРТИЗАЦИИ КОРНЕВИЩ И КОРНЕЙ РОДИОЛЫ РОЗОВОЙ

Самарский государственный медицинский университет, Россия, 443099, Самара, ул. Чапаевская, 89.
* e-mail: v.a.kurkin@samsmu.ru

В работе обосновываются методологические подходы к анализу биологически активных соединений в корневищах и корнях родиолы розовой (*Rhodiola rosea* L.). С использованием метода ВЭЖХ разработана методика количественного определения розавина и салидрозид, являющихся доминирующими и диагностически значимыми биологически активными соединениями сырья данного растения. Определено, что содержание розавина в корневищах и корнях родиолы розовой варьирует от $(1,17 \pm 0,04) \%$ до $(1,41 \pm 0,06) \%$ и салидрозид — от $(1,63 \pm 0,05) \%$ до $(2,88 \pm 0,12) \%$ соответственно. Результаты статистической обработки свидетельствуют о том, что относительная ошибка среднего результата определения розавина и салидрозид с доверительной вероятностью 95 % не превышает $\pm 5,0 \%$.

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

Родиола розовая (*Rhodiola rosea* L.) широко используется в официальной медицине в качестве источника лекарственных препаратов с адаптогенной активностью, лекарственным растительным сырьем являются корневища с корнями [1 – 5]. Повышенный интерес к родиоле розовой обусловлен еще и тем обстоятельством, что в последнее время в ней выявлен целый ряд новых фармакологических свойств, а именно: антиоксидантная, анксиолитическая, ноотропная, антидепрессантная, иммуномодулирующая, противоопухолевая активность [1, 6 – 10]. Однако ассортимент лекарственных препаратов на основе корневищ родиолы розовой, разрешенных к применению в Российской Федерации, незначителен и представлен лишь экстрактом родиолы жидким разных производителей [11]. Экстракт родиолы жидкий разрешен к применению с 1975 г. и рекомендуется в качестве адаптогенного и тонизирующего средства, не уступающего по своей активности препаратам женьшеня [1, 12].

Основными биологически активными соединениями, обуславливающими адаптогенную активность сырья и препаратов родиолы розовой, являются фенилпропаноиды (розавин, розин, розарин) и фенолоспирты (тирозол, салидрозид) [1, 13 – 19]. В действующей фармакопейной статье “Родиолы розовой корневища и корни” (ФС.2.5.0036.15) предусмотрено определение содержания салидрозид и суммы гликозидов коричневого спирта в пересчете на розавин [20]. В то же время розавин является наиболее уязвимым соединением, по сравнению с другими гликозидами он более чувствителен к условиям получения и хранения сырья. Это связано с активностью фермента, способствующего отщеплению вицианозы — углеводного фрагмента молекулы розавина [1]. Вицианозидаза проявляет максимальную активность в температурном интервале 40 – 60 °С, который ранее рекомендовался для сушки сырья родиолы розовой. Хранение недосушенных

корневищ, экстракция свежего сырья этанолом при комнатной температуре также способствует разрушающему действию ферментов на биологически активные компоненты. Разрушение розавина приводит к образованию биологически неактивного коричневого спирта, соответственно снижается фармакологическая активность сырья родиолы розовой и препаратов на его основе [1].

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 уязвимо-го компонента — розавина. Уровень его содержания отражает правильность условий хранения и сушки корневищ и корней родиолы розовой и является гарантией присутствия других фенилпропаноидов, которые более устойчивы по сравнению с розавином [21].

Эти предположения подтверждаются результатами контроля качества сырья и препаратов (экстракты, гранулированные порошки) родиолы розовой [21 – 25]. А. Booker и соавт. в результате анализа 40 коммерческих продуктов родиолы розовой от разных поставщиков, представленных на рынке Европейского союза, выявили, что примерно одна пятая часть этих продуктов не содержит розавин (рис. 1, 1), один из основных компонентов родиолы розовой. Более того, некоторые продукты не содержали салидрозид (рис. 1, 2) — компонент, характерный для представителей рода Родиола (*Rhodiola* L.). Содержание розавина примерно в 80 % остальных коммерческих продуктов было ниже заявленного, и предполагается, что они получены из других видов рода родиола [22].

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

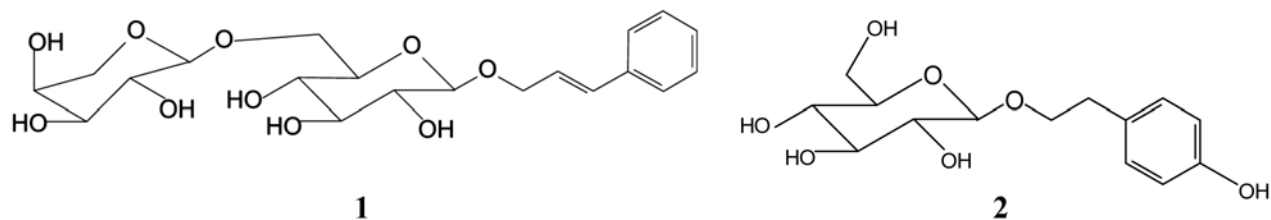


Рис. 1. Структурные формулы розавина (1) и салидрозида (2).

Следует также отметить, что включенная в ФС.2.5.0036.15 методика предусматривает проведение анализа методом высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) в градиентном режиме элюирования [20]. На наш взгляд, подбор условий для проведения анализа в изократическом режиме позволит повысить воспроизводимость методики [26]. Кроме того, используемая в фармакопейной методике для детекции салидрозида длина волны 219 нм менее специфична по отношению к сопутствующим компонентам по сравнению с другим максимумом поглощения этого соединения — 278 нм.

В связи с вышеперечисленной целью исследования являлось совершенствование существующих подходов к стандартизации корневищ и корней родиолы розовой, принятых в Государственной фармакопее Российской Федерации XIV издания.

Экспериментальная часть

В качестве объекта исследования использовали образцы корневищ и корней родиолы розовой, заготовленные в 2016 – 2018 гг. (Алтайский край).

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.

Из корневищ с корнями родиолы розовой с использованием жидкостной колоночной хроматографии на силикагеле и последующей перекристаллизации из 95 % этилового спирта получен образец розавина, соответствующий требованиям к государственным стандартным образцам розавина (ФС 42-0071-01). В результате колоночной хроматографии на силикагеле, рехроматографии на полиамиде и перекристаллизации из смеси хлороформа и 95 % этилового спирта получен стандартный образец салидрозида, имеющий, по данным ТСХ, УФ-, ЯМР-спектроскопии и т. пл. (162 – 164 °С), степень чистоты не менее 98,0 %.

Приготовление рабочих растворов

Получение водно-спиртового извлечения из корневищ с корнями родиолы розовой. Аналитическую пробу сырья измельчали до размера частиц, проходящих сквозь сито с отверстиями диаметром 1 мм. Около 1 г

измельченного сырья (точная навеска) помещали в колбу со шлифом вместимостью 100 мл, прибавляли 30 мл 70 % этанола. Колбу закрывали пробкой и взвешивали с точностью до $\pm 0,01$ г. Колбу присоединяли к обратному холодильнику и нагревали на кипящей водяной бане (умеренное кипение) в течение 60 мин. Затем колбу охлаждали в течение 30 мин, закрывали той же пробкой, снова взвешивали и восполняли недостающий экстрагент до первоначальной массы. Извлечение фильтровали через бумажный фильтр (синяя полоса) и затем дополнительно фильтровали через мембранный фильтр Milipore (0,45 мкм) (испытуемый раствор).

Приготовление стандартного раствора салидрозида. Около 0,025 г (точная навеска) государственного стандартного образца салидрозида (содержание основного вещества ≥ 98 %) помещают в мерную колбу вместимостью 50 мл, растворяют в небольшом количестве 95 % этилового спирта, доводят 95 % этиловым спиртом до метки, перемешивают.

Приготовление стандартного раствора розавина. Около 0,025 г (точная навеска) государственного стандартного образца розавина (содержание основного вещества ≥ 98 %) помещают в мерную колбу вместимостью 50 мл, растворяют в небольшом количестве 95 % этилового спирта при нагревании на кипящей водяной бане, доводят 95 % этиловым спиртом до метки, перемешивают.

Условия хроматографического разделения. ВЭЖХ-анализ осуществляли с использованием хроматографа “Милихром-6” (НПАО “Научприбор”) в следующих условиях обращенно-фазовой хроматографии в изократическом режиме: стальная колонка КАХ-6-80-4 (2 × 80 мм; Сепарон-С18 7 мкм), подвижная фаза — ацетонитрил : 1 % раствор уксусной кислоты в объемном соотношении 14:86, скорость элюирования — 100 мкл/мин, объем элюента — 2500 мкл. Детекцию веществ осуществляли при длине волны 252 нм (розавин) и 278 нм (салидрозид). Объемы инжектируемых проб — 3 мкл (стандартные и испытуемый раствор).

Оценка пригодности системы. С целью проверки пригодности хроматографической системы проводили 5-кратное хроматографирование 3 мкл раствора извлечения из корневищ с корнями родиолы розовой. В дальнейшем рассчитывали следующие показатели: эффективность колонки, разрешение между пиками, фактор асимметрии. В результате расчетов получены следующие результаты (табл. 1).

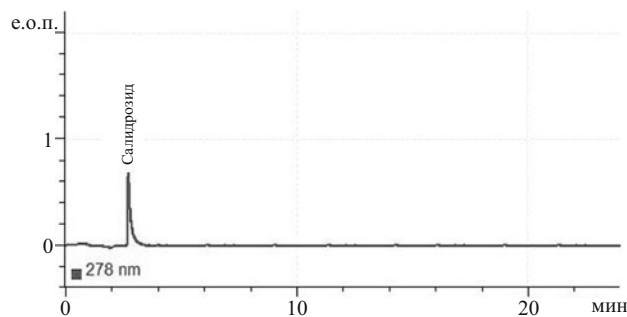


Рис. 2. Хроматограмма ВЭЖ раствора стандартного образца салидрозид, 0,88 мг/мл (детекция при длине волны 278 нм).

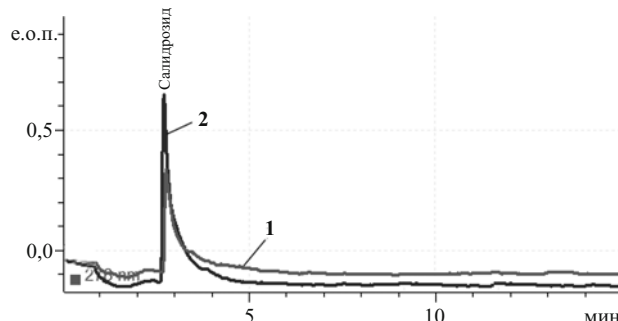


Рис. 3. Хроматограмма ВЭЖ исходного водно-спиртового извлечения из корневищ и корней родиолы розовой (1) и после добавления раствора стандартного образца салидрозид (2) (детекция при длине волны 278 нм).

Данные, приведенные в табл. 1, подтверждают пригодность хроматографической системы для количественного определения салидрозид и розавина в корневищах с корнями родиолы розовой.

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 испытуемого раствора, а также по разрешению между наиболее близкими пиками и фактору асимметрии пиков салидрозид и розавина.

Определение линейности проводили на 5 уровнях концентраций растворов стандартных образцов (с кон-

центрациями 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 водно-спиртового извлечения из корневищ с корнями родиолы розовой навески стандартных образцов розавина и салидрозид в количестве от 80 до 120 % от исходного содержания.

Результаты и их обсуждение

В описанных выше условиях ВЭЖХ-анализа время удерживания пиков салидрозид на хроматограммах стандартного образца салидрозид и водно-спиртового извлечения из корневищ с корнями родиолы розовой составило ($2,780 \pm 0,077$) и ($2,979 \pm 0,070$) мин соответственно (рис. 2 и 3). Для розавина соответствующие значения составили ($12,424 \pm 0,080$) и ($12,824 \pm 0,070$) мин (рис. 4 и 5).

Зависимость высоты и площади хроматографического пика от концентрации салидрозид 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 салидрозид составил 0,9996, для зависимости площади пика от концентрации — 0,9888. В связи с

Таблица 1
Определение пригодности хроматографической колонки

Параметр хроматографической колонки	Значение	Нормативный показатель
Эффективность колонки (салидрозид)	5025	Не менее 5000 теоретических тарелок
Эффективность колонки (розавин)	5158	
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 корневищах и корнях родиолы розовой

Анализируемое вещество	f	\bar{X} , %	S	P , %	$t(P, f)$	$\Delta\bar{X}$	\bar{e} , %
Салидрозид	10	2,88	0,202953	95	2,23	$\pm 0,13$	$\pm 4,72$
Розавин	10	1,41	0,092281	95	2,23	$\pm 0,06$	$\pm 4,41$

Примечания: 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{e} — относительная ошибка среднего результата.

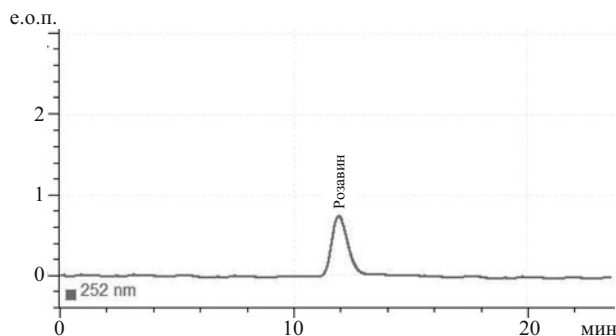


Рис. 4. Хроматограмма ВЭЖ раствора стандартного образца розавина, 0,60 мг/мл (детекция при длине волны 252 нм).

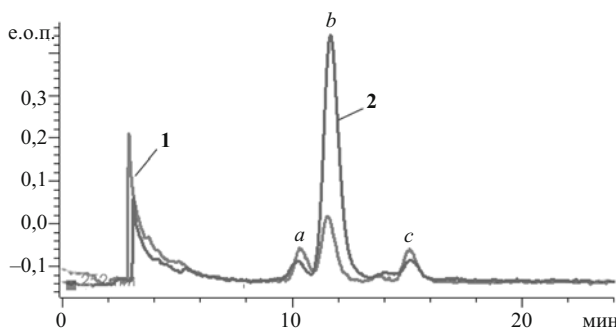


Рис. 5. Хроматограмма ВЭЖ исходного водно-спиртового извлечения из корневищ и корней родиолы розовой (1) и после добавления раствора стандартного образца розавина (2) (детекция при длине волны 252 нм). Обозначения: *a* — розарин; *b* — розавин; *c* — розин.

этим расчет содержания салидрозид 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.

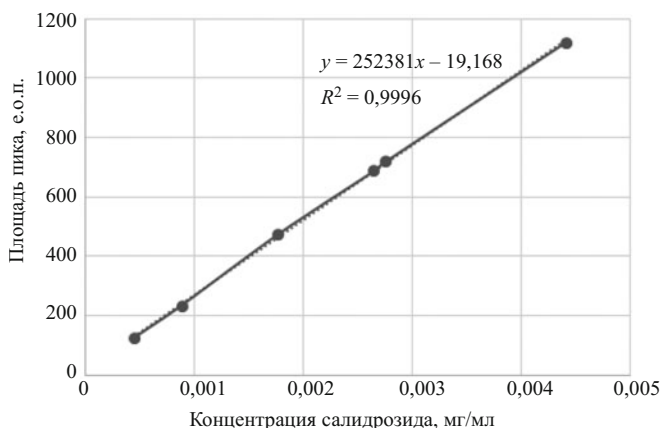


Рис. 6. График зависимости высоты пика от концентрации салидрозид в пробе и уравнение линейной регрессии.

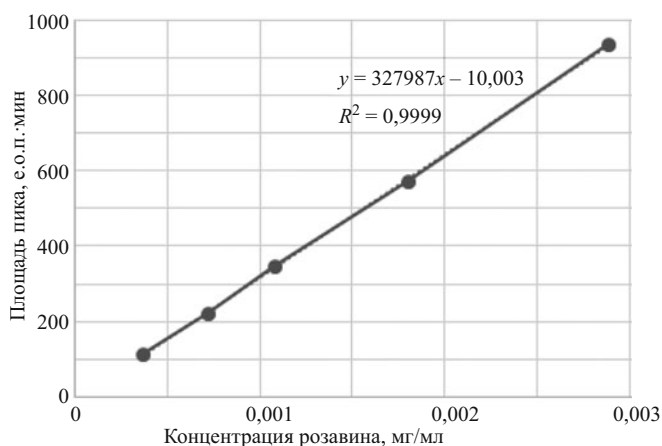


Рис. 7. График зависимости площади пика от концентрации розавина в пробе и уравнение линейной регрессии.

Указанные диапазоны концентраций салидрозид и розавина можно рассматривать как аналитические области методик.

Метрологические характеристики предлагаемой ВЭЖХ-методики свидетельствуют о том, что ошибка определения среднего результата содержания салидрозид в корневищах и корнях родиолы розовой с доверительной вероятностью 95 % составляет $\pm 4,72$ %, розавина — $\pm 4,41$ % (табл. 2). Правильность методики определяли методом добавок путем добавления растворов салидрозид и розавина с известной концентрацией (80, 100 и 120 %) к испытуемому раствору. При этом средний процент восстановления составил 99,1 и 100,4 % соответственно (табл. 3 и 4). Ошибки определения салидрозид 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 салидрозид и розавина: относительная ошибка среднего результата определения содержания салидрозид в корневищах и корнях родиолы розовой с доверительной вероятностью 95 % составляет $\pm 4,72$ и $\pm 4,41$ % соответственно, единичного определения — $\pm 15,7$ и $\pm 14,6$ % соответственно. При оценке внутрिलाбораторной прецизионности также показаны удовлетворительные результаты, так как относительная погрешность опреде-

Таблица 3
Результаты определения правильности методики (салидрозид)

Исходное содержание салидрозид, мг/мл водно-спиртового извлечения	Добавлено салидрозид, мг/мл	Содержание салидрозид, мг/мл		Ошибка	
		расчетное	найденное	абсолютная, мг/мл	относительная, %
1,10	0,88	1,98	1,95	-0,03	-1,52
1,10	1,10	2,20	2,10	-0,10	-4,55
1,10	1,32	2,42	2,50	+0,08	+3,31

Таблица 4
Результаты определения правильности методики (розавин)

Исходное содержание розавина, мг/мл водно-спиртового извлечения	Добавлено розавина, мг/мл	Содержание розавина, мг/мл		Ошибка	
		расчетное	найденное	абсолютная, мг/мл	относительная, %
0,50	0,40	0,90	0,85	-0,05	-5,56
0,50	0,50	1,00	1,05	+0,05	+5,00
0,50	0,60	1,10	1,12	+0,02	+1,82

ления розавина и салидрозид в первый и второй дни анализа находится в диапазоне от 0,91 до 1,1.

Определено, что содержание розавина в корневищах и корнях родиолы розовой варьирует от $(1,17 \pm 0,04) \%$ до $(1,4 \pm 0,06) \%$ и салидрозид — от $(1,63 \pm 0,05) \%$ до $(2,88 \pm 0,12) \%$ соответственно.

Таким образом, в статье рассмотрены методологические подходы к разработке методик фармакопейного анализа сырья и препаратов родиолы розовой. На наш взгляд, более целесообразным является расчет содержания именно розавина, а не суммы гликозидов коричневого спирта в пересчете на розавин, который в наибольшей степени подвержен ферментативному расщеплению при нарушении условий сушки, хранения сырья и его переработки. Предложена методика одновременного определения содержания 2 наиболее значимых биологически активных соединений корневищ и корней родиолы розовой — розавина и салидрозид — с помощью метода ВЭЖХ в условиях изократического режима элюирования. Ошибка определения среднего результата содержания розавина и салидрозид в сырье родиолы розовой не превышала 5,0 %.

ЛИТЕРАТУРА

1. В. А. Куркин, *Родиола розовая (золотой корень): стандартизация и создание лекарственных препаратов*: монография, 2-е изд., перераб. и доп., ООО “Офорт”; ФГБОУ ВО СамГМУ Минздрава России, Самара (2020).
2. А. А. Кирьянов, Л. Т. Бондаренко, В. А. Куркин, Г. Г. Запесочная, *Хим.-фарм. журн.*, **20**(4), 451 – 455 (1986).
3. А. А. Кирьянов, Л. Т. Бондаренко, В. А. Куркин, Г. Г. Запесочная, *Хим.-фарм. журн.*, **23**(4), 449 – 452 (1989).

4. T. Jawaid, N. Tewari, L. Verma, *Int. J. Biomed. Res.*, **2**(5), 285 – 304 (2011).
5. H. Tao, X. Wu, J. Cao, et al., *Med. Res. Rev.*, **39**(5), 1779 – 1850 (2019).
6. M. C. Recio, R. M. Giner, S. Máñez, *Planta Medica*, **82**(11 – 12), 952 – 960 (2016).
7. S. F. Nabavi, N. Braidly, I. E. Orhan, et al., *Phytother. Res.*, **30**(4), 532 – 539 (2016).
8. K. Khanna, K. P. Mishra, L. Ganju, S. B. Biomed, *Pharmacother.*, **87**, 496 – 502 (2017).
9. В. А. Куркин, А. В. Дубищев, В. Н. Ежков и др., *Хим.-фарм. журн.*, **40**(11), 33 – 38 (2006); *Pharm. Chem. J.*, **40**(11), 614 – 619 (2006).
10. F. Khanum, A. S. Bawa, B. Singh, *Compr. Rev. Food Sci. Food Saf.*, **4**(3), 55 – 62 (2005).
11. Государственный реестр лекарственных средств [Электронный ресурс]. Электрон.дан. 2021. Режим доступа: <http://grls.rosminzdrav.ru/grls.aspx>.
12. В. А. Куркин, И. К. Петрухина, А. С. Акушская, *Фундаментальные исследования*, (8 – 4), 898 – 902 (2014).
13. A. Palmeri, L. Mamma, M. R. Tropea, et al., *J. Alzheimers Dis.*, **52**(1), 65 – 75 (2016).
14. M. Perfumi, L. Mattioli, *Phytother. Res.*, **21**(1), 37 – 43 (2007).
15. A. Tolonen, M. Pakonen, A. Hohtola, J. Jalonen, *Chem. Pharm. Bul. (Tokyo)*, **51**(4), 467 – 470 (2003).
16. V. A. Kurkin, *Chem. Nat. Compnds*, **39**(2), 123 – 153 (2003).
17. V. A. Kurkin, A. V. Dubishchev, I. N. Titova, et al., *XXIII Int. Conf. on Polyphenols*, Canada (2006), pp. 53 – 54.
18. V. A. Kurkin, *Adv. Biol. Chem.*, **3**, 26 – 28 (2013).
19. A. A. Kir'yanov, L. T. Bondarenko, V. A. Kurkin, et al., *Chem. Nat. Compnds*, **27**(3), 276 – 279 (1991).
20. ФС. 2.5.0036.15 “Родиолы розовой корневища и корни”, *Государственная фармакопея Российской Федерации*. XIV изд., Министерство здравоохранения Российской Федерации (2018). URL: <http://www.femb.ru/femb/pharmacopea.php>.
21. Z. Wang, H. Hu, F. Chen, et al., *Planta Medica*, **78**(7), 740 – 746 (2012).
22. A. Booker, B. Jalil, D. Frommenwiler, et al., *Phytomedicine*, **23**(7), 754 – 762 (2016).
23. K. Khokhlova, O. Zdoryk, *Nat. Prod. Res.*, **34**(19), 2842 – 2846 (2020).
24. A. Kucinskaite, L. Poblöcka-Olech, M. Krauze-Baranowska, et al., *Medicina (Kaunas)*, **43**(6), 487 – 494 (2007).
25. M. Ganzera, Y. Yayla, I. A. Khan, *Chem. Pharm. Bull. (Tokyo)*, **49**(4), 465 – 467 (2001).
26. ОФС. 1.2.1.2.0001.15 *Хроматография, Государственная фармакопея Российской Федерации*. XIV изд., Министерство здравоохранения Российской Федерации (2018). URL: <http://www.femb.ru/femb/pharmacopea.php>.

Поступила 28.04.21

CURRENT ASPECTS OF STANDARDIZATION OF *Rhodiola rosea* L. RHIZOMES AND ROOTS

V. A. Kurkin^{1*} and T. K. Ryazanova¹

¹ Samara State Medical University, Samara, 443099 Russia

* e-mail: v.a.kurkin@samsmu.ru

This work substantiates methodological approaches to the analysis of biologically active compounds contained in the rhizomes and roots of *Rhodiola rosea* L. Based on HPLC, a new method was developed for the quantitative determination of rosavin and salidroside, which are predominant and diagnostically significant biologically active compounds of the raw materials of this plant. It is established that the content of rosavin in rhizomes and roots of *Rhodiola rosea* varies from $1.17 \pm 0.04\%$ to $1.41 \pm 0.06\%$ and the content of salidroside varies from $1.63 \pm 0.05\%$ to $2.88 \pm 0.12\%$, respectively. The results of statistical processing indicate that the relative error of the mean content of rosavin and salidroside assays on a confidence level of 95% does not exceed 5.0 %.

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