



Оригинальная статья/Research article

## Разработка методики количественного определения диосгенина из семян пажитника сенного, *Trigonella foenum-graecum* L.

А. Е. Суханов<sup>1\*</sup>, А. Н. Ставрианиди<sup>2</sup>, Е. Д. Кубасова<sup>1</sup>, А. С. Панасюк<sup>1</sup>, О. В. Буюклинская<sup>1</sup>

1 – ФГБОУ ВО «Северный государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации (ФГБОУ ВО СГМУ Минздрава России), фармацевтический факультет, кафедра фармации и фармакологии, 163001, Россия, г. Архангельск, пр. Троицкий, д. 51  
2 – ФГБОУ ВО «Московский государственный университет имени М. В. Ломоносова» (МГУ имени М. В. Ломоносова), химический факультет, кафедра аналитической химии, 119991, Россия, г. Москва, ГСП-1, Ленинские горы, д. 1, стр. 3

\*Контактное лицо: Суханов Антон Евгеньевич. E-mail: docpharmanton@hotmail.com

ORCID: А. Е. Суханов – <https://orcid.org/0000-0002-6214-307X>; А. Н. Ставрианиди – <https://orcid.org/0000-0003-2848-6535>; Е. Д. Кубасова – <https://orcid.org/0000-0001-9683-7814>; А. С. Панасюк – <https://orcid.org/0000-0003-4176-945X>; О. В. Буюклинская – <https://orcid.org/0000-0002-4453-1079>.

Статья поступила: 25.03.2020. Статья принята в печать: 23.07.2020. Статья опубликована: 28.08.2020

### Резюме

**Введение.** Современные фармакогностические исследования направлены на поиск растительных биологически активных индивидуальных соединений (далее – РБАИС), выделяемых из растительных экстрактов.

**Цель.** Изучение содержания стероидного сапогенина диосгенина в семенах пажитника сенного в растительных экстрактах методом ВЭЖХ-УФ.

**Материалы и методы.** Объектом изучения являлось сырьё – семена пажитника сенного, производимых в качестве лекарственного растительного сырья ООО «Шалфей» (г. Иркутск). Проведены серии экстракции и хроматографического разделения методом ВЭЖХ-УФ.

**Результаты и обсуждение.** В данной работе была успешно оптимизирована методика экстракции диосгенина (после кислотного гидролиза диосцина 5 % водным раствором кислоты хлористоводородной при нагревании в течение не менее 4 часов на песчаной бане при мощности последней в 150 Вт) из сырья семян пажитника сенного с использованием 50 % водного раствора изопропанола, х.ч. Была предложена упрощённая методика хроматографического разделения диосгенина из экстрактов семян пажитника сенного с использованием изократического режима элюирования 99,9 % ацетонитрилом, х.ч.

**Заключение.** Среднее содержание диосгенина (после кислотного гидролиза диосцина) в семенах пажитника сенного с учётом влажности сырья составляет ( $M \pm \sigma$ )  $5,3 \pm 0,05$  мг/г (95 % ДИ:  $5,1-5,4$  мг/г;  $n = 6$ ).

**Ключевые слова:** семена пажитника сенного, диосгенин, экстракция, ВЭЖХ-УФ.

**Конфликт интересов:** конфликта интересов нет.

**Вклад авторов.** А. Е. Суханов и А. Н. Ставрианиди разработали и оптимизировали методику экстракции диосгенина из растительного сырья, а также разработали методику количественного определения ВЭЖХ-УФ. Е. Д. Кубасова, А. С. Панасюк и О. В. Буюклинская проводили интерпретацию результатов анализа. Все авторы принимали участие в обсуждении результатов анализов.

**Для цитирования:** Суханов А. Е., Ставрианиди А. Н., Кубасова Е. Д., Панасюк А. С., Буюклинская О. В. Разработка методики количественного определения диосгенина из семян пажитника сенного, *Trigonella foenum-graecum* L. *Разработка и регистрация лекарственных средств*. 2020;9(3):150–156. <https://doi.org/10.33380/2305-2066-2020-9-3-150-156>

## Method Development for Quantitative Determination of Diosgenin from the Seeds of Fenugreek, *Trigonella foenum-graecum* L.

Anton E. Sukhanov<sup>1\*</sup>, Andrej N. Stavrianiidi<sup>2</sup>, Elena D. Kubasova<sup>1</sup>, Aleksandra S. Panasyuk<sup>1</sup>, Ol'ga V. Buyuklinskaya<sup>1</sup>

1 – Northern State Medical University, Faculty of Pharmacy, Department of Pharmacy and Pharmacology, 51, Troitsky av., Arkhangelsk, 163000, Russia  
2 – Lomonosov Moscow State University, Faculty of Chemistry, Department of Analytical Chemistry, 1/3, Leninские Gory, GSP-1, Moscow, 119991, Russia

\*Corresponding author: Anton E. Sukhanov. E-mail: docpharmanton@hotmail.com

ORCID: Anton E. Sukhanov – <https://orcid.org/0000-0002-6214-307X>; Andrej N. Stavrianiidi – <https://orcid.org/0000-0003-2848-6535>; Elena D. Kubasova – <https://orcid.org/0000-0001-9683-7814>; Aleksandra S. Panasyuk – <https://orcid.org/0000-0003-4176-945X>; Ol'ga V. Buyuklinskaya – <https://orcid.org/0000-0002-4453-1079>.

Received: 25.03.2020. Revised: 23.07.2020. Published: 28.08.2020

### Abstract

**Introduction.** Modern pharmacognostic research is aimed at searching for plant biologically active individual compounds (RBAIS) isolated from plant extracts.

**Aim.** Study of the content of the steroid sapogenin diosgenin in fenugreek seeds in plant extracts by HPLC-UV method.

**Materials and methods.** The object of study was raw materials-fenugreek seeds produced as medicinal plant raw materials by LLC «Sage» (Irkutsk). Series of extraction and chromatographic separation by HPLC-UV method were performed.

**Results and discussion.** In this work, the method of diosgenin extraction was successfully optimized (after acid hydrolysis of dioscin with a 5 % aqueous solution of hydrochloric acid when heated for at least 4 hours in a sand bath at a power of 150 W) from raw fenugreek seeds using a 50 % aqueous solution of isopropanol, h.h. A simplified technique for chromatographic separation of diosgenin from fenugreek seed extracts using an isocratic mode of 99.9 % acetonitrile elution (h.h.) was proposed.

**Conclusion.** The average content of diosgenin (after acid hydrolysis of dioscin) in fenugreek seeds, taking into account the humidity of raw materials, is ( $M \pm \sigma$ )  $5,3 \pm 0,05$  mg/g (95 % CI:  $5,1-5,4$  mg/g;  $n = 6$ ).

© Суханов А. Е., Ставрианиди А. Н., Кубасова Е. Д., Панасюк А. С., Буюклинская О. В., 2020

© Sukhanov A. E., Stavrianiidi A. N., Kubasova E. D., Panasyuk A. S., Buyuklinskaya O. V., 2020

**Keywords:** fenugreek seeds, diosgenin, extraction, HPLC-UV.

**Conflict of interest:** no conflict of interest.

**Contribution of the authors.** Anton E. Sukhanov and Andrej N. Stavrianiidi developed and optimized a method for extracting diosgenin from plant raw materials, and also developed a method for quantifying HPLC-UV. Elena D. Kubasova, Aleksandra S. Panasyuk and Ol'ga V. Buyuklinka carried out the interpretation of the results. All the authors participated in the discussion of the results of the analyses.

**For citation:** Sukhanov A. E., Stavrianiidi A. N., Kubasova E. D., Panasyuk A. S., Buyuklinskaya O. V. Method development for quantitative determination of diosgenin from the seeds of fenugreek, *Trigonella foenum-graecum* L. *Razrabotka i registratsiya lekarstvennykh sredstv = Drug development & registration*. 2020;9(3):150–156. (In Russ.). <https://doi.org/10.33380/2305-2066-2020-9-3-150-156>

## ВВЕДЕНИЕ

Современные фармакогностические исследования направлены на поиск растительных биологически активных индивидуальных соединений (далее РБАИС), выделяемых из растительных экстрактов. Определяется то, что в растительных тканях и органах преобладают вещества с низкой молекулярной массой и являются, как правило, вторичными метаболитами. К таким веществам относятся, например стероидные сапонины. Как показали ряд научных исследований, стероидные гликозиды и их сапогенины, в частности диосгенин, обладают противораковым действием, оказывая цитотоксический эффект на клетки разных типов злокачественных опухолей, иммуностропным действием [1–2], гипогликемическим действием, нормализует уровень гормонов щитовидной железы в эксперименте [3–4]. Вместе с тем влияя на функции желез внутренней секреции экспериментальных животных и пролиферацию раковых клеток, диосгенин и другие стероидные сапогенины обладают гипохолестеринемическим действием [5–6]. Стероидные сапонины и их сапогенины оказывают губительное действие на разные виды моллюсков, а также на животных, дышащих жабрами [7]. Стероидный сапогенин диосгенин используется в химико-фармацевтической промышленности как исходный продукт для синтеза стероидных гормонов, для получения препарата «Полиспонин» (в составе сухого экстракта диоскорей nipponской), и входит в состав сухих экстрактов диоскорей nipponской и якорцев стелющихся, а также в состав комплексных смесей для пауэрлифтеров «Трибулус».

Диосцин и его агликон диосгенин являются основными хемосистематическими маркерами лекарственных растений диоскорей nipponской (*Dioscorea nipponica* Mikino) и якорцев стелющихся (*Tribulus terrestris* L.).

Стероидный сапогенин диосгенин был идентифицирован в сырье видов диоскорей (ямс), якорцев, юкк, спаржи и является довольно-таки распространённым стероидным сапогенином в определённых видах растений, обнаружен в составе тканей некоторых представителей семейства бобовые.

Нами из сырья семян пажитника сеного (*Trigonella foenum-graecum* L.) был выделен и идентифицирован стероидный сапогенин диосгенин.

**Цель работы** – изучение содержания стероидного сапогенина диосгенина в семенах пажитника сеного в растительных экстрактах методом ВЭЖХ-УФ.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Объектом изучения являлось сырьё – семена пажитника сеного, производимых в качестве лекарственного растительного сырья ООО «Шалфей» (г. Иркутск).

### Основные реактивы

Ацетонитрил, ч.д.а., HPLC Gradient 99,9 % (Biochem Chemopharma, Франция).

Кислота хлористоводородная, х.ч. 37,3 % (ГОСТ 3118-77, АО «Ленреактив», Россия).

Спирт изопропиловый, х.ч., 99,9 % (ЗАО «ЭКОС-1», Россия).

Диосгенин, порошок-субстанция с чистотой не менее 98,5 % навеска 100 мг, серия 011118 (ООО «Фитопанацея», Россия).

### Вспомогательное оборудование

Весы аналитические электронные «Acculab ALC-210d4» (Sartorius Group, США) с диаметром весовой чаши 80 мм и максимальной нагрузкой 210 г.

Ванна ультразвуковая ВУ-09-«Я-ФП»-03 (ООО «Ферропласт Медикал», Россия) с объёмом рабочей ёмкости 2,7 л и резонансной частотой 40 кГц.

Шейкер лабораторный «Laboratory shaker type 358S» (Elpan, Польша).

Центрифуга лабораторная ОПн-8 (ОАО НК «Дастан», Россия) со скоростью 8000 об/мин.

Мельница лабораторная ЛМ-202 (ООО «ПЛАУН», Россия).

Дозатор Proline Plus Sartorius Biohit с варьируемым объёмом от 10 мкл до 100 мкл (Sartorius Corporate, Финляндия).

Дозатор Proline Plus Sartorius Biohit с варьируемым объёмом от 0,1 мкл до 3 мкл (Sartorius Corporate, Финляндия).

Дозатор Ленпипет с постоянным объемом дозирования 1000 мкл (Thermo Fisher Scientific, США).

### Методика исследования абсолютной влажности сырья

Перед хроматографическими исследованиями нами проведено исследование влажности растительного сырья – семян пажитника сеного в соответствии с ОФС.1.5.3.0007.15 ГФ РФ 14 издания (2018 г.), том 2, стр. 2361 «Определение влажности лекарственного растительного сырья и лекарственных растительных препаратов» [8].

### Методика и параметры хроматографирования

**Параметры хроматографирования:** градиентный высокоэффективный жидкостный хроматограф «Стайер» (АО «Аквилон», Россия) с двумя прецизионными насосами высокого давления серии I и серии II (для градиентных систем), динамическим смесителем «MS 16», контроллером термостата колонки «TS10» и дегазатором элюента «DG 18». Детектор спектрофотометрический «UVV-104.1M» с рабочим диапазоном длин волн от 190 до 600 нм. Рабочая длина волны детектора – 205 нм. Инжектор ручного типа «Rheodyne» с объемом петли 20 мкл. Обращенно-фазовая колонка «Luna, 250 × 4,6 мм, 3 мкм», заполненная сорбентом на основе гидрофобизированного силикагеля C18 (Phenomenex, США). Подвижная фаза состояла из одного растворителя – ацетонитрил, ч.д.а. 99,9 %, HPLC Gradient (Biochem Chemopharma, Франция). Скорость подачи мобильной фазы в изократическом режиме – 0,4 мл/мин. Температура колонки – 60 °С.

Объем вводимой пробы – 20 мкл. Петлю дозатора объемом 20 мкл промывали 3-кратным объемом пробы.

**Обработка хроматограмм.** Обработку полученных хроматограмм производили в ручном режиме с использованием автоматизированной системы «Мультихром» версии 3.4.02022, разработанной ООО «Амперсенд» (Россия).

### Методика количественного определения

*Количественное определение диосгенина в растительных экстрактах и в лекарственном растительном сырье с использованием внешнего стандарта (ESM-метод) в «ручном» режиме подсчета концентрации.*

Расчет количественного содержания диосгенина в растительных экстрактах осуществлялся методом внешнего стандарта с использованием рабочего раствора растительного государственного стандартного образца (далее – РГСО) с концентрацией 250 мкг/мл, и производился по формуле:

$$C_{\text{экстр.}} = \frac{S_{\text{иссл.}} \cdot a_{\text{станд.}} \cdot V_{\text{аликв.}} \cdot P}{S_{\text{станд.}} \cdot V_{1\text{станд.}} \cdot V_{2\text{станд.}} \cdot 100\%}, \quad (1)$$

где 100 % – множитель для сокращения процентов;  $a_{\text{станд.}}$  – навеска стандарта растительного вещества для приготовления раствора РГСО (точная навеска), 20 мг;  $C_{\text{экстр.}}$  – концентрация анализируемого вещества в растительном экстракте, мг/мл;  $P$  – содержание чистого вещества в стандарте, не менее 98,5 %;  $S_{\text{иссл.}}$  – площадь пика диосгенина в растительном экстракте, mAU · с;  $S_{\text{станд.}}$  – площадь пика рабочего раствора РГСО диосгенина, mAU · с;  $V_{1\text{станд.}}$  – объем растворителя для приготовления стандартного раствора РГСО, 20 мл;  $V_{2\text{станд.}}$  – объем растворителя для приготовления рабочего раствора РГСО, до 10 мл;  $V_{\text{аликв.}}$  – объем аликвоты, пошедший на растворение, для приготовления рабочего раствора РГСО, например, с концентрацией 250 мкг/мл, 2,5 мл.

Расчет содержания диосгенина в сухом сырье:

$$C_{\text{иссл.}} = \frac{C_{\text{экстр.}} \cdot V \cdot a_{\text{сух.}} \cdot 100\%}{a_{\text{сух.1}} \cdot a \cdot (100\% - W\%)}, \quad (2)$$

где 100 % – сокращение процентов по показателю «влажность сырья»;  $a$  – навеска исходного растительного сырья, 500 мг;  $a_{\text{сух.}}$  – масса сухого остатка сырья после кислотного гидролиза и упаривания (точное взвешивание), мг;  $a_{\text{сух.1}}$  – навеска от сухого остатка сырья после кислотного гидролиза и упаривания, взятая для последующего 2-го этапа пробоподготовки (точная навеска), мг;  $C_{\text{экстр.}}$  – концентрация анализируемого вещества в растительном экстракте, мг/мл;  $V$  – объем раствора в виале, 10 мл;  $C_{\text{иссл.}}$  – содержание диосгенина в сухом сырье – семенах пажитника сеного, мг/г.

*Количественное определение диосгенина в лекарственном растительном сырье с использованием градуировочных растворов в «ручном» режиме подсчета концентрации.*

Точную навеску РГСО диосгенина (порошок-субстанция с чистотой не менее 98,5 %) массой 20 мг растворяли в 20 мл комбинированного растворителя состава: 16 мл 99,9 % ацетонитрила, ч.д.а. (Biochem Chemopharma, Франция), 2 мл воды деионизированной, 2 мл 99,9 % изопропанола, х.ч. (АО «ЭКОС-1», Россия) (8:1:1 по объему). Это стандартный раствор РГСО диосгенина с концентрацией 1000 мкг/мл (1 мг/мл).

Приготовленный стандартный раствор РГСО диосгенина использовался для получения серии рабочих (градуировочных) растворов РГСО диосгенина в диапазоне концентраций от 62,5 мкг/мл до 1000 мкг/мл.

### Методики пробоподготовки растительного сырья

По литературным данным наиболее широко используемым растворителем для экстракции из растительного сырья стероидных сапогенинов является метанол или его комбинации с другими органическими растворителями [9]. Однако метанол ядовит и не все химические лаборатории имеют лицензию на использование метилового спирта в

своей деятельности. В ходе дальнейших изысканий оптимального органического растворителя для экстракции стероидных сапогенинов из растительного материала [10] показали наибольшую приемлемость для данной цели 50 % изопропанола в комбинации с озвучиванием в течение 10 минут. Однако подэтап кислотного гидролиза, содержащегося в экстрактах гликозида диосцина, не был указан. Кислотный гидролиз необходим для разрыва О-гликозидной связи между гликоном и агликоном (диосгенином) с целью увеличения выхода диосгенина в процессе экстракции.

Экстракция стероидного сапогенина диосгенина для целей ВЭЖХ-УФ проводилась по методике в модификации [11–12].

**Этап пробоподготовки № 1.** Отбирали по 0,5 г измельчённых семян и последовательно добавляли в колбы для экстракции 8,5 мл 50 % изопропанола, х.ч., перемешивая на лабораторном шейкере «Laboratory shaker type 358S» (Elrap, Польша) после каждого добавления в течение одного часа. Изопропанольный экстракт был подвержен гидролизу 5 % раствором кислоты хлористоводородной, ч.д.а. в 50 % изопропаноле, ч.д.а. (10 мл 5 % раствора кислоты хлористоводородной, х.ч. и 10 мл 99,9 % изопропанола, х.ч.) в течение 4 часов на песчаной бане при температуре 70 °С при мощности 150 Вт. Суммарный объём экстракта до начала термического гидролиза составлял 28,5 мл. По мере испарения изопропанола и уменьшения объёма экстракта в процессе кислотного гидролиза на протяжении 4 часов в колбу добавляли смесь 10 мл 5 % раствора кислоты хлористоводородной и 10 мл 99,9 % изопропанола. После проведения термического кислотного гидролиза надосадочную жидкость (изопропанольный экстракт) декантировали в фарфоровые чашки для упаривания остаточной жидкой фазы на песчаной бане до получения сухого остатка, не допуская подгорания последнего. Массу сухих остатков взвешивали на аналитических весах Acculab ALC-210d4 с точностью до четвёртого знака после запятой. В дальнейшем от каждой массы сухих остатков отбирали по 100 мг (точная навеска) сухого экстракта, помещали в виалы объёмом 10 мл.

**Этап прободготовки № 2.** В каждую виалу добавляли по 10 мл 50 % изопропанола. В дальнейшем проводили экстракцию в виалах в ванне ультразвуковой ВУ-09-«Я-ФП»-03 (ООО «Ферропласт Медикал», Россия) при комнатной температуре в течение 15 минут. Отбирали по 5 мл из каждой виалы надосадочной жидкости и фильтровали через фильтр с размерами пор 0,45 мкм. Отбрасывали первые 4 мл экстракта, и отбирали по 1 мл полученного фильтрата в пробирку микроцентрифужную «эппендорф» с крышкой для центрифугирования объёмом 1,5 мл. Далее центрифугировали на центрифуге ОПн-8 (ОАО НК «Дастан», Россия) в течение 20 минут при 8000 об/мин и отбирали 1000 мкл надосадочной жидкости в виалу для ВЭЖХ-УФ анализа.

### **Методика определения времени удерживания диосгенина в заданных хроматографических условиях с использованием раствора РГСО диосгенина с концентрацией 250 мкг/мл**

Для определения времени удерживания диосгенина в данной хроматографической системе ВЭЖХ-УФ производили инъекцию раствора РГСО диосгенина с концентрацией 250 мкг/мл в колонку. Объём инъекции составлял 60 мкл (3-кратное значение от объёма петли инжектора в 20 мкл). Фиксировали время появления наиболее выраженного пика в диапазоне времени от 0 до 30 минуты.

Рабочая длина волны была установлена на 205 нм для количественного анализа РГСО диосгенина при стабильности базовой линии, отсутствии пиковых помех и максимальной степени поглощения диосгенином при заданной длине волны. Был выбран изократический режим элюирования для разделения диосгенина в образцах растительных экстрактов [согласно паспорту анализа фитохимического стандарта диосгенина компании «Chromadex» (США), лот № 00004916-351].

### **Методика проведения холостого опыта с использованием только подвижной фазы в изократическом режиме**

Холостой опыт был проведён с использованием только подвижной фазы. Подвижная фаза состояла из одного компонента: ацетонитрил 99,9 %, ч.д.а. (фаза А).

В данных условиях методом ВЭЖХ-УФ РГСО не было обнаружено. Следовательно, случайные и систематические ошибки исключались при последующих качественном и количественном анализах растительных экстрактов.

### **Методика проведения холостого опыта с использованием только комбинированного растворителя**

Холостой опыт был проведён инъекцией в хроматографическую колонку лишь комбинированного растворителя: 99,9 % ацетонитрил – вода деионизированная – 99,9 % изопропанол в соотношении 8:1:1 с использованием изократического режима элюирования.

В данных условиях методом ВЭЖХ-УФ РГСО не было обнаружено. Следовательно, случайные и систематические ошибки исключались при последующих качественном и количественном анализах растительных экстрактов.

## **РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ**

Нами было проанализировано растительное сырьё – семена пажитника сеного, по описанной выше методике. Предварительно была определена абсолютная влажность сырья семян пажитника сен-



ного с использованием пакета статистической программы «Stata MP15». Переменные с целью проведения анализа 6 образцов семян пажитника сеного представлены в таблице 1.

**Таблица 1.** Переменные для расчёта абсолютной влажности растительного сырья – семян пажитника сеного (*Trigonella foenum-graecum* L.)

**Table 1.** Variables for calculating the absolute moisture content of plant materials – seeds of hay fenugreek (*Trigonella foenum-graecum* L.)

Масса бюкса пустого с крышкой, доведённая до постоянного значения, г Empty weight with lid, brought to a constant value, g	Масса сырья до высушивания, г The mass of raw materials before drying, g	Масса сырья после высушивания, доведённого до постоянного значения, г The mass of raw materials after drying, brought to a constant value, g
35,9140	2,0062	1,7907
34,4972	2,0048	1,7951
44,7062	2,0080	1,7894
33,0385	2,0008	1,7812
35,5304	2,0015	1,7860
30,8405	2,0036	1,7977

Значения абсолютной влажности рассчитывали по формуле без перевода в проценты:

$$W = \frac{m - m_1}{m}$$

$$W_1 = (2,0062 - 1,7907) / 2,0062 = 0,1074.$$

$$W_2 = (2,0048 - 1,7951) / 2,0048 = 0,1046.$$

$$W_3 = (2,0080 - 1,7894) / 2,0080 = 0,1089.$$

$$W_4 = (2,0008 - 1,7812) / 2,0008 = 0,1098.$$

$$W_5 = (2,0015 - 1,7860) / 2,0015 = 0,1077.$$

$$W_6 = (2,0036 - 1,7977) / 2,0036 = 0,1028.$$

На основании детального описательного анализа переменной можно предварительно сделать вывод о том, что данные по абсолютной влажности имеют нормальное распределение.

Таким образом, метрологические характеристики по расчёту показателя абсолютной влажности сырья – семян пажитника сеного: средняя арифметическая (Mean) = 0,1069 или 10,69 % (95 % ДИ: 0,1041–0,1097). Стандартное отклонение (Std. dev.) = 0,0026606. Содержание влаги для семян пажитника сеного по Eur. Ph. Vol. 7.0 должно быть не более 12,00 %.

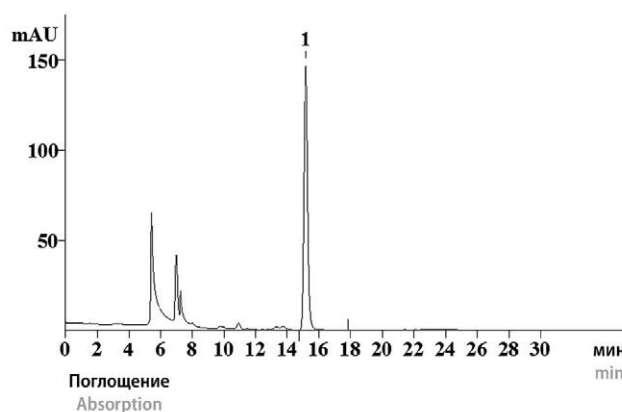
Идентификация и количественное определение стероидного сапогенина диосгенина осуществлялось методом ВЭЖХ-УФ с использованием ультрафиолетового детектора при длине волны 205 нм с использованием EMS-метода (метод внешнего стандарта) и «ручным» подсчётом содержания диосгенина в растительном сырье.

Согласно литературным данным, наибольшее количество диосцина и, следовательно, диосгенина содержится в семенах пажитника сеного. Одним из методов, позволяющих определить структуру стероидных сапонинов, является кислотный гидролиз последних с образованием агликона сапогенина. В указанном методе ВЭЖХ-УФ время выхода диосгенина составляет 15 минут. Проводили хроматографирование лишь подвижной фазы (ацетонитрил 99,9 %, х.ч.), так и комбинированного растворителя. На хроматограммах отсутствовали пики диосгенина, что позволяет избежать возникновения в дальнейшем случайных и систематических ошибок при постановке EMS-методики ВЭЖХ-УФ анализа.

С целью автоматического подсчёта концентрации диосгенина в растительных экстрактах в программе «Мультихром» использовали серию градуировочных растворов РГСО диосгенина в диапазоне концентраций от 62,5 до 1000 мкг/мл в вышеуказанных хроматографических условиях.

Для идентификации диосгенина по времени выхода в указанных хроматографических условиях и определения площади пика диосгенина с целью расчёта концентрации диосгенина «ручным» способом в растительном экстракте методом внешнего стандарта с использованием раствора РГСО диосгенина с концентрацией 250 мкг/мл производили инъекцию данного раствора в инжектор.

На рисунке 1 представлена хроматограмма раствора РГСО диосгенина с концентрацией 250 мкг/мл. При этом время выхода диосгенина в указанных хроматографических условиях составило 15,2 минут. В отчёте площадь пика рабочего раствора РГСО диосгенина с концентрацией 250 мкг/мл составила 2396,14 mAU · с.



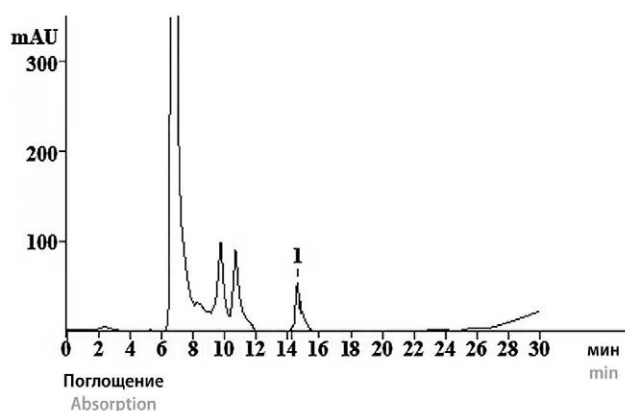
**Рисунок 1.** Хроматограмма стандартного раствора РГСО диосгенина в указанных хроматографических условиях с концентрацией 250 мкг/мл

Пик 1 – пик диосгенина

**Figure 1.** Chromatogram of a standard solution of RGSO diosgenin in the indicated chromatographic conditions with a concentration of 250 µg/ml

Peak 1 – Diosgenin Peak

В результате анализа 1-го образца растительного экстракта семян пажитника сеного в указанных хроматографических условиях была получена хроматограмма, представленная на рисунке 2.



**Рисунок 2.** Хроматограмма растительного экстракта семян пажитника сеного в указанных хроматографических условиях  
Пик 1 – пик диосгенина

**Figure 2.** Chromatogram of a plant extract of hay fenugreek seeds under the indicated chromatographic conditions  
Peak 1 – Diosgenin Peak

На рисунке 2 представлена хроматограмма растительного экстракта семян пажитника сеного. При этом время выхода диосгенина в указанных хроматографических условиях – 15 минут. В отчёте программы «Мультихром» версии 3.4.02022, разработанной ООО «Амперсэнд» (Россия), площадь пика диосгенина составила 833,47 mAU · с.

Расчёт концентрации диосгенина после проведения 2 этапов пробоподготовки в растительном экстракте семян пажитника сеного ESM-методом.

$$C_{\text{экстр.}} = \frac{S_{\text{иссл.}} \cdot a_{\text{станд.}} \cdot V_{\text{аликв.}} \cdot P}{S_{\text{станд.}} \cdot V_{1\text{станд.}} \cdot V_{2\text{станд.}} \cdot 100 \%}$$

$$C_{\text{экстр.}} = (S_{\text{иссл.}} \cdot a_{\text{станд.}} \cdot V_{\text{аликв.}} \cdot P) / (S_{\text{станд.}} \cdot V_{1\text{станд.}} \times V_{2\text{станд.}} \cdot 100 \%) = (833,47 \cdot 20 \text{ мг} \cdot 2,5 \text{ мл} \times 98,5\%) / (2396,14 \cdot 20 \text{ мл} \cdot 10 \text{ мл} \cdot 100 \%) = 0,08566 \text{ мг/мл.}$$

Для последующих 5 образцов растительных экстрактов проводились аналогичные расчёты.

Расчёт содержания диосгенина в сухом сырье:

$$C_{\text{иссл.}} = \frac{C_{\text{экстр.}} \cdot V \cdot a_{\text{сух.}} \cdot 100 \%}{a_{\text{сух.1}} \cdot a \cdot (100 \% - W \%)}$$

$$C_{\text{иссл.}} = (C_{\text{экстр.}} \cdot V \cdot a_{\text{сух.}} \cdot 100 \%) / (a_{\text{сух.1}} \cdot a \cdot (100 \% - W \%)) = (0,08566 \text{ мг/мл} \cdot 10 \text{ мл} \cdot 276 \text{ мг} \cdot 100\%) / (100 \text{ мг} \times 500 \text{ мг} \cdot (100 \% - 10,74 \%) = 0,005297 \text{ мг/мг}$$

или 5,297 мг/г ≈ 5,3 мг/г.

Для последующих 5 образцов растительных экстрактов проводились аналогичные хроматографические исследования в указанных идентичных хроматографических параметрах и расчёты.

Всего было проанализировано 6 образцов экстрактов семян пажитника сеного с использованием комплекса пробоподготовки. Данные отражены в таблице 2.

Для оценки усреднённого содержания в семенах пажитника сеного диосгенина с учётом влажности сырья использовали методы описательной статистики. Среднее содержание диосгенина (после кислотного гидролиза диосциана) в семенах пажитника сеного с учётом влажности сырья составляет ( $M \pm \sigma$ ) 5,3 ± 0,05 мг/г (95 % ДИ: 5,1–5,4 мг/г; n = 6).

**Таблица 2.** Результаты анализа методом ВЭЖХ-УФ растительных экстрактов семян пажитника сеного с использованием комплекса пробоподготовки рассчитанные ESM-методом

**Table 2.** Results of HPLC-UV analysis of plant extracts of hay fenugreek seeds after complex sample preparation, calculated by ESM method

№ образца Sample No.	Содержание диосгенина Diosgenin content				
	Масса сухого остатка после кислотного гидролиза и упаривания, мг Dry residue weight after acid hydrolysis and evaporation, mg	Навеска сухого остатка после кислотного гидролиза и упаривания, взятая для последующего 2-го этапа пробоподготовки, мг A portion of the dry residue after acid hydrolysis and evaporation, taken for subsequent 2 <sup>nd</sup> stage sample preparation, mg	Площадь пика образца, mAU · с The peak area of the sample, mAU · s	Содержание в экстракте из семян пажитника сеного после двух этапов пробоподготовки (C <sub>экстр.</sub> ), мг/мл The content in the extract from the seeds of hay fenugreek after two stages of sample preparation (S <sub>ext.</sub> ), mg/ml	Содержание в сухом исходном сырье – семенах пажитника сеного (C <sub>иссл.</sub> ), мг/г Content in dry feedstock - seeds of hay fenugreek (S <sub>issl.</sub> ), mg/g
1	276,00	100	833,47	0,08566	5,3
2	283,50	102	800,45	0,08226	5,1
3	281,55	99,5	825,95	0,08488	5,4
4	273,45	101	830,45	0,08534	5,2
5	282,20	102	840,00	0,08633	5,4
6	275,50	100	828,25	0,08512	5,2

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В данной работе была оптимизирована методика экстракции диосгенина (после кислотного гидролиза диосцина 5 % водным раствором кислоты хлористоводородной при нагревании в течение не менее 4 часов на песчаной бане при мощности последней в 150 Вт) из сырья семян пажитника сеного с использованием 50 % водного раствора изопропанола, х.ч. Была предложена упрощённая методика хроматографического разделения диосгенина из экстрактов семян пажитника сеного с использованием изократического режима элюирования 99,9 % ацетонитрилом, х.ч.

## ЛИТЕРАТУРА/REFERENCES

1. Michalak O., Krzeczynski P., Cieślak M., Cmoch P., Cybulski M., Królewska-Golińska K., Kaźmierczak-Barańska J., Trzaskowski B., Ostrowska K. Synthesis and anti-tumour, immunomodulating activity of diosgenin and tigogenin conjugates. *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*. 2020;198:105573. Doi: 10.1016/j.jsbmb.2019.105573.
2. Sun G. C., Jan C. R., Liang W. Z. Exploring the impact of a naturally occurring saponin diosgenin on underlying mechanisms of Ca<sup>2+</sup> movement and cytotoxicity in human prostate cancer cells. *Environmental toxicology*. 2020;35(3):395–403. Doi: 10.1002/tox.22876.
3. Gan Q., Wang J., Hu J., Lou G., Xiong H., Peng C., Zheng S., Huang Q. The role of diosgenin in diabetes and diabetic complications. *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*. 2019;198:105575. Doi: 10.1016/j.jsbmb.2019.105575.
4. Kiss R., Pesti-Asbóth G., Szarvas M. M., Stündl L., Cziáky Z., Hegedűs C., Kovács D., Badale A., Máthé E., Szilvássy Z., Remenyik J. Diosgenin and its fenugreek based biological matrix affect insulin resistance and anabolic hormones in a rat based insulin resistance model. *BioMed research international*. 2019;4:7213913. Doi: 10.1155/2019/7213913.
5. Wang W., Zhao E., Jing W., Zhang J. Ultra high-performance liquid chromatography – ion trap mass spectrometry characterization of the steroidal saponins of *Dioscorea panthaica Prain et Burkill* and its application for accelerating the isolation and structural elucidation of steroidal saponins. *Steroids*. 2015;95:51–65. Doi: 10.1016/j.steroids.2014.12.023.
6. Wu F. C., Jiang J. G. Effects of diosgenin and its derivatives on atherosclerosis. *Food and function*. 2019;10(11):7022–7036. Doi: 10.1039/c9fo00749k.
7. Diab Y., Ioannou E., Emam A., Vagias C., Roussis V. Desmettianosides A and B, bisdesmosidic furostanol saponins with molluscicidal activity from *Yucca desmettiana*. *Steroids*. 2012;77(6):686–690. Doi: 10.1016/j.steroids.2012.02.014.
8. State Pharmacopoeia of the Russian Federation. XIV edition. Volume 2. M.: *Ministerstvo Zdravoohraneniya Rossii*, 2018.
9. Stekolshchikova E., Stavrianidi A., Porotova A., Rodin I., Shpigun O. Combination of HPLC-MS and QAMS as a new analytical approach for determination of saponins in ginseng containing products. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. 2017;132:87–92. Doi: 10.1016/j.jpba.2016.09.041.
10. Stavrianidi A. N., Stekolshchikova E. A., Turova P. N., Rodin I. A., Shpigun O. A. Quantitative analysis of a multicomponent system for liquid chromatography-mass spectrometry determination of diosgenin, dioscin and protodioscin in plant extracts of *Tribulus terrestris*, 2017. *Moscow University Chemistry Bulletin*. 2017;72:144–153. Doi: 10.3103/S0027131417030063.
11. Choi S. J., Choi J., Jeon H., Bae S. K., Ko J., Kim J., Yoon K. D. Application of high-performance countercurrent chromatography for the isolation of steroidal saponins from *Liriope plathyphylla*. *Journal of separation science*. 2015;38(1):18–24. Doi: 10.1002/jssc.201401007.
12. Sarvin B., Stekolshchikova E., Rodin I., Stavrianidi A., Shpigun O. Optimization and comparison of different techniques for complete extraction of saponins from *T. terrestris*. *Journal of applied research on medicinal and aromatic plants*. 2018;8:75–82. Doi: 10.1016/j.jarmap.2017.12.002.