

УДК 543.544.5.068.7/543.054.2

ПРИМЕНЕНИЕ МЕТОДА КОЛИЧЕСТВЕННОГО АНАЛИЗА МНОГОКОМПОНЕНТНОЙ СИСТЕМЫ ДЛЯ ХРОМАТОМАСС-СПЕКТРОМЕТРИЧЕСКОГО ОПРЕДЕЛЕНИЯ ДИОСГЕНИНА, ДИОСЦИНА И ПРОТОДИОСЦИНА В ЭКСТРАКТАХ ИЗ ТРАВЫ *TRIBULUS TERRESTRIS*

А.Н. Ставрианиди*, Е.А. Стеколыщикова, П.Н. Турова, И.А. Родин, О.А. Шпигун

(кафедра аналитической химии; *e-mail: stavrianidi.andrey@gmail.com)

Разработан способ одновременного определения диосцицина, протодиосцицина и диосгенина в экстрактах из растительного сырья (пределы обнаружения в диапазоне 5–20 нг/мл) с помощью метода жидкостной хроматографии/масс-спектрометрии. Для анализа растительных экстрактов использовали обращенно-фазовый вариант хроматографии на сорбенте с привитыми группами C18 при последующей электрораспылительной ионизации и тандемном масс-спектрометрическом детектировании в режиме регистрации положительных ионов. Для расчета содержания по площадям пиков на хроматограммах по выделенным ионам использовали методы градуировочного графика и количественного анализа многокомпонентной системы. Показано, что расхождение между полученными результатами составляет менее 10%. Опробование предложенного подхода осуществляли при анализе этанольной вытяжки и водно-метанольного экстракта из надземных частей растения *Tribulus terrestris*.

Ключевые слова: высокоэффективная жидкостная хроматография/масс-спектрометрия, электрораспылительная ионизация, экстракция, растительное сырье, *Tribulus terrestris*, сапонины.

Якорцы стелющиеся (*Tribulus terrestris* Linnaeus.) – вид цветковых растений рода Якорцы (*Tribulus* L.) семейства Парнолистниковые (*Zygophyllaceae*), который издревле применяется в качестве растительного сырья в традиционной и альтернативной китайской медицине (ТКМ) [1]. В якорцах стелющихся найдены стероидные гликозиды (не менее 0,7 %), агликоном которых является диосгенин [2]. Для этого растения характерно также присутствие в химическом составе спиростаноловых и фураностаноловых сапонинов (рис. 1). Известно, что растения *T. terrestris* из разных географических регионов содержат сапонины, различающиеся по составу. В доступной литературе встречается информация о сапонилах, выделенных только из якорцев, произрастающих в Китае, Индии, Болгарии и Молдавии [3]. Поэтому разработка методов стандартизации растительного сырья и анализа выделяемых из якорцев стелющихся биологически активных веществ является очень актуальной задачей.

В литературе для определения сапонинов чаще всего применяют высокоэффективную жидкостную хроматографию (ВЭЖХ) с колонками, заполненными обращенно-фазовым

сорбентом, который хорошо подходит как для разделения полярных гликозидов, так и их агликонов. Однако отсутствие хромофорных групп у таких соединений не позволяет использовать УФ-детектирование, а использование градиентного элюирования исключает возможность применения рефрактометрического детектора. Применение испарительного детектирования по светорассеянию (ИДСР) успешно зарекомендовало себя при определении сапонинов *T. terrestris* в разных частях растений, собранных в разных местах произрастания, а также в коммерческих продуктах на основе этого растения с пределом обнаружения по протодиосцину 10 мкг/мл [4].

Наилучшим способом детектирования (по информативности, селективности и чувствительности) для определения сапонинов считается ионизация электрораспылением в сочетании с тандемной масс-спектрометрией (МС). Использование этого метода позволило получить характеристичные ВЭЖХ–МС/МС профили для разных частей растений *T. terrestris*, собранных в Юго-Восточной Европе и Западно-Азиатском регионе, а также во Вьетнаме и Индии. Наибольшая концентрация протодиосцицина (одного из основных хемометри-

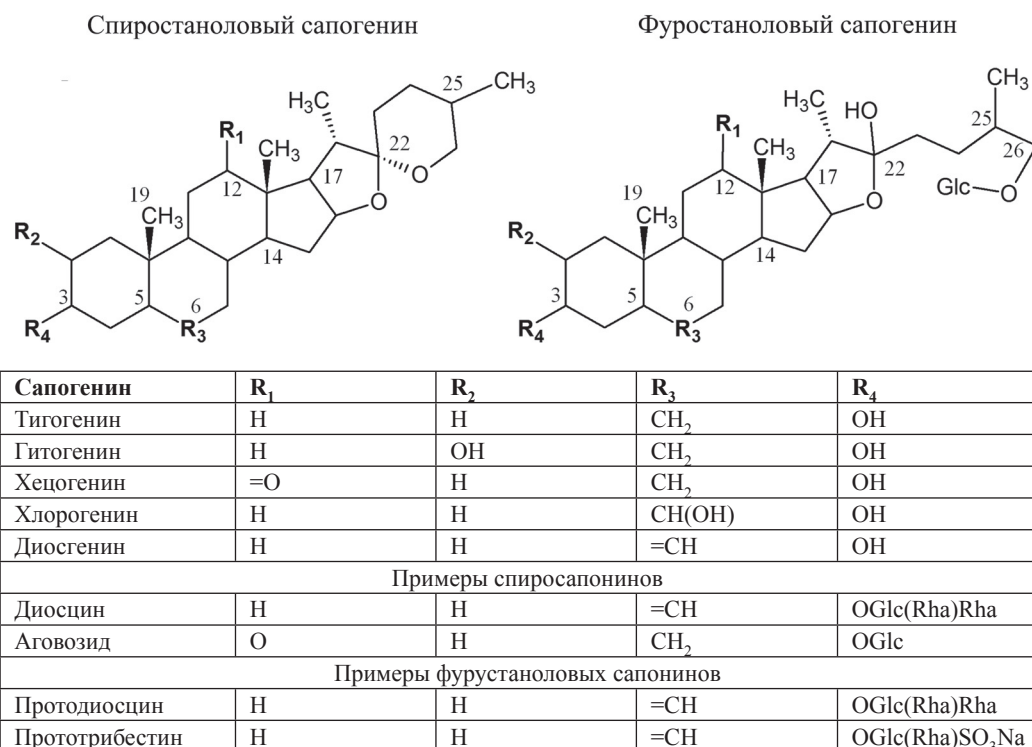


Рис. 1. Состав гликозидов растений рода Якорцы (*Tribulus L.*)

чески значимых маркеров) характерна для Юго-Восточно-Европейского и Западно-Азиатского хемотипов. Для получения характеристичных профилей растений проводили последовательную жидкостную экстракцию CHCl₃ (50 мл) и 70%-м этанолом из 1 г высушенного материала надземных частей растения, затем экстракты объединяли. Для анализа проб применяли разработанный способ ВЭЖХ–МС/МС определения шести разных сапонинов и рутина с минимальными определяемыми значениями концентрации от 0,05 мкг/мл (0,038 мкг/мл для протодиосцина) [5]. Важно отметить, что как и в случае УФ- и ИДСР-детектирования количественную оценку содержания компонентов в растительном сырье методом ВЭЖХ-МС проводят методом градуировочного графика. При этом наилучшим способом является внесение в раствор меченного изотопами внутреннего стандарта, что позволяет скомпенсировать матричные эффекты при ионизации аналита. Однако такие стандарты на сегодняшний день редко доступны для большинства физиологически активных компонентов растений, кроме того, установление точной концентрации аналита требует значительных усилий и временных затрат, а также досконально исследованной и проверенной системы извлечения аналитов из образца растительного материала. В последние годы в области анализа и контроля качества средств ТКМ широкое применение находит способ количественного

анализа многокомпонентной системы (КАМС), который позволяет определять содержания аналитов, используя факторы пересчета и устанавливая концентрацию одного референтного компонента в пробе [6]. Например, данный способ был успешно применен в ВЭЖХ–УФ-анализе тритерпеновых сапонинов *P. notoginseng* [7].

КАМС – относительно новый метод количественного анализа, поэтому важно показать и доказать возможность его применения на практике, сравнивая значения концентраций анализируемых соединений, рассчитанных разными способами. Наиболее часто для такой оценки применяют относительную ошибку метода (ООМ, %) [7]:

$$ООМ(\%) = \frac{C_1 - C_2}{C_2} \times 100\%, \quad (1)$$

где C₁, C₂ – концентрация компонента, определенная по методам КАМС и внешнего или внутреннего стандарта соответственно. Приемлемым считается отклонение меньше 10%. В методе КАМС референтное соединение выступает в роли внутреннего стандарта, концентрация которого меняется от пробы к пробе и должна быть определена с помощью построения градуировочной зависимости. Существуют три способа определения коэффициента пересчета.

1. Метод расчета по одной точке. Для определения фактора пересчета по этому способу необходимо приготовить стандартные растворы рефе-

рентного и определяемого соединений таким образом, чтобы их концентрации находились вблизи середины рабочего диапазона концентраций. Значение фактора определяется по формуле:

$$f_x = \frac{S_{st} / C_{st}}{S_x / C_x}, \quad (2)$$

где C_x – концентрация определяемого соединения, C_{st} – концентрация соединения, принятого за референтное, S_x , S_{st} – величина аналитического сигнала (в данном случае площадь хроматографического пика) определяемого и референтного соединений соответственно.

2. Многоточечный метод расчета. Фактор пересчета, рассчитанный по этому способу, представляет собой среднее значение факторов, полученных на разных уровнях концентрации по методу 1. Для этого необходимо приготовить серии стандартных растворов референтного и определяемых соединений и рассчитать факторы по методу 1, а затем построить график зависимости фактора пересчета от концентрации определяемого соединения. Если на малых уровнях концентрации наблюдаются сильные флуктуации значения фактора, необходимо ограничить рабочий диапазон концентраций снизу. По факторам пересчета, принадлежащим новому рабочему диапазону концентраций, следует определить конечный фактор пересчета по формуле:

$$f_x = \frac{\sum_{i=1}^n \frac{S_{sti} / C_{sti}}{S_{xi} / C_{xi}}}{n}, \quad (3)$$

где n – число уровней концентраций.

3. Расчет фактора пересчета по методу линейной регрессии [8]. Расчет фактора по методу линейной регрессии, как и по методу 2, требует построения градуировочных графиков и установления градуировочных зависимостей референтного и определяемого соединений. Однако в данном случае фактор определяется как отношение угловых коэффициентов наклонов графиков градуировочных зависимостей:

$$f_x = k_{st} / k_x, \quad (4)$$

где k_{st} , k_x – коэффициенты наклона градуировочных функций референтного и определяемого соединения соответственно.

Далее концентрации определяемых соединений по методу КАМС следует рассчитывать по формуле:

$$C'_x = \frac{S_x}{S_{st} / C'_{st}} \times f_x, \quad (5)$$

где C'_x – концентрация определяемого компонента, а C'_{st} – концентрация соединения (принятого за референтное в том же образце), рассчитанная по методу градуировочного графика.

В случае масс-спектрометрического анализа достоинством применения КАМС является то, что некоторые вещества можно регистрировать, используя групповые характеристичные фрагментные ионы [9]. В таком случае условия получения сигнала одинаковых по составу ионов для построения хроматограмм и условия вычисления площади пиков для референтного аналита и остальных определяемых компонентов будут близки, что позволит уменьшить систематическую ошибку, связанную, например, с загрязнением камеры ионизации масс-спектрометра.

Таким образом, применение метода ВЭЖХ–МС/МС, а также способа КАМС для одновременного определения протодиосцина, диосцина и диосгенина в растительных экстрактах из травы *T. terrestris* представляется перспективным, так как не требует сложной пробоподготовки и отличается хорошими показателями чувствительности и воспроизводимости, а также позволяет проводить комплексную оценку качества препаратов на основе этого растительного сырья.

Экспериментальная часть

Растворы и реагенты. В работе использовали следующие реактивы: протодиосцин, диосцин и диосгенин (>98%, «Phytolab», Германия), ацетонитрил и метанол (для градиентной хроматографии, «Merck», Германия), муравьиная кислота («Sigma Aldrich», Германия).

Оборудование. В работе использовали систему ВЭЖХ–МС/МС, состоящую из tandemного масс-спектрометра «QTrap 3200» («AB Sciex», Канада), оснащенного источниками химической ионизации при атмосферном давлении и электрораспылительной ионизации, а также системой «ВЭЖХ ULTIMATE 3000» («Dionex», США). В качестве неподвижной фазы при определении протодиосцина, диосцина и диосгенина при их совместном присутствии в пробах использовали колонку с обращено-фазовым сорбентом «Acclaim RSLC» длиной 150 мм, внутренним диаметром 2,1 мм, размером зерна сорбента 2.2 мкм («Thermo», США). Экспериментальные данные регистрировали и обрабатывали с помощью персонального компьютера и программных пакетов «Analyst» («AB Sciex», Канада).

Приготовление стандартных растворов и построение градуировочных зависимостей. Навески протодиосцина, диосцина и диосгенина мас-

сой 1 мг растворяли в 1 мл воды. Полученные растворы использовали для приготовления серий градуировочных растворов с концентрацией 15,125; 32,25; 62,5; 125; 250; 500; 1000 и 2000 нг/мл. Полученные для водных растворов метрологические характеристики приведены в табл. 1. Пределы обнаружения вычисляли по формуле:

$$C_{\text{мин}} = 0,3C, \quad (6)$$

где C – наименьшая концентрация линейного диапазона определяемых содержаний.

Анализ растительных экстрактов. Отбирали 50 г измельченных надземных частей растения *T. terrestris* (ООО «Азбука трав», Россия) и последовательно добавляли 350, 250 и 250 мл 70%-го раствора этанола, перемешивая на шейкере в течение одного часа. Объединенные этанольные вытяжки упаривали на песчаной бане до получения сухого экстракта (0,4172 г). Отбирали навески полученного сухого экстракта (~100 мг), а также навески исходного растительного материала (100 мг). Использовали по три навески каждого образца. К навеске в пробирке объемом 15 мл добавляли 10 мл смеси метанол:вода (1:1), тщательно перемешивая. Далее проводили экстракцию в ультразвуковой ванне (ЗАО «ПКФ Сапфир», УЗВ-1.3 л, 190 Вт, 35 кГц) при 25–30 °С в течение 15 мин. Отбирали 5 мл надосадочной жидкости и пропускали через фильтр (0,45 мкм) «CHROMAFIL Xtra» («Macherey-Nagel», Германия), отбрасывали первые 2–3 мл экстракта, и отбирали 1 мл полученного фильтрата в пробирку для центрифугирования (1,5 мл). Далее центрифугировали 10 мин при 16 000 об/мин и отбирали 700 мкл надосадочной жидкости в виалу для ВЭЖХ–МС-анализа.

Условия хроматомасс-спектрометрического определения. Для определения использовали источник ионов для электрораспылительной ионизации в режиме регистрации выбранных ионов для

положительно заряженных ионов (температура источника ионизации 350 °С; напряжение на капилляре 5,5 кВ; давление газа-завесы 1 бар; давление газа-распылителя 2,8 бар). Разделение пробы проводили в изократическом режиме подачи элюента, скорость потока составляла 0,4 мл/мин. Подвижная фаза состояла из двух компонентов: воды с добавкой 0,1%-й муравьиной кислоты (элюент А) и ацетонитрила (элюент Б). Использовали две программы градиентного элюирования. В сокращенной программе элюирования для детектирования в режиме выбранных ионов, в начале анализа (до 1,5 мин) концентрация элюента Б составляла 15%; затем (до 7,5 мин) концентрация элюента Б равномерно увеличивалась до 95% и оставалась постоянной в течение 6,5 мин; после анализа в течение 4 мин проводили уравнивание системы в начальных условиях (15% элюента Б). Время анализа в режиме сканирования составило 20 мин, при этом концентрация элюента Б, в отличие от сокращенной программы, выдерживалась равной 95% в течение 7,5–16 мин, однако никаких дополнительных пиков на отрезке от 14 до 16 мин не наблюдали. Температура термостата колонки 25 °С. Объем вводимой пробы составлял 0,02 мл. Метрологические характеристики использованного подхода приведены в табл. 1.

Обсуждение результатов

Помимо протодиосцина и диосцина (рис. 1), в состав экстрактов из якорцев стелющихся входит большое число других важных компонентов близкой структуры, например террестросины А, В, С, D, E и F и другие производные хеогенина, гитогенина, тигогенина и диосгенина [3]. Для некоторых из этих компонентов применение УФ-детектирования является возможным благодаря наличию кето-группы при 12-м атоме углерода, однако более информативным и универсальным

Т а б л и ц а 1

Метрологические характеристики предложенного подхода определения протодиосцина, диосцина и диосгенина

Вещество	Диапазон линейности, нг/мл	Уравнение градуировочной зависимости	Коэффициент корреляции, r^2	Предел обнаружения в водном растворе, мкг/мл
Диосгенин	60–1000	$y = 938x - 208$	0,9982	0,02
Диосцин	15–1000	$y = 529x - 1765$	0,9976	0,005
Протодиосцин	30–1000	$y = 51x - 71$	0,9938	0,01

является ВЭЖХ–МС-анализ в режиме сканирования положительных ионов [5]. Таким образом, получены хроматограммы экстрактов из измельченной травы *T. terrestris* в варианте обращенно-фазовой хроматографии с использованием сорбента Acclaim RSLC C18. В течение анализа продолжительностью 20 мин получены пики нескольких основных компонентов (для протодиосцина и диосцина масс-спектры приведены на рис. 2), однако полного хроматографического разделения всех компонентов добиться не удалось.

Обнаруженные производные диосгенина и хеогенина были идентифицированы на основании совпадения m/z сигналов ионов $[M+H]^+$, $[M-H_2O+H]^+$ и $[M+Na]^+$ в масс-спектрах этих пиков с рассчитанными моноизотопными массами этих ионов для данных соединений, а также по сопоставлению наблюдаемых в спектрах сканирования фрагментных ионов (соответствующих последовательному отщеплению сахаридных заместителей

с образованием фрагментных ионов сапогенина и дегидратированного сапогенина) с расчетными массами данных фрагментов (табл. 2). Таким образом, для селективного определения отдельных групп физиологически активных сапонинов необходим переход к более селективному способу детектирования – регистрации сигналов отдельных ионов, характерных для групп компонентов, отличающихся типом сапогенина. В случае производных диосгенина, к которым относятся такие основные компоненты, как протодиосцин (5,11 мин) и диосцин (7,95 мин), такими характерными сигналами являются фрагмент диосгенина $m/z = 415$ и дегидратированная протонированная молекула диосгенина $m/z = 397$ (табл. 2).

На стадии проведения оптимизации условий масс-спектрометрического детектирования подбирали параметры, отвечающие за настройки работы масс-анализатора, а именно: потенциал декластеризации (ПД) и входной потенциал на нулевом

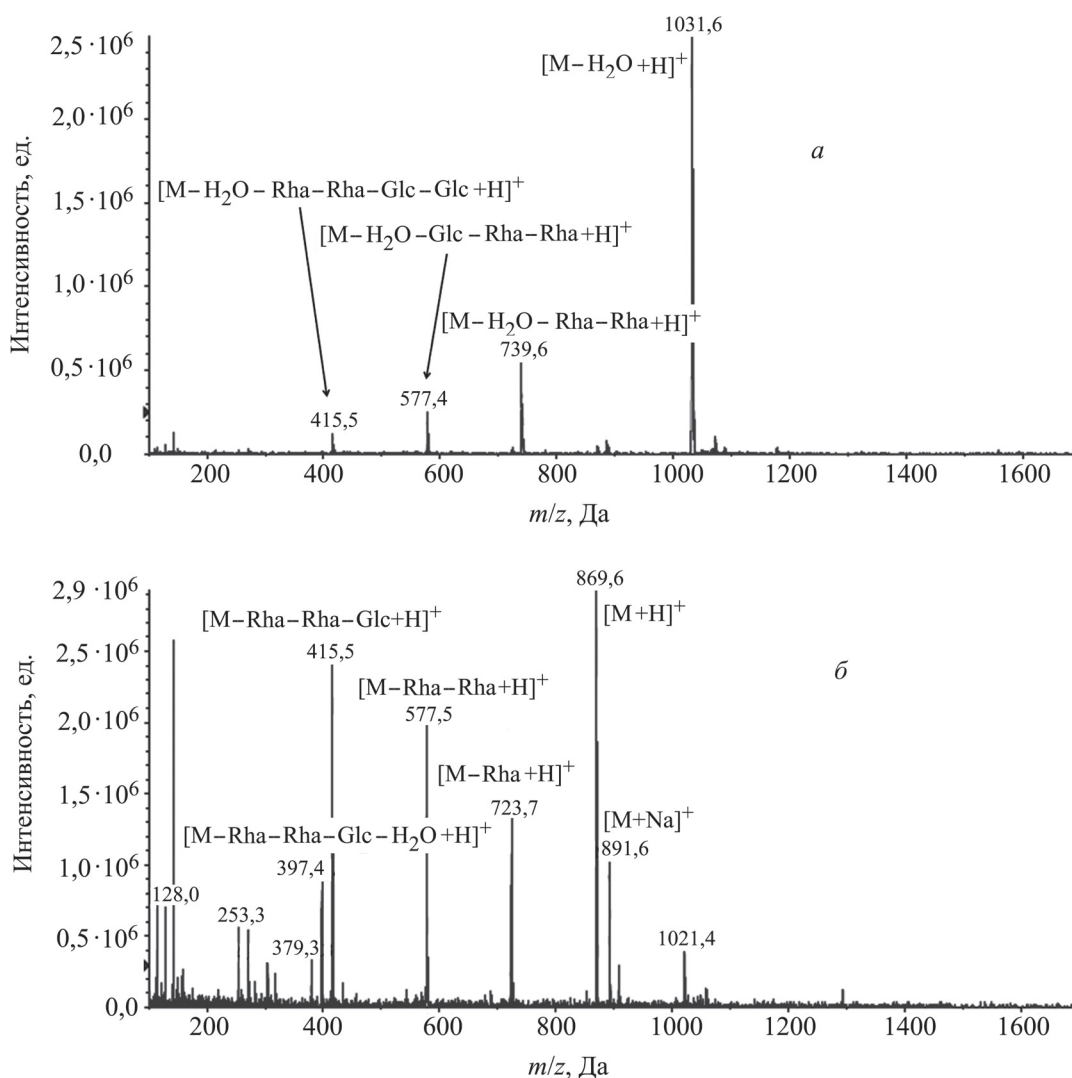


Рис. 2. Масс-спектры протодиосцина (а) и диосцина (б), полученные в результате ВЭЖХ–МС-анализа образца этанольного экстракта из растительного материала *T. terrestris*

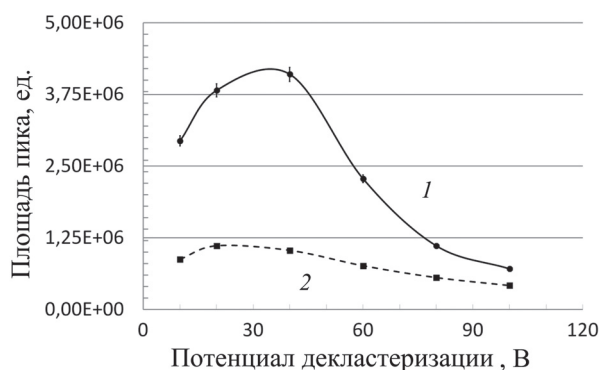


Рис. 3. Зависимость площадей пика диосцина по выделенным ионам с $m/z = 415$ (1) и $m/z = 397$ (2) от потенциала декластеризации (ПД)

квадруполье (ВП), необходимые для повышения интенсивности аналитического сигнала. Для этого в режиме прямого ввода с помощью шприцевого насоса анализировали водно-ацетонитрильные растворы (5 мкг/мл) диосцина и протодиосцина. В случае протодиосцина фрагментные ионы с $m/z = 415$ и $m/z = 397$ имели низкую интенсивность. Для диосцина регистрировали близкие по значению интенсивности сигналы этих ионов при разных значениях ВП в интервале от 8 до 12 В. Для выбора оптимального значения ПД из диапазона 20–100 В получили серию хроматограмм с шагом варьирования ПД 20 В. Разделение при каждом значении ПД проводили 3 раза. Показано (рис. 3), что оптимальным оказалось значение ПД 40 В для иона с $m/z = 415$ и 20 В для иона с $m/z = 397$. Значения температуры и давления потоков газов в источнике ионизации задавали в соответствии с рекомендацией производителя для скоростей потока подвижной фазы 0,4–1,0 мл/мин (см. экспериментальную часть).

Для перевода молекул сапонинов *T. terrestris* в протонированную форму в состав подвижной фазы входила деионизированная вода с добавкой 0,1%-й муравьиной кислоты, что позволило добиться приемлемых времени удерживания и интенсивности пиков определяемых веществ (рис. 4). Для определения аналитов применяли сокращенную программу градиентного элюирования, так как разработанный способ селективного детектирования в режиме регистрации выбранных ионов можно использовать даже при отсутствии полного хроматографического разделения пиков протодиосцина и диосгенина с другими компонентами экстракта.

Для вычисления факторов пересчета для протодиосцина и диосгенина (табл. 3) по формулам (2), (3) и (4) использовали площади пиков по сигналам ионов с $m/z = 415$, $m/z = 397$ и их сумме. Для сравнения этих способов вычисляли ООМ по формуле

(1) для одного из значений концентрации в одном из градуировочных растворов (125 нг/мл). Из полученных данных следует, что значения факторов пересчета, вычисленные для разных ионов, отличаются незначительно, однако наименьшая ошибка вычисления концентрации, по сравнению с методом градуировочного графика, получена при использовании суммарного сигнала двух ионов и метода расчета фактора по отношению наклонов градуировочных графиков.

Оценку характеристик разработанного подхода определения протодиосцина, диосцина и диосгенина проводили при анализе экстрактов из надземных частей растения *T. terrestris*. На рис. 4 приведены хроматограммы образцов экстрактов из надземных частей растения *T. terrestris* при экстрагировании смесью метанол : вода (1:1) и сконцентрированной этанольной вытяжкой, которая часто применяется в традиционной медицине [5]. Показано, что экстрагирование водно-метанольной смесью под воздействием ультразвука без нагревания привело к неполному извлечению менее полярного компонента – диосцина (табл. 3). Расчет содержания протодиосцина проводили по методу градуировочного графика и по методу КАМС, при этом значения ООМ оказались менее 10%.

Из 50 г исходного растительного сырья было получено при последовательной экстракции 70%-м этанолом около 0,4 г сухого порошка, содержащего 40 мг/г протодиосцина, следовательно, на 1 г исходного растительного сырья приходится около 0,3 мг этого вещества. Тогда на основании данных табл. 3 можно сделать вывод, что экстрагирование водно-метанольной смесью (в объеме 10 мл) позволяет добиться почти полного извлечения протодиосцина из 0,1 г растительного материала *T. terrestris* за один акт экстрагирования. Диосгенин не был обнаружен в исследованных экстрактах.

Выводы

Разработан способ быстрого одновременного ВЭЖХ–МС/МС-определения протодиосцина, диосцина и диосгенина в экстрактах из растительного сырья *T. terrestris*. Показано, что применение способа КАМС для количественной обработки МС-данных позволяет проводить адекватную оценку содержания определяемых соединений. Расхождение с результатами, полученными методом градуировочного графика, не превышает 10%.

Пределы обнаружения составили 5, 10 и 20 нг/мл при определении диосцина, протодиосцина и диосгенина соответственно. Преиму-

Т а б л и ц а 2

Обнаруженные компоненты в экстракте из растительного материала *T. terrestris*

Тип агликона (Соединение)	Сахаридная цепь	t_R , мин	Молекулярный ион/ ионы	Фрагментные ионы
Флавоноид (Рутин)	-Glc-Rha	4,6	611,5 [M+H] ⁺ 623,5 [M+Na] ⁺	303,1 [M-Glc-Rha+H] ⁺
Хеогенин фуранозолового [26-Glc] типа	-Glc[-Rha]-Rha	4,7	1047,3 [M-H ₂ O+H] ⁺	901,6 [M-H ₂ O-Rha+H] ⁺ 755,6 [M-H ₂ O-Rha-Rha+H] ⁺ 593,5 [M-H ₂ O-Glc-Rha-Rha+H] ⁺ 431,4 [M-H ₂ O-Glc-Rha-Rha+H] ⁺ 413,3 [M-2H ₂ O-Glc-Rha-Rha+H] ⁺
Диосгенин фуранозолового [26-Glc] типа (Протодиосцин)	-Glc[-Rha]-Rha	5,2	1031,5 [M-H ₂ O+H] ⁺ 1071,4 [M+Na] ⁺	885,5 [M-H ₂ O-Rha+H] ⁺ 739,6 [M-H ₂ O-Rha-Rha+H] ⁺ 577,5 [M-H ₂ O-Glc-Rha-Rha+H] ⁺ 415,4 [M-H ₂ O-Glc-Rha-Rha+H] ⁺ 397,4 [M-2H ₂ O-Glc-Rha-Rha+H] ⁺
Диосгенин фуранозолового [26-Glc] типа (Изопротодиосцин)	-Glc[-Rha]-Rha	5,3	1031,3 [M-H ₂ O+H] ⁺ 1071,8 [M+Na] ⁺ 1087,4 [M+K] ⁺	885,5 [M-H ₂ O-Rha+H] ⁺ 739,4 [M-H ₂ O-Rha-Rha+H] ⁺ 577,6 [M-H ₂ O-Glc-Rha-Rha+H] ⁺ 415,4 [M-H ₂ O-Glc-Rha-Rha+H] ⁺ 397,4 [M-2H ₂ O-Glc-Rha-Rha+H] ⁺
Диосгенин фуранозолового [26-Glc] типа	-Glc[-Rha]-SO ₃ H	5,5	965,3 [M-H ₂ O+H] ⁺	885,5 [M-H ₂ O-SO ₃ H+H] ⁺ 739,4 [M-H ₂ O-SO ₃ H-Rha+H] ⁺ 577,6 [M-H ₂ O-Glc-SO ₃ H-Rha+H] ⁺ 415,4 [M-H ₂ O-Glc-SO ₃ H-Rha+H] ⁺ 397,4 [M-2H ₂ O-Glc-SO ₃ H-Rha+H] ⁺

Окончание табл. 2

Диогенин фуранозолового [26-OH] типа	-Glc[-Rha]-Rha	5,6	869,7 [M-H ₂ O+H] ⁺	723,6 [M-H ₂ O-Rha+H] ⁺ 577,2 [M-H ₂ O-Rha-Rha+H] ⁺ 415,3 [M-H ₂ O-Glc-Rha-Rha+H] ⁺ 397,3 [M-2H ₂ O-Glc-Rha-Rha+H] ⁺
Диогенин фуранозолового [26-OH] типа	-Glc[-Rha]-Rha-SO ₃ H	5,9	949,4 [M-H ₂ O+H] ⁺	869,6 [M-H ₂ O-SO ₃ H+H] ⁺ 723,5 [M-H ₂ O-SO ₃ H-Rha+H] ⁺ 415,3 [M-H ₂ O-SO ₃ H-Glc-Rha-Rha+H] ⁺
Хеогенин спиростанолового типа (Атовозид)	-Glc	6,7	593,4 [M+H] ⁺	431,5 [M-Glc+H] ⁺ 413,5 [M-H ₂ O-Glc+H] ⁺
Хеогенин спиростанолового типа	-Glc[-Rha]-Rha	6,8	885,7 [M+H] ⁺	739,6 [M-Rha+H] ⁺ 593,4 [M-Rha-Rha+H] ⁺ 431,5 [M-Rha-Rha-Glc+H] ⁺ 413,5 [M-H ₂ O-Rha-Rha-Glc+H] ⁺
Хеогенин спиростанолового типа	-Glc-Rha	7,4	739,6 [M+H] ⁺	593,4 [M-Rha+H] ⁺ 431,5 [M-Rha-Glc+H] ⁺ 413,5 [M-H ₂ O-Rha-Glc+H] ⁺
Диогенин спиростанолового типа (Диосцин)	-Glc[-Rha]-Rha	8,0	869,6 [M+H] ⁺ 891,6 [M+Na] ⁺ 907,6 [M+K] ⁺	723,7 [M-Rha+H] ⁺ 577,5 [M-Rha-Rha+H] ⁺ 415,5 [M-Rha-Rha-Glc+H] ⁺ 397,5 [M-H ₂ O-Rha-Rha-Glc+H] ⁺ 379,5 [M-2H ₂ O-Rha-Rha-Glc+H] ⁺
Диогенин спиростанолового типа	-Glc-Rha	8,9	723,5 [M+H] ⁺ 745,6 [M+Na] ⁺	577,5 [M-Rha+H] ⁺ 415,5 [M-Rha-Glc+H] ⁺ 397,3 [M-H ₂ O-Rha-Glc+H] ⁺

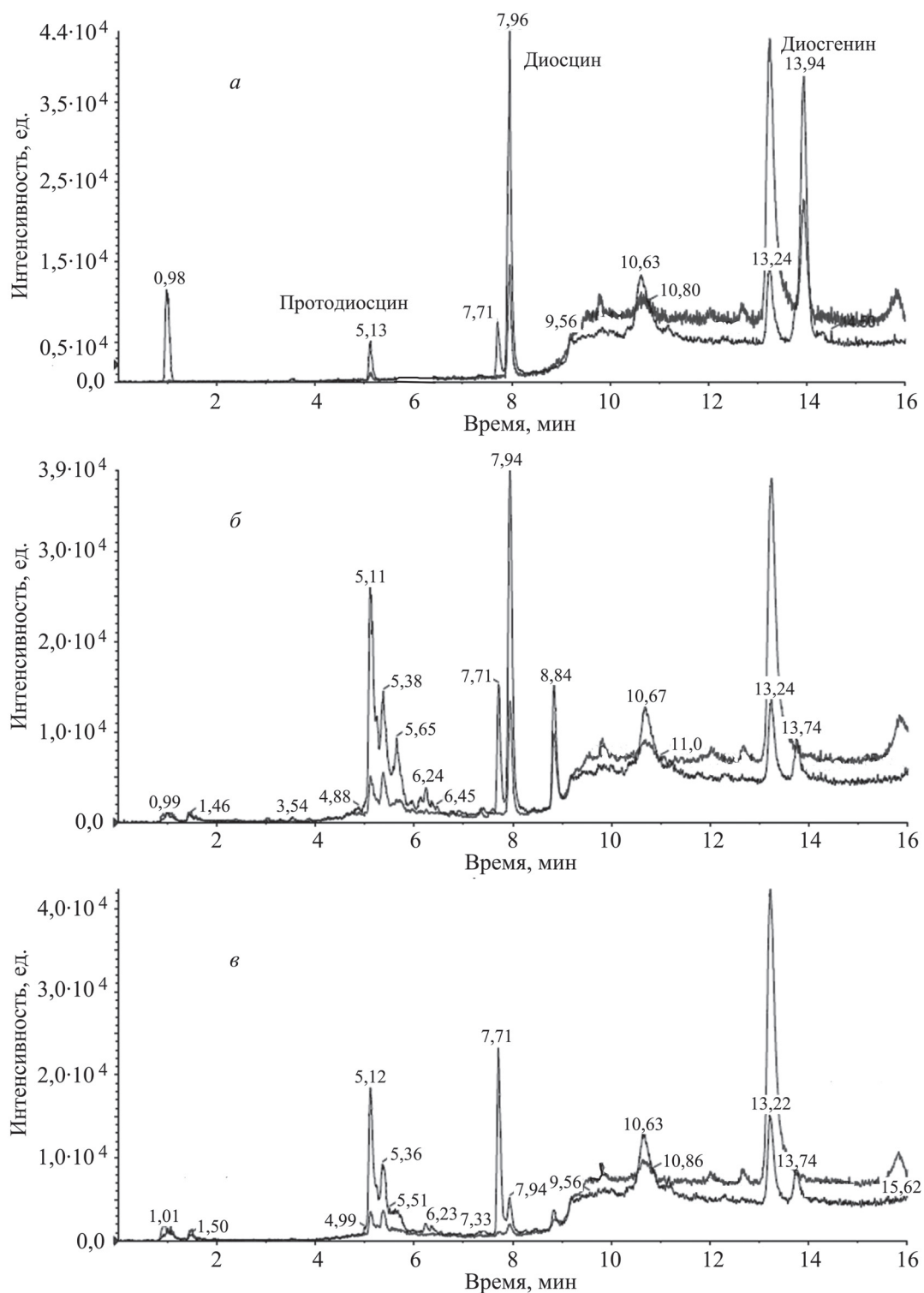


Рис. 4. Хроматограммы, полученные в режимах регистрации выбранных ионов с $m/z = 397$ (1) и $m/z = 415$ (2): а – стандартный раствор с содержанием диосцина, протодиосцина и диосгенина 0,5 мкг/мл; б – экстракт из сконцентрированной этанольной вытяжки и в – экстракт из сухого растительного материала *T. terrestris*

ществом указанного способа анализа является его высокая достоверность и правильность, что позволяет использовать предложенный способ в качестве референтного. Установлено, что экстрагирование смесью метанол : вода (1:1) под

воздействием ультразвука без нагревания позволяет добиться хорошего извлечения более полярных гликозидов фураностанолового типа, но не подходит для извлечения спиростаноловых сапонинов, например диосцина.

Содержание диосцина, протодиосцина и диосгенина в исследованных образцах

Компонент	Растительный материал			Этанольный экстракт (сухой)		
	C _{град} , мг/г	C _{КАМС} , мг/г	ООМ, %	C _{град} , мг/г	C _{КАМС} , мг/г	ООМ, %
Протодиосцин	0,35	0,37	7	39	41	5
Диосцин	0,008	–	–	2,8	–	–
Диосгенин	<0,002	<0,002	–	<0,1	<0,1	–

Работа поддержана Российским фондом фундаментальных исследований
(проект мол_а_дк 16-33-60007).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Gauthaman K., Adaikan P.G., Prasad R.N.V. // Life Sci. 2002. Vol. 71. N 12. P. 1385.
2. Ботанико-фармакогносический словарь. Справ. пособие / Под ред. К.Ф. Блиновой, Г.П. Яковлева. М., 1990. С. 263.
3. Kostova I., Dinchev D. // Phytochem. Rev. 2005. Vol. 4. N 2–3. P. 111.
4. Ganzera M., Bedir E., Khan I.A. // J. Pharm. Sci. 2001. Vol. 90. N 11. P. 1752.
5. Dinchev D., Janda B., Evstatieva L., Oleszek W., Aslani M.R., Kostova I. // Phytochem. 2008. Vol. 69. N 1. P. 176.
6. Wang Z.M., Gao H.M., Fu X.T., Wang W.H. // Zhong. Yao Za Zhi. 2006. Vol. 31. N 23. P. 1925.
7. Wang C.Q., Jia X.H., Zhu S., Komatsu K., Wang X., Cai S.Q. // Talanta. 2015. Vol. 134. P. 587.
8. Yan L., Wei X., Ji T., Hong L.C., Yan Y.S., Guo Z.G., Bin H. // J. Chem. Pharm. Res. 2014. Vol. 6. N 8. P. 347.
9. Stavrianiidi A., Rodin I., Braun A., Stekolshchikova E., Shpigun O. // Biomed. Chrom. 2015. Vol. 29. N 6. P. 853.

Поступила в редакцию 12.09.16

**QUANTITATIVE ANALYSIS OF MULTICOMPONENT SYSTEM
FOR LIQUID CHROMATOGRAPHY MASS SPECTROMETRY
DETERMINATION OF DIOSGENIN, DIOSцин AND PROTODIOSцин IN
PLANT EXTRACTS OF *TRIBULUS TERRESTRIS***

A.N. Stavrianiidi*, E.A. Stekolshchikova, P.N. Turova, I.A. Rodin, O.A. Shpigun

(Division of Analytical Chemistry; *e-mail: stavrianiidi.andrey@gmail.com)

An approach of simultaneous detection of dioscin, diosgenin and protodioscin in extracts from plant material was developed on the basis of liquid chromatography/mass spectrometry (limits of detection were in the range from 5 to 20 ng/ml). Analysis of extracts was carried out using a reversed-phase chromatography with C18 sorbent followed by electrospray ionization in positive ion mode and tandem mass-spectrometric detection in positive multiple ion monitoring mode. For quantification peak areas in extracted ion chromatograms were used in external calibration and quantitative analysis of multicomponent system approaches. It was shown that difference in the results was lower than 10 %. The proposed approach was tested during the analysis of ethanolic infusion and water-methanolic extract from the aerial parts of plant *Tribulus terrestris*.

Key words: high performance liquid chromatography/mass spectrometry, electrospray ionization, extraction, vegetable raw materials, *Tribulus terrestris*, saponins.

Сведения об авторах: Ставрианиди Андрей Николаевич – науч. сотр. кафедры аналитической химии химического факультета МГУ, канд. хим. наук (stavrianiidi.andrey@gmail.com); Стекольщикова Елена Алексеевна – аспирант кафедры аналитической химии химического факультета МГУ (stekolschikova_elena@mail.ru); Турова Полина Николаевна – студент кафедры аналитической химии химического факультета МГУ (turova.polina@gmail.com); Родин Игорь Александрович – ст. науч. сотр. кафедры аналитической химии химического факультета МГУ, канд. хим. наук (igorrodin@yandex.ru); Шпигун Олег Алексеевич – профессор кафедры аналитической химии химического факультета МГУ, докт. хим. наук, член-корр. РАН (shpiguno@yandex.ru).