

<https://doi.org/10.33380/2305-2066-2020-9-4-107-114>  
УДК 615.453.82



Оригинальная статья/Research article

## Валидация методики ВЭЖХ-УФ количественного определения стероидного сапогенина 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: 12.08.2020. Статья принята в печать: 02.10.2020. Статья опубликована: 24.11.2020

### Резюме

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

**Цель.** Валидация методики ВЭЖХ-УФ количественного определения сапогенина диосгенина в растительных экстрактах из семян пажитника сенного.

**Материалы и методы.** Объектом изучения являлось сырьё – семена пажитника сенного, производимых в качестве лекарственного растительного сырья, ООО «Шалфей» (г. Иркутск). Валидация методики была проведена по параметрам: специфичность, линейность, правильность, прецизионность в соответствии с требованиями ГФ XIV. Для анализа использовалась одна серия лекарственного растительного сырья: номер серии – 010117, дата выпуска – 15 февраля 2017 г.

**Результаты и обсуждение.** Определены валидационные характеристики и экспериментально подтверждено их соответствие необходимым критериям приемлемости.

**Заключение.** Установлено, что разработанная методика идентификации и количественного определения диосгенина в экстрактах семян пажитника сенного методом ВЭЖХ-УФ является правильной, прецизионной, специфичной и линейной в аналитической области.

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

**Конфликт интересов:** конфликта интересов нет.

**Вклад авторов.** А. Е. Суханов и А. Н. Ставрианиди разработали методику валидации метода количественного определения стероидного сапогенина диосгенина ВЭЖХ-УФ. Е. Д. Кубасова, А. С. Панасюк и О. В. Буюклинская проводили интерпретацию результатов анализа. Все авторы принимали участие в обсуждении результатов анализов. Ранее авторами апробирована методика идентификации и количественного определения диосгенина в растительных экстрактах семян пажитника сенного методом ВЭЖХ-УФ в изократическом режиме элюирования.

**Для цитирования:** Суханов А. Е., Ставрианиди А. Н., Кубасова Е. Д., Панасюк А. С., Буюклинская О. В. Валидация методики ВЭЖХ-УФ количественного определения стероидного сапогенина диосгенина из семян пажитника сенного, *Trigonella foenum-graecum* L. *Разработка и регистрация лекарственных средств*. 2020;9(4):15–20. <https://doi.org/10.33380/2305-2066-2020-9-4-107-114>

## Validation of the HPLC-UV Method for Quantitative Determination of Steroid Sapogenin Diosgenin from Hay Fenugreek Seeds, *Trigonella Foenum-graecum* L.

Anton E. Sukhanov<sup>1\*</sup>, Andrey N. Stavrianiidi<sup>2</sup>, Elena D. Kubasova<sup>1</sup>, Alexandra S. Panasyuk<sup>1</sup>, Olga 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, Leninskie 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>; Andrey N. Stavrianiidi – <https://orcid.org/0000-0003-2848-6535>; Elena D. Kubasova – <https://orcid.org/0000-0001-9683-7814>; Alexandra S. Panasyuk – <https://orcid.org/0000-0003-4176-945X>; Olga V. Buyuklinskaya – <https://orcid.org/0000-0002-4453-1079>.

Received: 12.08.2020. Revised: 02.10.2020. Published: 24.11.2020

### Abstract

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

**Aim.** Validation of HPLC-UV quantitative determination of sapogenin diosgenin in plant extracts from fenugreek seeds.

**Materials and methods.** The object of study was raw materials-fenugreek seeds produced as medicinal plant raw materials by LLC «Sage» (Irkutsk). Validation of the method was carried out according to the parameters: specificity, linearity, correctness, precision in accordance with the requirements of SP XIV. One series of medicinal plant raw materials was used for the analysis, such as serial number – 010117, release date – 15 february 2017.

**Results and discussion.** Validation characteristics were determined and their compliance with the necessary acceptance criteria was experimentally confirmed.

© 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

**Conclusion.** It is established that the developed method of identification and quantitative determination of diosgenin in fenugreek seed extracts by HPLC-UV is correct, precise, specific and linear in the analytical field.

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

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

**Contribution of the authors.** Anton E. Sukhanov and Andrey N. Stavrianiidi developed a validation method for the quantitative determination of the steroid sapogenin diosgenin HPLC-UV. Elena D. Kubasova, Alexandra S. Panasyuk and Olga V. Buyuklinskaya interpreted the results of the analysis. All the authors participated in the discussion of the results of the analyses. Previously, the authors tested the method of identification and quantitative determination of diosgenin in plant extracts of fenugreek seeds by HPLC-UV in the isocratic elution mode.

**For citation:** Sukhanov A. E., Stavrianiidi A. N., Kubasova E. D., Panasyuk A. S., Buyuklinskaya O. V. Validation of the HPLC-UV method for quantitative determination of steroid sapogenin diosgenin from hay fenugreek seeds, *Trigonella foenum-graecum* L. *Razrabotka i registratsiya lekarstvennykh sredstv = Drug development & registration*. 2020;9(4):15–20. (In Russ.). <https://doi.org/10.33380/2305-2066-2020-9-4-107-114>

## ВВЕДЕНИЕ

В настоящее время российский фармацевтический рынок нуждается в эффективных лекарственных препаратах растительного происхождения. Диосцин и его агликон диосгенин являются основными хемосистематическими маркерами лекарственных растений диоскореи ниппонской (*Dioscorea nipponica* Mikino) и якорцев стелющихся (*Tribulus terrestris* L.). Стероидный сапогенин диосгенин используется в химико-фармацевтической промышленности как исходный продукт для синтеза стероидных гормонов, для получения препарата «Полиспонин» (в составе сухого экстракта диоскореи ниппонской) и входит в состав сухих экстрактов диоскореи ниппонской и якорцев стелющихся, а также в составе комплексных смесей для пауэрлифтеров «Трибулус».

Стероидный сапогенин диосгенин был идентифицирован в сырье видов: диоскореи (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 сенного (*Trigonella foenum-graecum* L.) был выделен и идентифицирован стероидный сапогенин диосгенин.

**Цель работы** – валидация аналитической методики идентификации и количественного определения стероидного сапогенина диосгенина в растительных экстрактах из семян пажитника сенного методом ВЭЖХ-УФ.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Объектом изучения являлось сырьё – семена пажитника сенного, производимых в качестве лекарственного растительного сырья, ООО «Шалфей» (г. Иркутск). Для анализа использовалась одна серия лекарственного растительного сырья: номер серии – 010117, дата выпуска – 15 февраля 2017 г.

### 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 «Фитопапачея», 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-ВП»-03 (ООО «Ферропласт Медикал», Россия) с объёмом рабочей ёмкости 2,7 л и резонансной частотой 40 кГц.

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

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

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

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

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

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

### 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), динамического смесителя «MS 16», контроллера термостата колонки «TS10» и дегазатора элюента «DG 18». Детектор спектрофотометрический «UVV-104.1M» с рабочим диапазоном длин волн от 190 до 600 нм. Рабочая длина волны де-

тектора – 205 нм. Инжектор ручного типа «Rheodyne» с объёмом петли 20 мкл. Обращённо-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 99,9 % (Biochem Chemopharma, Франция). Скорость подачи подвижной фазы в изократическом режиме – 0,4 мл/мин. Температура колонки – 60 °С.

Объём вводимой пробы – 20 мкл. Петлю дозатора объёмом 20 мкл промывали 3-кратным объёмом пробы.

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

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

Точную навеску растительного государственного стандартного образца (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 объёму). 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, а именно: 62,5 мкг/мл (0,625 мл раствора РГСО до 10 мл тем же комбинированным растворителем 8:1:1), 125 мкг/мл (1,25 мл раствора РГСО до 10 мл тем же комбинированным растворителем 8:1:1), 250 мкг/мл (2,5 мл раствора РГСО до 10 мл тем же комбинированным растворителем 8:1:1), 500 мкг/мл (5 мл раствора РГСО до 10 мл тем же комбинированным растворителем 8:1:1), 1000 мкг/мл (стандартный раствор РГСО с концентрацией 1 мг/мл).

### **Методики пробоподготовки растительного сырья**

По литературным данным наиболее широко используемым растворителем для экстракции из растительного сырья стероидных сапонинов и сапогенинов является метанол или его комбинации с другими органическими растворителями [1]. 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 экстрак-

ции стероидных сапогенинов из растительного материала [2] показали наибольшую приемлемость для данной цели 50 % водный раствор 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 O-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 [3–4].

**Этап пробоподготовки № 1.** Отбирали по 0,5 г измельчённых семян и последовательно добавляли в колбы для экстракции 8,5 мл 50 % водного раствора изопропанола, х.ч., перемешивая на лабораторном шейкере «Laboratory shaker type 358S» (Elpan, Польша) после каждого добавления в течение одного часа. Изопропанольный экстракт был подвержен гидролизу 5 % раствором кислоты хлористоводородной, ч.д.а. в 50 % водном растворе изопропанола, 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 вials объёмом 10 мл.

**Этап пробоподготовки № 2.** В каждую виалу добавляли по 10 мл 50 % водного раствора изопропанола. В дальнейшем проводили экстракцию в виалах в ванне ультразвуковой ВУ-09-«Я-ВП»-03 (ООО «Ферропласт Медикал», Россия) при комнатной температуре с озвучиванием 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» (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 минут.

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 пробы подвижной фазы в изократическом режиме

Холостой опыт был проведён с использованием пробы 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 анализе растительных экстрактов.

### Методика проведения холостого опыта с использованием пробы комбинированного растворителя

Холостой опыт был проведён инъекцией в хроматографическую колонку пробы 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 анализе растительных экстрактов.

### Методика количественного определения

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

Расчёт 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 формулам:

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

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,  $\text{mAU} \cdot \text{с}$ ;  $S_{\text{станд.}}$  – площадь пика рабочего раствора РГСО диосгенина,  $\text{mAU} \cdot \text{с}$ ;  $V_{1\text{станд.}}$  – объём растворителя для приготовления стандартного раствора РГСО, 20 мл;  $V_{2\text{станд.}}$  – объём растворителя для приготовления рабочего раствора РГСО, до 10 мл;  $V_{\text{аликв.}}$  – объём аликвоты, пошедший на растворение, для приготовления рабочего раствора РГСО, например, с концентрацией 250 мкг/мл, 2,5 мл.

Расчёт содержания диосгенина в сухом сырье:

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

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;  $V$  – объём раствора в вiale, 10 мл;  $C_{\text{иссл.}}$  – содержание диосгенина в сухом сырье – семенах пажитника сеного, мг/г.

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

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 сырья – семян пажитника сеного по Eur. Ph. Vol. 7.0 должно быть не более 12,00 %.

Для оценки усреднённого содержания в семенах пажитника сеного (серия – 010117, дата выпуск – 15.02.2017 г.) диосгенина с учётом влажности сырья использовали методы описательной статистики. Среднее содержание диосгенина (после кислотного гидролиза диосцина) 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;  $n = 6$ ).

## Валидация аналитической методики

### Правильность методики

Правильность аналитической методики выражает близость между принятым истинным значением и полученным значением. Правильность выражается величиной открываемости.

**Открываемость** – соотношение между полученным средним и истинным значениями с учётом соответствующих доверительных интервалов. Показателем правильности метода обычно является значение систематической погрешности. Правильность оценивается на основании не менее 9 результатов определений минимум на 3 уровнях концентраций в пределах аналитической области (3 повторности для 3 концентраций). Готовят 3 модельные смеси для каждой из 3 концентраций: 80 %, 100 % и 120 %.

Оценка проводилась путём расчёта процента определения известной концентрации, стандартного отклонения и коэффициента вариации, доверительного интервала для меры положения – среднего значения (таблица 1).

За аргумент было взято значение содержания диосгенина в сухом исходном сырье для уровня концентрации 100 % в 100 мг – 5,3 мг/г диосгенина.

Описательная статистика правильности методики анализа отражена в таблице 2.

Как видно из таблицы 2, коэффициент вариации составляет менее 2,00 %. Среднее значение составляет 5,38 мг/г и находится внутри регламентирован-

ного диапазона 99–101 %. Доверительный интервал среднего значения включает 100%-е значение.

**Таблица 2.** Результаты статистической обработки экспериментальных данных, полученных при изучении правильности методики ВЭЖХ УФ стероидного сапогенина диосгенина по методу внешнего стандарта – в сравнении с площадью пика раствора РГСО диосгенина с концентрацией 250 мкг/мл ( $p = 95 \%$ )

**Table 2.** Results of statistical processing of experimental data, obtained when studying the correctness of the HPLC-UV steroid sapogenin diosgenin by the external standard method-in comparison with the peak area of the solution of standard diosgenin with a concentration of 250 mcg/ml ( $p = 95 \%$ )

Статистический показатель Statistical indicator	Результат Result
Среднее значение ( $C_{иссл.}$ ), мг/г Average value ( $C_{iss.}$ ), mg/g	5,38
Стандартное отклонение Standard deviation	0,0971825
Относительное стандартное отклонение (коэффициент вариации), % Relative standard deviation (coefficient of variation), %	1,81
Нижняя граница 95 % доверительного интервала Lower bound of 95 % confidence interval	5,303
Верхняя граница 95 % доверительного интервала The upper limit of the 95 % confidence interval	5,452

**Прецизионность методики.** Выражает близость результатов между сериями измерений, проведёнными из множества проб, взятых из одной и той же од-

**Таблица 1.** Параметры установления правильности методики ВЭЖХ-УФ стероидного сапогенина диосгенина по методу внешнего стандарта – в сравнении с площадью пика раствора РГСО диосгенина с концентрацией 250 мкг/мл

**Table 1.** Parameters for determining the correctness of the HPLC-UV method of steroid sapogenin diosgenin by the external standard method-in comparison with the peak area of the standard diosgenin solution with a concentration of 250 mcg/ml

Уровень концентрации, % Concentration level, %	Масса сухого остатка сырья после кислотного гидролиза и упаривания (точное взвешивание), мг The dry weight of the residue of the raw material after acid hydrolysis and evaporation (accurate weighing), mg	Навеска сухого остатка после кислотного гидролиза и упаривания, взятая для последующего 2-го этапа пробоподготовки (точная навеска), мг Dry residue suspension after acid hydrolysis and evaporation, taken for the subsequent 2nd stage of sample preparation (exact suspension), mg	Площадь пика образца, mAU · с Sample peak area, mAU · s	Содержание в экстракте из семян пажитника сенного после двух этапов пробоподготовки ( $C_{экстр.}$ ), мг/мл The contents in the extract from the seeds of fenugreek after two stages of sample preparation ( $C_{extr.}$ ), mg/ml	Содержание в сухом исходном сырье – семенах пажитника сенного ( $C_{иссл.}$ ), мг/г The content in dry raw materials – the seeds of fenugreek ( $C_{ress.}$ ), mg/g	Отклик, % Response, %
80	276	80	665,37	0,06838	5,3	100,00
	284	80	665,46	0,06839	5,4	101,89
	283	81	674,95	0,06936	5,4	101,89
100	276	100	833,47	0,08566	5,3	100,00
	272	101	830,45	0,08534	5,2	98,11
	279	102	840,00	0,08633	5,4	101,89
120	286	120	1001,15	0,10289	5,5	103,77
	288	119	992,65	0,10201	5,5	103,77
	283	121	1010,25	0,10382	5,4	101,89

народной пробы. Прецизионность устанавливается на трех уровнях: повторяемость, промежуточная (внутрилабораторная) прецизионность и воспроизводимость (межлабораторная прецизионность).

1-й уровень – **повторяемость методики**. Повторяемость методики оценивали по результатам, полученным в одинаковых регламентированных условиях в одной лаборатории (один и тот же исполнитель, одно и то же оборудование, один и тот же набор реактивов) в течение короткого промежутка времени.

Результаты 6 параллельных испытаний по сырью пажитника сеного представлены в таблице 3.

**Таблица 3.** Результаты оценки повторяемости методики количественного определения стероидного сапогенина диосгенина в семенах пажитника сеного

**Table 3.** Results of evaluation of repeatability of the method of quantitative determination of steroid sapogenin diosgenin in fenugreek seeds

Результаты анализа с учётом влажности сырья, мг/г The results of the analysis taking into account raw material water content, mg/g	Средний результат, мг/г Average result, mg/g	Стандартное отклонение, мг/г Standard deviation, mg/g	Относительное стандартное отклонение (коэффициент вариации), % Relative standard deviation (coefficient of variation), %	Доверительный интервал для среднего результата при 95 % уровне значимости, мг/г Confidence interval for the average result at 95 % significance level, mg/g
5,3	5,27	0,1211	2,30	5,14 – 5,39
5,1				
5,4				
5,2				
5,4				
5,2				

Относительное стандартное отклонение (коэффициент вариации) отдельных результатов составляет 2,30 %.

2-й уровень – **промежуточная (внутрилабораторная) прецизионность**. Характеризует влияние вариаций внутри лаборатории на результаты испытаний отдельных идентичных образцов, отобранных в одной и той же серии. Анализ проводили два исполнителя в разные дни на одном и том же оборудовании с применением одних и тех же реактивов. Результаты внутрилабораторной прецизионности представлены в таблице 4.

### Специфичность методики

Способность аналитической методики однозначно оценивать определяемое вещество независимо от других веществ, присутствующих в испытуемом образце.

В результате исследования на хроматограмме растительных экстрактов семян пажитника сеного наблюдался пик диосгенина с временем удерживания 15,2 минут времени выхода. Это же время выхода наблюдалось при хроматографировании растворов

РГСО диосгенина в диапазоне концентраций от 62,5 до 1000 мкг/мл, что и обеспечивает специфичность данной методики в присутствии подвижной фазы А – ацетонитрила (х.ч.) и компонентов комбинированного растворителя – ацетонитрила (х.ч.) и изопропанола (х.ч.).

**Таблица 4.** Результаты промежуточной (внутрилабораторной) прецизионности методики количественного определения стероидного сапогенина диосгенина в семенах пажитника сеного

**Table 4.** Results of intermediate (intra-laboratory) precision of the method quantitative determination of the steroid sapogenin diosgenin in the seeds of fenugreek

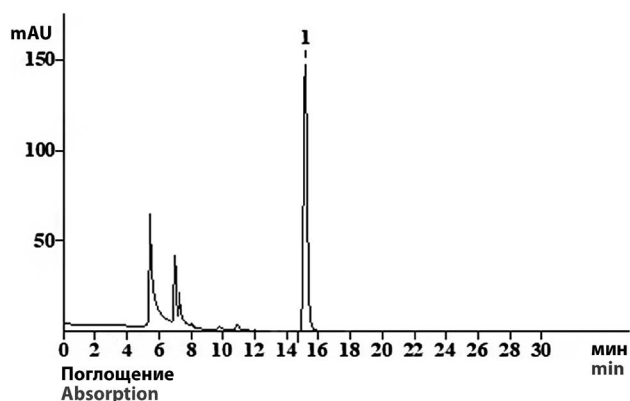
Исполнитель Executor	Дата анализа Date of analysis	Результаты анализа с учётом влажности сырья, мг/г The results of the analysis taking into account raw material water content, mg/g	Средний результат, мг/г Average result, mg/g	Стандартное отклонение, мг/г Standard deviation, mg/g	Относительное стандартное отклонение (коэффициент вариации), % Relative standard deviation (coefficient of variation), %
№ 1	20.01.2020	5,3	5,23	0,10328	1,97
	20.01.2020	5,2			
	21.01.2020	5,4			
	21.01.2020	5,1			
	21.01.2020	5,2			
	21.01.2020	5,2			
№ 2	22.01.2020	5,5	5,23	0,15055	2,88
	22.01.2020	5,1			
	22.01.2020	5,2			
	24.01.2020	5,2			
	24.01.2020	5,1			
	24.01.2020	5,3			

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 – 15,2 минут времени выхода. В отчёте площадь пика рабочего раствора РГСО диосгенина с концентрацией 250 мкг/мл составила 2396,14 mAU · с.

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

На рисунке 2 представлена хроматограмма растительного экстракта семян пажитника сеного. При этом время выхода диосгенина в указанных хроматографических условиях – 15,2 минут времени выхода.

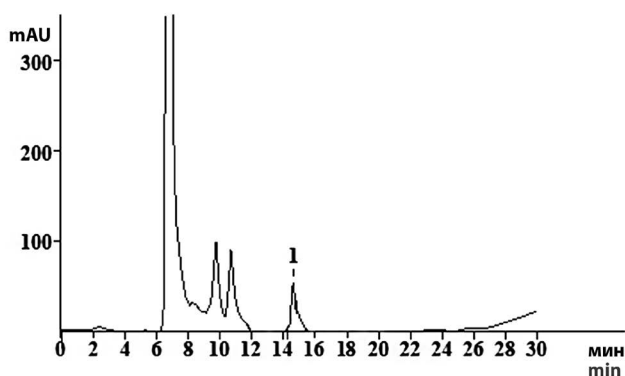


**Рисунок 1.** Хроматограмма стандартного раствора РГСО диосгенина в указанных хроматографических условиях с концентрацией 250 мкг/мл.

Пик 1 – пик диосгенина

**Figure 1.** Chromatogram of a standard solution of standard diosgenin under the specified chromatographic conditions with a concentration of 250 micrograms/ml.

Peak 1 – diosgenin peak



**Рисунок 2.** Хроматограмма растительного экстракта семян пажитника сенного в указанных хроматографических условиях.

Пик 1 – пик диосгенина

**Figure 2.** Chromatogram of plant extract of fenugreek seeds under the specified chromatographic conditions.

Peak 1 – diosgenin peak

В отчёте программы «Мультихром» версии 3.4.02022, разработанной ООО «Амперсэнд» (Россия), площадь пика диосгенина составила 833,47 mAU · с.

### Линейность методики

Наличие прямо пропорциональной зависимости аналитического сигнала от концентрации определяемого вещества в образце в пределах диапазона применения (аналитической области) методики.

Для установления линейной зависимости между концентрацией вещества (диосгенина) в растительном экстракте и площадью хроматографического пика проводили статистическую обработку выборки, полученной в результате количественных анализов на 5 уровнях концентрации. Для определения линейности

в соответствии с методом наименьших квадратов проводили хроматографирование в аналогичных условиях 5 растворов РГСО с концентрациями в диапазоне от 62,5 мкг/мл до 1000 мкг/мл.

Н. А. Эпштейн [5] рекомендует в рамках валидации методики количественного определения по показателю «линейность» использовать не менее 5 градуировочных растворов (не менее 5 точек) с коэффициентом корреляции К. Пирсона ( $r^2$ ) не менее 0,995.

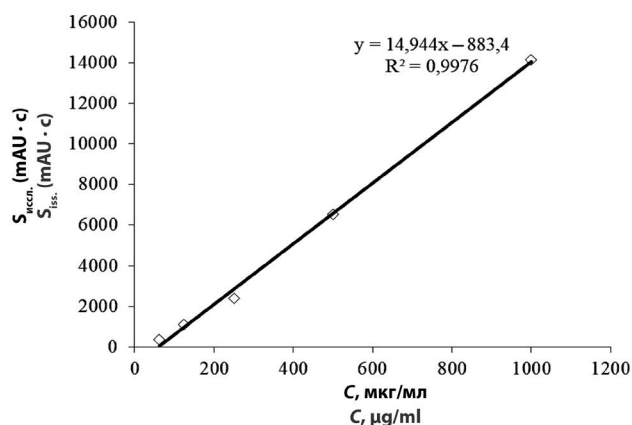
По результатам хроматографического анализа строили график градуировочной зависимости отношения площадей пиков растворов РГСО диосгенина к их концентрациям. Исходные данные представлены в таблице 5.

**Таблица 5.** Переменные градуировочных растворов диосгенина в диапазоне концентраций 62,5–1000 мкг/мл

**Table 5.** Variables of diosgenin calibration solutions in the range concentrations of 62.5–1000 micrograms/ml

№ раствора № solution's	Концентрация раствора, мкг/мл The concentration of the solution, µg/ml	Площадь пика раствора, mAU · с Solution peak area, mAU · c
1	62,5	340,28
2	125	1091,12
3	250	2396,14
4	500	6543,26
5	1000	14165,43

График линейной зависимости строили при помощи программы Microsoft Excel 2016 (Microsoft Inc., США) (рисунок 3).



**Рисунок 3.** График линейной зависимости концентрации от площадей пика стандартных образцов диосгенина в диапазоне концентраций от 62,5 до 1000 мкг/мл

**Figure 3.** Graph of linear dependence of the concentration on the peak areas of standard diosgenin samples in the concentration range from 62,5 to 1000 mcg/ml

Результаты статистической обработки экспериментальных данных, полученных при линейной зависимости  $Y = b \times X + a$ , представлены в таблице 6.

Статистические параметры рассчитывались при помощи программы «Stata MP 15.0» (Stata Inc., США).

**Таблица 6.** Результаты линейного регрессионного анализа стандартных растворов диосгенина в диапазоне концентраций от 62,5 до 1000 мкг/мл в программе «Stata MP 15.0»

**Table 6.** Results of linear regression analysis of standard diosgenin solutions in the concentration range from 62,5 to 1000 mcg/ml in the program «Stata MP 15.0»

Статистический параметр Statistical parameter	Результат Result
Уравнение линейной регрессии Linear Regression Equation	$Y = 14,944X - 883,4$
Угловой коэффициент линейной регрессии, $b$ Slope of linear regression, $b$	14,944 (95 % ДИ = 13,587–16,29977) 14,944 (95 % CI = 13.587–16.29977)
Свободный член линейной регрессии, $a$ Free term of linear regression, $a$	-883,4 (95 % ДИ = -1583,382–(-183,411)) -883.4 (95 % CI = -1583.382–(-183.411))
Среднее значение массы навески, г Average weight of the sample, g	0,0001
Среднее значение критерия Стьюдента $t_{табл.}$ (P = 95 %, f = n - 1 = 5 - 1 = 4) Average value of Student's test $t_{табл.}$ (P = 95 %, f = n - 1 = 5 - 1 = 4)	-4,02
Коэффициент детерминации (R-squared) или коэффициент корреляции Coefficient of determination (R-squared) or correlation coefficient	0,9976
Коэффициент детерминации скорректированный (Adj R-squared) или коэффициент корреляции скорректированный Adj R-squared or Correlation Coefficient	0,9968
Ошибка стандартного отклонения Standard deviation error	324,89

Исходя из построенного графика рисунка 3 коэффициент корреляции ( $r^2$ ) составляет 0,9976, а уравнение кривой имеет вид  $Y = 14,944X - 883,4$ . Следовательно, по полученным данным можно судить о линейности данной методики в диапазоне концентраций 62,5–1000 мкг/мл.

**Аналитическая область методики (диапазон применения).** В пределах диапазона применения методика должна обеспечивать требуемую линейность, правильность и прецизионность. В рамках данного диапазона концентраций от 80 до 120 % была доказана линейность, правильность и прецизионность методики.

Приведённая методика прошла валидацию и соответствует требованиям ОФС.1.1.0012.15 «Валидация аналитических методик» Государственной фармакопеи РФ XIV издания по показателям «правильность», «прецизионность», «специфичность» и «линейность».

## ЛИТЕРАТУРА

1. Stekolshchikova E. A., Stavrianidi A. N., 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.
2. 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.
3. Choi S. J. et al. 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.
4. 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.
5. Эпштейн Н. А. Валидация аналитических методик: графические и расчетные критерии для оценки линейности методик на практике. *Разработка и регистрация лекарственных средств*. 2019;8(2):122–130. (In Russ.). DOI: 10.33380/2305-2066-2019-8-2-122-130.

## REFERENCES

1. Stekolshchikova E. A., Stavrianidi A. N., 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.
2. 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.
3. Choi S. J. et al. 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.
4. 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.
5. Epstein N. A. Validation of analytical methods: graphical and computational criteria for evaluating the linearity of methods in practice. *Razrabotka i registratsiya lekarstvennykh sredstv = Drug development & registration*. 2019;8(2):122–130. (In Russ.). DOI: 10.33380/2305-2066-2019-8-2-122-130.