

## Низкомолекулярные соединения

УДК 543.544.5.068.7:543.645.2+547.926

# МЕТОДИКА БЫСТРОГО АНАЛИЗА 20-ГИДРОКСИЭКДИЗОНА В РАСТЕНИЯХ И ПАПОРОТНИКАХ С ПРИМЕНЕНИЕМ ТВЕРДОФАЗНОЙ ЭКСТРАКЦИИ НА ПОЛИАМИДЕ И МИКРОКОЛОНОЧНОЙ ВЭЖХ-УФ

© Д.Н. Оленников\*, Н.И. Кащенко

Институт общей и экспериментальной биологии СО РАН, ул. Сахьяновой, 6,  
Улан-Удэ, 670047 (Россия), e-mail: olennikovdn@mail.ru

Разработана методика быстрого количественного анализа 20-гидроксиэкдизона методом микроколоночной обращенно-фазовой ВЭЖХ с УФ-детектированием (246 нм) с применением колонки ProntoSIL-120-5-C18 (2×75 мм) и градиентной элюентной системы LiClO<sub>4</sub> / HClO<sub>4</sub>-ацетонитрил. Длительность хроматографического этапа анализа составила 5 мин, что позволило охарактеризовать методику как самую быструю. Для предварительной очистки растительного извлечения была использована твердофазная экстракция на полиамиде, что привело к возрастанию чувствительности анализа. Валидационные исследования показали, что методика характеризовалась удовлетворительными метрологическими показателями. Значения предела детектирования (LOD) и предела количественного определения (LOQ) 20-гидроксиэкдизона составили 3.3 и 10 мкг/мл соответственно. Показатели точности для уровней содержания 20-гидроксиэкдизона 80–120% не превышали 98.57–101.38%. Методика была применена для анализа 20-гидроксиэкдизона цветковых растений и папоротников, произрастающих на территории Республики Бурятия. Присутствие 20-гидроксиэкдизона было установлено в 22 видах, включая 18 цветковых растений и 4 папоротника. Уровни концентрации 20-гидроксиэкдизона в растениях варьировали от следовых (*Athyrium filix-femina*, *Diplazium sibiricum*, *Pteridium aquilinum*) до очень высоких (25,40 мг/г в *Rhaponticum uniflorum* и 25.87 мг/г в *Silene jenseensis*). Впервые присутствие 20-гидроксиэкдизона было выявлено в трех видах, в том числе в *Gastrolychnis gracilis*, *G. saxatilis* и *Silene violascens*. Разработанная методика является быстрой, простой, чувствительной и стабильной и может быть рекомендована для поиска новых растительных источников 20-гидроксиэкдизона.

**Ключевые слова:** экидстероиды, 20-гидроксиэкдизон, количественный анализ, твердофазная экстракция, микроколоночная хроматография, ВЭЖХ, флора Бурятии.

**Используемые сокращения:** 20E – 20-гидроксиэкдизон, LOD – предел детектирования, LOQ – предел количественного определения, RSD – относительное стандартное отклонение, SD – стандартное отклонение.

*Исследование выполнено при поддержке ФАНО в рамках научного проекта № 0337-2016-0006.*

## Введение

Экидстероиды занимают отдельное место среди низкомолекулярных метаболитов растений, являясь структурными аналогами гормонов линьки и метаморфоза насекомых [1]. Экидстероиды по химической природе принадлежат к полиоксистероидам с гидроксильными группами в стероидном ядре и боковой цепи [2]. Данный класс соединений обладает рядом биологических свойств, таких как анаболическое, гипогликемическое, гипохолестеринемическое и другими [3, 4]. Многочисленные клинические исследования экидстероидов в восстановительной спортивной медицине, при астенических и астенодепрессивных состояниях, при лечении инфекционных заболеваний, неврозов и гипотонии подтвердили их высокую эффек-

тивность [5, 6]. В целом, лекарственное растительное сырье, содержащее экидстероиды, может быть отнесено к фитоадаптогенам – препаратам, которые усиливают адаптацию человека к физической нагрузке и другим стрессовым факторам, связанным с напряжением физиологических функций. Растительные адаптогены могут с успе-

---

Оленников Даниил Николаевич – ведущий научный сотрудник лаборатории медико-биологических исследований, доктор фармацевтических наук, тел. / факс: +73012434743, e-mail: olennikovdn@mail.ru  
Кащенко Нина Игоревна – научный сотрудник лаборатории медико-биологических исследований, кандидат фармацевтических наук, тел. / факс: +73012434743, e-mail: ninkk@mail

\* Автор, с которым следует вести переписку.

хом использоваться в качестве лечебных и профилактических средств представителями многих профессий: шахтерами, геологами, полярниками, теми, чья трудовая деятельность связана с экстремальными физическими нагрузками и большим физическим напряжением [7]. Кроме того, сложившаяся за последние годы напряженная обстановка в российском спорте, связанная с обвинениями в адрес атлетов в приеме запрещенных препаратов, располагает к поиску новых эффективных средств, которые бы применялись спортсменами для восстановления физиологических функций организма в период интенсивных тренировок, но, в отличие от допингов, не выключали бы регуляторные функции нервной системы. Таким образом, поиск экидистероидсодержащих растений как сырья для получения новых адаптогенных лекарственных препаратов, тонирующих пищевых добавок и косметических композиций представляет большой интерес. Для детектирования экидистероидов в лекарственном растительном сырье и последующей количественной оценке их содержания необходимо использование разнообразных аналитических методик.

К настоящему времени в экспериментальной науке накоплен определенный объем научной информации о методах количественного анализа растительного сырья, содержащего экидистероиды. Согласно данным наукометрического исследования баз данных Scopus ([www.scopus.com](http://www.scopus.com)), WOS ([apps.webofknowledge.com](http://apps.webofknowledge.com)) и eLIBRARY ([elibrary.ru](http://elibrary.ru)), количество статей, относящихся к количественным методам хроматографического анализа экидистероидов, и, в частности, 20-гидроксиэкидизона как маркерного растительного экидистероида за период 1979–2017 гг., составило более 800 единиц. Метод высокоэффективной жидкостной хроматографии является наиболее часто применяемым вместе с детекторами диодноматричного и ультрафиолетового типов. В таблице 1 приведены некоторые наиболее часто используемые условия хроматографического разделения экидистероидов. Длительность анализа в известных методиках варьировала от 15 до 77 мин. Для рутинной работы, которая подразумевает быстрый анализ большого количества растительных видов, длительность анализа более 15 мин нежелательна, что указывает на необходимость разработки экспресс-метода количественного определения. Разделение основных компонентов растительных видов чаще всего осуществлялось на обращенно-фазовых сорбентах, таких как Alltima C18, Ascentis C18, Cogent Bidentate C8, Diamonsil C18, Diasorb 130-C16-T, Hypersil, Kromasil C18, Lichrospher 100RP-18e, Microsorb-MV C18, Nucleosil C18, Perfect Sil ODS-3, Luna C18, Spherclone ODS2, ProntoSIL-120-5-C18, Spherisorb 5 ODS2 C18, Synergi Polar-RP, Spherisorb ODS-2, Symmetry C18, Zorbax и Eclipse. Значительно реже использовались нормально-фазовые (Kromasil, Zorbax SIL) и диольные (Apex II diol) сорбенты.

Таблица 1. Хроматографические условия анализа 20-гидроксиэкидизона с применением ВЭЖХ с диодноматричным и ультрафиолетовым детектированием

Время анализа, мин	Колонка	Мобильная фаза*	Литература
1	2	3	4
15	Microsorb-MV C18 (150×4.6 мм×5 мкм)	H <sub>2</sub> O pH 3.7 (A), MeCN – MeOH (1 : 1) (B)	[8]
15	ProntoSIL-120-5-C18 (60×1 мм×1 мкм)	4.1 M LiClO <sub>4</sub> – 0.1 M HClO <sub>4</sub> (5 : 95) (A), MeCN (B)	[9]
15	Ascentis C18 (100×2.1 мм×3 мкм)	H <sub>2</sub> O (A), MeCN (B)	[10]
15	Cogent Bidentate C8 (150×2.1 мм×4 мкм)	0.01% HCOOH (A), MeCN (B)	[11]
18	Hypersil ODS (250×4.0 мм×5 мкм)	H <sub>2</sub> O (A), MeCN (B)	[12]
20	Lichrospher 100RP-18e (250×4.6 мм×5 мкм)	0.01% TFA (A), MeCN	[13]
20	Apex II diol (150×4.6 мм×5 мкм)	MeOH (A), CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> (B)	[14]
20	Waters Spherisorb ODS-2 (250×4.6 мм×5 мкм)	H <sub>2</sub> O (A), MeCN (B)	[15]
20	Zorbax Eclipse XDB C8 (150×4.6 мм×5 мкм)	0.1% TFA (A), MeOH (B)	[16]
20	Zorbax XDB-C8 (50×2.1 мм)	H <sub>2</sub> O (A), MeCN (B)	[16]
21	Phenomenex Luna C18 (250×4.6 мм×5 мкм)	0.05% H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub> (A), MeCN (B)	[17]
25	Phenomenex C18 Spherclone ODS2 (150 × 4.6 мм × 5 мкм); Phenomenex C6 Spherclone (150 × 4.6 мм × 5 мкм)	H <sub>2</sub> O (A), MeOH (B)	[14]
25	Zorbax SIL (250×4.6 мм×5 мкм)	CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> - <sup>i</sup> PrOH-H <sub>2</sub> O	[18]
25	Zorbax-ODS, Zorbax SB-C18 (250×4.6 мм × 5 мкм)	H <sub>2</sub> O (A), MeCN (B)	[19]
30	Waters Symmetry C18 (150×3.9 мм×5 мкм)	D <sub>2</sub> O (A), MeCN-d <sub>3</sub> (B)	[19]
35	Zorbax SB-C18 (150×4.6 мм×5 мкм)	H <sub>2</sub> O (A), <sup>i</sup> PrOH (B)	[20]
40	Spherisorb 5 ODS2 C18; C6 (150×4.6 мм×5 мкм)	H <sub>2</sub> O (A), MeOH (B)	[21]
40	Spherisorb ODS2 (150-250×4.6 мм×5 мкм)	MeCN– <sup>i</sup> PrOH – H <sub>2</sub> O	[22]
40	Zorbax SIL (250×4.6 мм×5 мкм)	C <sub>6</sub> H <sub>12</sub> – <sup>i</sup> PrOH – H <sub>2</sub> O	[22]
40	Zorbax TMS (250×4.6 мм×5 мкм)	0.1% TFA (A), MeCN – <sup>i</sup> PrOH (B)	[23]

Окончание таблицы 1

1	2	3	4
40	Diasorb 130-C16-T (80×2 мм×6 мкм)	H <sub>2</sub> O– EtOH – BuOH	[24]
40	ProntoSIL-120-5-C18AQ (75×2 мм×5 мкм)	0.2 M LiClO <sub>4</sub> /0.006 M HClO <sub>4</sub> (A), MeCN (B)	[25]
40	ProntoSIL-120-5-C18AQ (75×2 мм×5 мкм)	0.6 M LiClO <sub>4</sub> /0.009 M HClO <sub>4</sub> (A), MeCN (B)	[26]
40	Kromasil (250×4.6 мм×3.5 мкм)	CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> - <sup>i</sup> PrOH–H <sub>2</sub> O	[23]
40	Zorbax SIL (250×4.6 мм×5 мкм)	C <sub>6</sub> H <sub>12</sub> - <sup>i</sup> PrOH–H <sub>2</sub> O	[23]
45	Zorbax SB-C18 (150×4.6 мм×5 мкм)	0.1% H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub> (A), MeOH (B)	[27]
45	Zorbax Eclipse XDB-C18 (150×3 мм×3.5 мкм)	H <sub>2</sub> O (A), MeCN (B)	[28, 29]
45	Synergi Polar-RP (150×4.6 мм×4 мкм)	0.05% HCOOH (A), 0.05% HCOOH/MeCN (B)	[30]
45	Kromasil (250×4.6 мм×3.5 мкм)	CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> – <sup>i</sup> PrOH – H <sub>2</sub> O; C <sub>6</sub> H <sub>12</sub> – <sup>i</sup> PrOH – H <sub>2</sub> O;	[31]
45	Spherisorb 5ODS2 (250×4.6 мм×5 мкм)	H <sub>2</sub> O (A), MeOH (B); 0.1% TFA (A), MeCN/ <sup>i</sup> PrOH (B)	[31]
50	Alltima C18 (250×4.6 мм×5 мкм)	0.2% HCOOH – 0.2% <sup>i</sup> PrOH (A), MeCN (B)	[32]
50	Diamonsil C18 (250×4.6 мм×5 мкм)	0.2% HCOOH – 20 mM CH <sub>3</sub> COONH <sub>4</sub> -H <sub>2</sub> O (A), MeOH/MeCN (1:1) (B)	[33]
50	Hypersil HIRPB C18 (100×4.6 мм×5 мкм), Hypersil H5BDS-C18 (250×4.6 мм×5 мкм)	D <sub>2</sub> O (A), MeCN (B)	[34]
60	Zorbax SIL (150×4.6 мм×5 мкм)	C <sub>6</sub> H <sub>12</sub> – <sup>i</sup> PrOH – H <sub>2</sub> O	[35]
60	Kromasil C 18 (250×4.6 мм×5 мкм)	MeCN – H <sub>2</sub> O – H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub>	[36]
60	Perfect Sil ODS-3 (250×4.6 мм×5 мкм)	0.1% TFA (A), MeCN/ <sup>i</sup> PrOH (B)	[37]
77	Nucleosil C18 (250×4.6 мм×5 мкм)	H <sub>2</sub> O (A), MeOH (B)	[38]

\* Сокращения: BuOH – бутанол, C<sub>6</sub>H<sub>12</sub> – циклогексан, EtOH – этанол, MeCN – ацетонитрил, MeOH – метанол, <sup>i</sup>PrOH – изопропанол, TFA – трифторуксусная кислота.

Показатель длины хроматографических колонок также варьировал – от колонок обычной длины (250 мм) до микроколонок (60 мм). Следует отметить приоритет использования последних в фармацевтическом анализе, так как метод микроколоночной ВЭЖХ имеет ряд преимуществ, таких как экспрессность, экономичность, удовлетворительные метрологические показатели, а также экологичность анализа. В качестве элюентов применялись смеси спиртов (метанол, изопропанол), ацетонитрила, дихлорэтана, циклогексана, воды, солей (ацетат аммония, перхлорат лития), а также растворы кислот (муравьиная, уксусная, трифторуксусная, ортофосфорная).

Таким образом, создание методики быстрого анализа ( $\leq 5$  мин) 20-гидроксиэкдизона (20E) с использованием метода микроколоночной хроматографии является актуальной задачей аналитической химии. Наиболее востребованным приложением данной методики может считаться фитохимический скрининг растительных объектов с целью поиска новых источников 20E. Подобные исследования были ранее осуществлены для изучения флоры Европейского Северо-Востока России [7], Алтая [39, 40] и Монголии [35]. Встречаемость экдистероидов в растениях Байкальского региона ранее не изучалась. Учитывая перспективность подобных исследований для теоретической и практической науки, в рамках настоящей работы нами была разработана методика быстрого анализа 20E методом микроколоночной хроматографии и проведен анализ 371 вида растений из флоры Республики Бурятия.

### Экспериментальная часть

*Растительное сырье.* Образцы цветковых растений и папоротников были собраны в различных районах Республики Бурятия в 2010–2017 гг. Видовая принадлежность определена д.фарм.н. Т.А. Асеевой (ИОЭБ СО РАН). Сырье высушивали воздушно-теневым способом до значений влажности  $\leq 5\%$ . Ботаническая номенклатура видов приведена в соответствии с рекомендациями The Plant List\*.

*Условия анализа 20-гидроксиэкдизона (20E) методом микроколоночной ВЭЖХ-УФ.* Для количественного анализа 20E в образцах цветковых растений и папоротников использовали следующие условия: микроколоночный жидкостный хроматограф «Милихром А-02» (Эконова, Новосибирск, Россия); колонка

\* The Plant List (2013). Version 1.1. Published on the Internet; <http://www.theplantlist.org/> (accessed 1st January).

ProntoSIL-120-5-C18 AQ ( $2 \times 75$  мм,  $\varnothing$  5 мкм; Metrohm AG, Herisau, Switzerland); подвижная фаза: 0.2 М LiClO<sub>4</sub> в 0.006 М HClO<sub>4</sub> (А), MeCN (В); градиентный режим элюирования; условия градиента (% В): 0–3.3 мин 12–35. 3.3–5 мин 35–70;  $v$  450 мкл/мин; температура колонки 35 °С; УФ-детектор,  $\lambda$  246 нм.

*Приготовление стандартного раствора 20Е (1000 мкг/мл).* Точную навеску 20Е (10 мг) предварительно высушенного 20Е переносили в мерную колбу вместимостью 10 мл, растворяли в 70% этаноле и доводили объем раствора до метки тем же растворителем.

*Валидационный анализ.* Для построения градуировочного графика серию разведений 20Е (10–1000 мкг/мл) хроматографировали в описанных выше условиях трижды для каждой концентрации вещества. По полученным данным проводили построение градуировочного графика в координатах «концентрация, мкг/мл – площадь пика» и определяли вид уравнения линейной регрессии ( $Y = a \times X + b$ ), значения коэффициента детерминации ( $r^2$ ) и стандартного отклонения ( $S_{YX}$ ) с применением пакета программ Advanced Grapher ver. 2.2 (Alentum Software, Inc., США). Предел детектирования (LOD) и предел количественного определения (LOQ) определяли по уравнениям:  $LOD = (3.3 \times S_{YX})/a$  и  $LOQ = (10 \times S_{YX})/a$ , где  $S_{YX}$  – стандартное отклонение,  $a$  – коэффициент при  $X$  в уравнении линейной регрессии. Для определения воспроизводимости серию стандартных растворов 20Е (250–1000 мкг/мл) анализировали в 3-кратной повторности. Вариабельность методики определяли в двух вариантах: «день-в-день» (intra-day) и «день-через-день» (inter-day). В первом варианте стандартный раствор 20Е (250 мкг/мл) анализировали в течение одного дня 6-кратно, во втором варианте анализа – стандартный раствор 20Е (250 мкг/мл) анализировали в течение трех последовательных дней 3-кратно. Стабильность методики определяли на одном образце листьев *Rhaponticum uniflorum*, анализируя его через 2, 4, 8, 12, 24 и 72 ч после первого анализа. Показатель точности методики выявляли на двух образцах экстрактов – 20Е-содержащем (листья *Rhaponticum uniflorum*) и 20Е-не содержащем (листья *Arctium tomentosum*), с введением в навеску растительного сырья чистого 20Е в количестве 80–120% от исходного содержания, с последующими экстракцией и анализом. В качестве показателя эффективности методики при определении вариабельности, воспроизводимости, стабильности и точности использовали величину относительного стандартного отклонения (RSD), рассчитанную как  $RSD = (100 \times S_{xi})/x_{cp}$ , где  $S_{xi}$  – стандартное отклонение  $x_i$ ;  $x_{cp}$  – среднее значение  $x$ .

*Пробоподготовка растительных образцов.* Точную навеску измельченного растительного сырья (300–500 мг) помещали в емкость для экстракции (5 мл) с завинчивающейся крышкой, приливали 2 мл 70% этанола, закрывали крышку и экстрагировали в ультразвуковой ванне (100 Вт, 35 кГц) при 50 °С в течение 40 мин. Полученную пробу центрифугировали при 3000 g в течение 15 мин и супернатант переносили в мерную колбу вместимостью 5 мл. Экстракцию повторяли в тех же условиях еще раз. Объем объединенного экстракта доводили до метки 70% этанолом (раствор А). 3 мл раствора А переносили в мерную колбу вместимостью 10 мл и доводили объем раствора до метки водой (раствор В). Далее 5 мл раствора В наносили на полиамидный патрон, предварительно прекондиционированный 20 мл 95% этанола и 30 мл воды, и элюировали водой в мерную колбу вместимостью 10 мл, которую доводили до метки водой (раствор В). После этого раствор В фильтровали через PTFE фильтр (0.22- $\mu$ m) и использовали для анализа методом ВЭЖХ без предварительного разбавления. Все анализы осуществляли в трехкратной повторности и результаты представлены в виде среднего значения (мг/г)  $\pm$  стандартное отклонение (SD).

### Обсуждение результатов

*Оптимизация условий хроматографического анализа 20-гидроксиэкдизона (20Е) методом микроколоночной ВЭЖХ-УФ.* В ходе выбора хроматографических условий анализа 20Е методом микроколоночной ВЭЖХ нами были использованы некоторые хроматографические колонки, заполненные обращено-фазовым сорбентом (Kromasil 100-5-C<sub>18</sub>, LiChrosorb RP18 5  $\mu$ m, Nucleosil-5-C<sub>18</sub>, Silasorb C<sub>18</sub> (LC) 5  $\mu$ m, ProntoSil 120-5-C<sub>18</sub>-AQ), а так же различные комбинации подвижных фаз, содержащих ацетонитрил, метанол и воду с добавлением органических и неорганических кислот и солей. В качестве дополнительных условий выбора варьировались температура колонки (30–60 °С) и скорость подвижной фазы (50–600 мкл/мин). В результате было установлено, что применение градиентного режима элюирования в системе ацетонитрил / LiClO<sub>4</sub> / HClO<sub>4</sub> на колонке ProntoSil 120-5-C<sub>18</sub>-AQ при температуре 35 °С и скорости подвижной фазы 450 мкл/мин позволяет добиться оптимальной формы хроматографического пика 20Е по показателям высоты и симметрии (0.99–1.01) при общем времени хроматографической процедуры 5 мин (рис. 1).

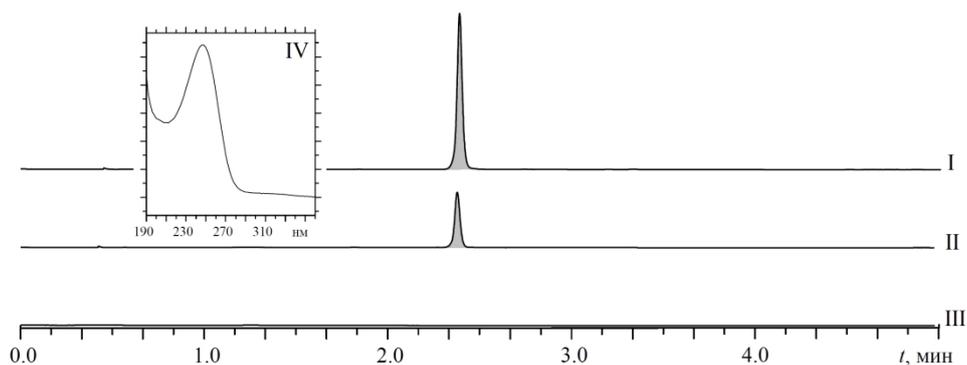


Рис. 1. Хроматограммы растворов 20-гидроксиэкдизона (20E) с концентрациями 1000 мкг/мл (I), 250 мкг/мл (II) и 0 мкг/мл (III). На IV – спектр поглощения 20E

Спектр поглощения 20E содержит единственный максимум поглощения в УФ-области спектра, находящийся при 246 нм, который был использован в качестве рабочей длины волны. Величины спектральных отношений ( $S_\lambda / S_{210}$ ) для растворов с различной концентрацией 20E характеризовались наименьшей вариабельностью около экстремума спектра поглощения (95.4–99.5%) и области коротких длин волн (92.3–98.7%) (табл. 2).

*Валидация метода.* Регрессионный анализ градуировочного графика 20E показал, что он линеен ( $r^2 = 0.9999$ ) в области концентраций от 10 до 1000 мкг/мл, которые составили рабочий диапазон методики (табл. 3). Величины предела детектирования (LOD) и предела количественного определения (LOQ) составили 3.3 и 10 мкг/мл соответственно. Разработанная методика демонстрировала хорошие показатели воспроизводимости (RSD < 1.0%), вариабельности (RSD < 0.8%) и стабильности (RSD < 1.0%).

*Оптимизация условий экстракции 20E из растительного сырья.* Различные методы экстракции (водяная баня, ультразвуковая, микроволновая), типы растворителей (вода, этанол, метанол, ацетон, ДМСО), температура (20–100 °C) и длительность экстракции (5–90 мин) были использованы для выбора лучших условий экстракции. По результатам проведенных исследований было показано, что применение 70% этанола в сочетании с ультразвуковой экстракцией при 45–50 °C в течение 30–40 мин позволяет извлечь наибольшее количество целевого соединения из растительной матрицы.

Таблица 2. Хроматографические и спектральные параметры 20-гидроксиэкдизона

с, мкг/мл	$t_R$ , мин	$\lambda_{max}$ , нм	Спектральные отношения $S_\lambda / S_{210}$ (% от соответствующего значения для образца 1000 мкг/мл)						
			$\lambda$						
			220	230	240	250	260	270	280
1000	2.43±0.03	246	1.237	1.760	2.464	2.711	1.939	0.742	0.129
250	2.40±0.02	246	1.219 (98.5)	1.735 (98.4)	2.432 (98.7)	2.687 (99.1)	1.930 (99.5)	0.747 (100.0)	0.126 (97.7)
10	2.42±0.01	246	1.142 (92.3)	1.631 (92.7)	2.325 (94.4)	2.608 (96.2)	1.850 (95.4)	0.668 (90.0)	0.075 (58.1)

Таблица 3. Валидационные параметры методики количественного определения 20-гидроксиэкдизона методом микроколоночной ВЭЖХ-УФ

Показатель	Значение
Уравнение регрессии	$Y = 0.025 \times X + 0.018^*$
Коэффициент детерминации ( $r^2$ )	0.9999
Стандартное отклонение ( $S_{YX}$ )	$2.56 \cdot 10^{-2}$
Предел детектирования (LOD), мкг/мл	3.3
Предел количественного определения (LOQ), мкг/мл	10
Рабочий диапазон, мкг/мл	10–1000
Воспроизводимость, % ( $n = 15$ )	0.94
Вариабельность «день-в-день», % ( $n = 6$ )	0.52
Вариабельность «день-через-день», % ( $n = 9$ )	0.71
Стабильность, % ( $n = 7$ )	0.82

\* X – концентрация, мкг/мл; Y – площадь пика.

Для устранения мешающего влияния посторонних соединений на ход хроматографической процедуры к растительному экстракту была применена процедура твердофазной экстракции. В качестве неподвижной фазы был выбран полиамид, который при высокой скорости элюции отличается малым сродством к экистероидам в противоположность большинству УФ-поглощающих фенольных соединений, связывающихся с данным сорбентом. На примере экстракта *Rhaponticum uniflorum* было показано, что необработанный экстракт листьев содержал комплекс УФ-активных соединений с близкими к 20Е временами удерживания (рис. 2-I). Несмотря на детектируемый уровень концентрации 20Е в экстракте, осуществление количественного анализа было невозможно по причине ко-элюции 20Е и других соединений.

После нанесения растительного экстракта на полиамидный патрон и последующей элюции водой происходило почти количественное (97.6–98.7% от исходного) удаление 20Е и близких соединений с сорбента. Эта способность твердофазного носителя к быстрой десорбции 20Е повлияла на качество получаемых хроматограмм, которые содержали хорошо разрешенные пики 20Е и других экистероидов (рис. 2-II). Сопутствующие компоненты нестероидной природы элюировались с полиамида этанолом (рис. 2-III) или раствором аммиака (рис. 2-IV).

Согласно данным по определению точности методики уровень определения 20Е составил 98.57–101.38% для растительного образца, содержащего 20Е, и 97.92–100.33% для образца без 20Е (табл. 4). Данные результаты позволяют охарактеризовать методику как точную.

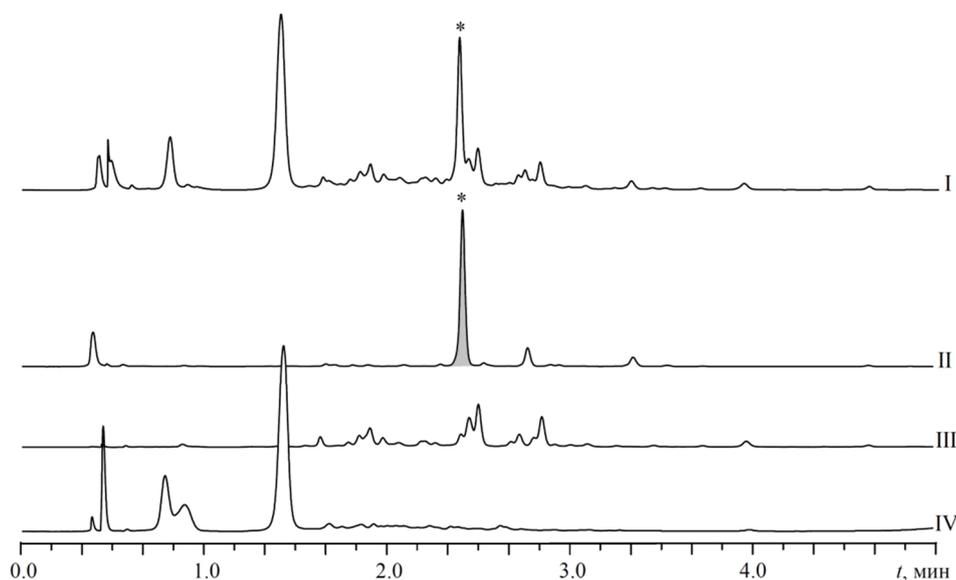


Рис. 2. Хроматограммы (МК-ВЭЖХ-УФ) экстракта листьев *Rhaponticum uniflorum* до (I) и после твердофазной экстракции на полиамиде (II – элюент вода, III – элюент 96% этанол, IV – элюент 0.5% аммиак в 96% этаноле). Положение 20Е обозначено звездочкой (\*)

Таблица 4. Результаты определения точности количественного определения 20-гидроксиэкидизона (20Е) методом микроколоночной ВЭЖХ-УФ

Показатель	Уровень				
	80%	90%	100%	110%	120%
20Е-содержащий образец					
20Е в образце, мг в 1 г	10.14	10.14	10.14	10.14	10.14
Введено 20Е, мг в 1 г	8.11	9.13	10.14	11.15	12.17
Должно быть 20Е, мг в 1 г	18.25	19.27	20.28	21.29	22.31
Найдено 20Е, мг в 1 г	17.99	19.14	20.56	21.38	22.23
Точность, %	98.57	99.33	101.38	100.42	99.64
20Е-не содержащий образец					
20Е в образце, мг в 1 г	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
Введено 20Е, мг в 1 г	8.11	9.13	10.14	11.15	12.17
Должно быть 20Е, мг в 1 г	8.11	9.13	10.14	11.15	12.17
Найдено 20Е, мг в 1 г	7.96	8.94	9.97	11.08	12.21
Точность, %	98.15	97.92	98.32	99.37	100.33

Содержание 20Е в растениях из флоры Республики Бурятия. Разработанная методика была применена для анализа растительных видов, произрастающих на территории Республики Бурятия (табл. 5). Всего анализу было подвергнуто 359 видов цветковых растений и 12 видов папоротников. Подобное исследование флоры Байкальского региона на присутствие 20Е было осуществлено нами впервые. Для анализа цветковых растений были использованы образцы листьев, собранных в фазу бутонизации – начала цветения, а у папоротников – молодые раскрывающиеся вайи.

В результате проведенных исследований присутствие 20Е было выявлено в 22 видах, в том числе в 18 цветковых растениях и 4 папоротниках (6% от общего числа видов). Ранее наличие данного соединения было установлено в некоторых видах, включая *Rhaponticum carthamoides*, *R. uniflorum* [41], *Serratula centauroides* [42,43], *S. coronata* [44], *S. marginata* [39], *Gastrolychnis brachypetala* [40], *G. tristis* [45], *Silene chamarensis* [35], *S. chlorantha* [46], *S. jenseensis* [25], *S. nutans* [47], *S. repens* [35], *S. samojedorum* [48], *S. uralensis* subsp. *apetala* [35], *Ajuga reptans* [49], *Athyrium filix-femina*, *Diplazium sibiricum*, *Pteridium aquilinum* и *Polypodium vulgare* [50]. Впервые присутствие 20Е выявлено в *Gastrolychnis gracilis*, *G. saxatilis* и *Silene violascens*. Согласно данным количественного анализа установленные 20Е-содержащие виды – это растения с умеренным (0.01-0.10 мг/г), высоким (0.10-1.00 мг/г) и очень высоким (>10 мг/г) содержанием 20Е. Наибольшая концентрация 20Е была отмечена в листьях *Silene jenseensis* (25.87 мг/г), *Rhaponticum uniflorum* (25.40 мг/г), *R. carthamoides* (14.10 мг/г), *Serratula coronata* (12.27 мг/г), *Silene chlorantha* (11.06 мг/г) и *Serratula centauroides* (10.14 мг/г).

Таблица 5. Содержание 20-гидроксиэкдизона (20Е) в листьях некоторых видов цветковых растений (Magnoliophyta) и молодых вайях папоротников (Polypodiophyta)

Вид	20Е, мг/г ± SD*
Magnoliophyta	
Семейство Asteraceae	
<i>Rhaponticum carthamoides</i> (Willd.) Iljin	14.10±0.28
<i>R. uniflorum</i> (L.) DC.	25.40±0.51
<i>Serratula centauroides</i> L.	10.14±0.21
<i>S. coronata</i> L.	12.27±0.25
<i>S. marginata</i> Tausch.	4.56±0.10
Семейство Caryophyllaceae	
<i>Gastrolychnis brachypetala</i> Tolm. & Kozuh.	1.02±0.02
<i>G. gracilis</i> (Tolm.) Czerep.	2.72±0.05
<i>G. saxatilis</i> Peshkova	1.37±0.02
<i>G. tristis</i> (Bunge) Czerep.	2.16±0.04
<i>Silene aprica</i> Turcz. ( <i>Elisanthe aprica</i> (Turcz. ex Fisch. & C.A.Mey.) Peschkova)	–
<i>S. chamarensis</i> Turcz.	9.02±0.17
<i>S. chlorantha</i> (Willd.) Ehrh.	11.06±0.21
<i>S. jenseensis</i> Willd.	25.87±0.54
<i>S. noctiflora</i> L. ( <i>Elisanthe noctiflora</i> (L.) Rupr.)	–
<i>S. nutans</i> L.	6.35±0.12
<i>S. latifolia</i> Poir. ( <i>Melandrium album</i> (Mill.) Garcke)	–
<i>S. repens</i> Patrin	8.63±0.18
<i>S. samojedorum</i> (Sambuk) Oxelman ( <i>Lychnis sibirica</i> L.)	0.10±0.00
<i>S. uralensis</i> subsp. <i>apetala</i> (L.) Bocquet ( <i>Gastrolychnis apetala</i> (L.) Tolm. & Kozhanch.)	1.16±0.02
<i>S. violascens</i> (Tolm.) V.V.Petrovsky & Elven. ( <i>Gastrolychnis violascens</i> Tolm.)	1.84±0.04
<i>S. vulgaris</i> (Moench) Garcke ( <i>Oberna behen</i> (L.) Ikonn.)	–
Семейство Lamiaceae	
<i>Ajuga reptans</i> L.	0.34±0.00
Polypodiophyta	
Семейство Athyriaceae	
<i>Athyrium filix-femina</i> (L.) Roth	<LOQ
<i>Diplazium sibiricum</i> (Turcz. ex Kunze) Sa. Kurata	<LOQ
Семейство Dennstaedtiaceae	
<i>Pteridium aquilinum</i> (L.) Kuhn	<LOQ
Семейство Polypodiaceae	
<i>Polypodium vulgare</i> L.	0.11±0.00

\* Прочерк «–» означает отсутствие 20Е (концентрация ниже предела детекции, LOD).

Несмотря на ранние сведения о наличии 20Е в отдельных растительных видах, нам не удалось подтвердить эти данные для следующих видов: Asteraceae – *Saussurea controversa*, *S. davurica*, *S. salicifolia* [51]; Boraginaceae – *Buglossoides arvensis* [52]; Butomaceae – *Butomus umbellatus* [53]; Ceratophyllaceae – *Ceratophyllum demersum* [54], Caryophyllaceae: *Sagina procumbens*, *Spergula arvensis* [53], *Silene aprica* [39]; Chenopodiaceae – *Axyris amaranthoides* [54], *Chenopodium album* [55], *C. suecicum* [56]; Ranunculaceae – *Anemone altaica*, *A. sylvestris* [57], *Pulsatilla ambigua* [58], *Thalictrum minus* [53].

В результате проведенных исследований было установлено, что разработанная методика позволяет осуществлять быстрый количественный анализ 20Е в растительных образцах. В предложенной методике впервые объединены преимущества твердофазной экстракции и микроколоночной ВЭЖХ-УФ для анализа 20Е в растениях, что позволяет рекомендовать ее для широкого применения в исследовании экдистероид-содержащих растительных видов.

### Выводы

1. Разработана методика количественного анализа 20-гидроксиэкдизона (20Е), представляющая собой комбинацию твердофазной экстракции на полиамиде и микроколоночной высокоэффективной хроматографии с УФ-детектированием, которая отличается от известных методик экспрессностью этапа хроматографического разделения (5 мин), чувствительностью и точностью.

2. С применением разработанной методики были успешно проанализированы растения из флоры Республики Бурятия и установлено присутствие 20Е в 22 видах, в том числе впервые присутствие данного соединения было показано в *Gastrolychnis gracilis*, *G. saxatilis* и *Silene violascens*.

### Список литературы

1. Abubakirov N.K. Ecdysteroids of flowering plants (Angiospermae) // Chem. Nat. Comp. 1981. Vol. 17. Pp. 489–503. DOI: 10.1007/BF00574363.
2. Baltaev U.A. Phytoecdysteroids: Structure, sources, and biosynthesis in plants // Russ. J. Bioorg. Chem. 2000. Vol. 26. Pp. 799–831.
3. Lafont R., Dinan L. Practical uses for ecdysteroids in mammals including humans: an update // J. Insect Sci. 2003. Vol. 3. Pp. 1–30.
4. Parr M.K., Botrè F., Naß A., Hengevoss J., Diel P., Wolber G. Ecdysteroids: A novel class of anabolic agents? // Biol. Sport. 2015. Vol. 32. Pp. 169–173. DOI: 10.5604/20831862.1144420.
5. Volodin V.V., Sidorova Iu.S., Mazo V.K. 20-Hydroxyecdysone-plant adaptogen: an anabolic effect, possible use in sports nutrition // Vopr. Pitan. 2013. Vol. 82. Pp. 24–30.
6. Hu J., Luo C.X., Chu W.H., Shan Y.A., Qian Z.-M., Zhu G., Yu Y.B., Feng H. 20-Hydroxyecdysone protects against oxidative stress-induced neuronal injury by scavenging free radicals and modulating NF-κB and JNK Pathways // PLoS ONE. 2012. Vol. 7. ID e50764. DOI: 10.1371/journal.pone.0050764.
7. Володин В.В. Фитоэктдистероиды. СПб., 2003. 293 с.
8. Katsarova M., Dimitrova S., Lukanov L., Sadakov F. Determination of phenolic acids, flavonoids, terpenes and ecdysteroids in medicinal plant extracts and food supplements // Cr. Acad. Bulg. Sci. 2017. Vol. 70. Pp. 947–956.
9. Nikolaeva I.G., Tsybiktarova L.P., Garmeva L.L., Nikolaeva G.G., Olennikov D.N., Matkhanov I.E. Determination of ecdysteroids in *Fornicium uniflorum* (L.) and *Serratula centauroides* (L.) raw materials by chromatography-UV spectrophotometry // J. Anal. Chem. 2017. Vol. 72. Pp. 854–861. DOI: 10.1134/S1061934817080093.
10. Новожилова Е.В., Рыбин В.Г., Горовой П.Г., Гавриленко И.Г. Фитоэктдистероиды в надземной части дальневосточных видов Caryophyllaceae // Turczaninowia. 2014. Т. 17. С. 42–48.
11. Stevens J.F., Reed R.L., Morrè J.T. Characterization of phytoecdysteroid glycosides in meadowfoam (*Limnanthes alba*) seed meal by positive and negative ion LC-MS/MS // J. Agric. Food Chem. 2008. Vol. 56. Pp. 3945–3952. DOI: 10.1021/jf800211k.
12. Rybin V., Boltenkov E., Novozhilova E. Application of high-performance liquid chromatography for simultaneous identification of integristerone A, 20-hydroxyecdysone, ecdysone and 2-deoxy-20-hydroxyecdysone // Nat. Prod. Com. 2007. Vol. 2. Pp. 1101–1104.
13. Ghosh D., Laddha K.S. Extraction and monitoring of phytoecdysteroids through HPLC // J. Chromatogr. Sci. 2006. Vol. 44. Pp. 22–26.
14. Lapenna S., Dinan L. HPLC and TLC characterisation of ecdysteroid alkyl ethers // J. Chromatogr. B. 2009. Vol. 877. Pp. 2996–3002. DOI: 10.1016/j.jchromb.2009.07.014.
15. Карусевич А.А., Моисеев Д.В., Бузук Г.Н. Идентификация и количественное определение 20-гидроксиэкдизона в листьях левзеи сафлоровидной методом ВЭЖХ // Вестн. фармац. 2007. Т. 37. С. 1–5.
16. Зибарева Л.Н., Волкова О.В., Морозов С.В., Черняк Е.И. Фитоэктдистероиды корней *Silene frivaldszkyana* hampe // Химия растит. сырья. 2017. №1. С. 71–75. DOI: 10.14258/jcrpm.2017011416.

17. Da Rosa H.S., Salgueiro A.C.F., Colpo A.Z.C., Paula F.R., Mendez A.S.L., Folmer V. *Sida tuberculata* (Malvaceae): A study based on development of extractive system and *in silico* and *in vitro* properties // Braz. J. Med. Biol. Res. 2016. Vol. 49. E5282. DOI: 10.1590/1414-431X20165282.
18. Hunyadi A., Gergely A., Simon A., Tóth G., Veress G., Báthori I. Preparative-scale chromatography of ecdysteroids of *Serratula wolffii* Andrae // J. Chromatogr. Sci. 2007. Vol. 45. Pp. 76–86.
19. Wilson I.D., Morgan E.D., Lafont R., Shockcor J.P., Lindon J.C., Nicholson J.K., Wright B. High performance liquid chromatography coupled to nuclear magnetic resonance spectroscopy and mass spectrometry applied to plant products: Identification of ecdysteroids from *Silene otitis* // Chromatographia 1999. Vol. 49. Pp. 374–378. DOI: 10.1007/BF02467609.
20. Альмагамбетов А.М., Тулеуов Б.И., Адекенов С.М. Количественное определение 20-гидроксиэкдизона в растении *Acanthophyllum borszczowii* Litv. (колючелистник Борщова) // Биологические особенности лекарственных и ароматических растений и их роль в медицине: сборник научных трудов Международной научно-практической конференции, посвященной 85-летию ВИЛАР. 2016. С. 444–446.
21. Meng Y., Whiting P., Zibareva L., Bertho G., Girault J.-P., Lafont R., Dinan L. Identification and quantitative analysis of the phytoecdysteroids in *Silene* species (Caryophyllaceae) by high-performance liquid chromatography. Novel ecdysteroids from *S. pseudotites*. // J. Chromatogr. A. 2001. Vol. 935. Pp. 309–319. DOI: 10.1016/S0021-9673(01)00893-7.
22. Reixach N., Lafont R., Camps F., Casa J. Biotransformations of putative phytoecdysteroid biosynthetic precursors in tissue cultures of *Polypodium vulgare* // Eur. J. Biochem. 1999. Vol. 266. Pp. 608–615. DOI: 10.1046/j.1432-1327.1999.00905.x.
23. Ho R., Girault J.-P., Cousteau P.-Y., Bianchini J.-P., Raharivelomanana P., Lafont R. Isolation of a new class of ecdysteroid conjugates (glucosyl-ferulates) using a combination of liquid chromatographic methods // J. Chromatogr. Sci. 2008. Vol. 46. Pp. 102–110. DOI: 10.1093/chromsci/46.2.102.
24. Пунегов В.В., Савиновская Н.С. Метод внутреннего стандарта для определения экдистероидов в растительном сырье и лекарственных формах с помощью ВЭЖХ // Растит. ресурсы. 2001. Т. 37. С. 97–102.
25. Olennikov D.N., Kashchenko N.I. Phytoecdysteroids from *Silene jenseensis* // Chem. Nat. Comp. 2017. Vol. 53. Pp. 1199–1201. DOI: 10.1007/s10600-017-2239-1.
26. Цыбиктарова Л.П. Фармакогностическое исследование *Serratula centauroides* L. и разработка лекарственного средства на ее основе, обладающего адаптогенной активностью: дис. ... канд. фарм. наук. Улан-Удэ, 2016. 200 с.
27. Петрук А.А., Высочина Г.И., Ершова Э.А. Динамика содержания астрагалина, изокверцитрина и 20-гидроксиэкдизона в ваях *Pteridium aquilinum* и *Matteuccia struthiopteris*, произрастающих в окрестностях Новосибирска // Химия растит. сырья. 2013. №4. С. 151–157. doi:10.14258/jcprm.1304151.
28. Алиева Н.К., Нигматуллаев А.М., Бобаев И.Д., Тайжанов К., Рамазанов Н.Ш. Распространение и сырьевые запасы *Rhaponticum integrifolium* (Asteraceae) в Узбекистане // Растит. ресурсы. 2014. Т. 50. С. 505–512.
29. Abdukadirov I.T., Yakubova M.R., Nuriddinov Kh.R., Mamatkhanov A.U., Turakhozhaev M.T. Ecdysterone and turkesterone in *Ajuga turkestanica* determined by HPLC // Chem. Nat. Comp. 2005. Vol. 41. Pp. 475–476. DOI: 10.1007/s10600-005-0184-x.
30. Wang Y.-H., Avula B., Jadhav A.N., Smillie T.J., Khan I.A. Structural characterization and identification of ecdysteroids from *Sida rhombifolia* L. in positive electrospray ionization by tandem mass spectrometry // Rapid Commun. Mass Spectrom. 2008. Vol. 22. Pp. 2413–2422. DOI: 10.1002/rcm.3625.
31. Snogan E., Vahirua-Lechat I., Ho R., Bertho G., Girault J.-P., Ortiga S., Maria A., Lafont R. Ecdysteroids from the medicinal fern *Microsorium scolopendria* (Burm. f.) // Phytochem. Anal. 2007. Vol. 18. Pp. 441–450. DOI: 10.1002/pca.1000.
32. Wu J.-J., Cheng K.-W., Wang H., Ye W.-C., Li E.T.S., Wang M. Simultaneous determination of three phytoecdysteroids in the roots of four medicinal plants from the genus *Asparagus* by HPLC // Phytochem. Anal. 2009. Vol. 20. Pp. 58–63. DOI: 10.1002/pca.1097.
33. Shi Q., Yan S., Liang M., Yang Y., Wang Y., Zhang W. Simultaneous determination of eight components in *Radix Tinosporae* by high-performance liquid chromatography coupled with diode array detector and electrospray tandem mass spectrometry // J. Pharm. Biomed. Anal. 2007. Vol. 43. Pp. 994–999. DOI: 10.1016/j.jpba.2006.09.028.
34. Loudon D., Handley A., Taylor S., Lenz E., Miller S., Wilson I.D., Sage A., Lafont R. Spectroscopic characterisation and identification of ecdysteroids using high-performance liquid chromatography combined with on-line UV–diode array, FT-infrared and <sup>1</sup>H-nuclear magnetic resonance spectroscopy and time of flight mass spectrometry // J. Chromatogr. A. 2001. Vol. 910. Pp. 237–246. DOI: 10.1016/S0021-9673(00)01204-8.
35. Munkhzhargal N., Zibareva L.N., Lafont R., Pribytkova L.N., Pisareva S.I. Investigation of ecdysteroid content and composition of *Silene repens* indigenous in Mongolia and introduced into Western Siberia // Russ. J. Bioorg. Chem. 2010. Vol. 36. Pp. 133–138. DOI: 10.1134/S1068162010070216.
36. Дармограй С.В., Ерофеева Н.С., Филиппова А.С., Дубоделова Г.В., Морозова В.А., Дармограй В.Н. К хемотаксономическому изучению некоторых видов растений семейства Гвоздичных (Caryophyllaceae Juss.), принадлежащих к различным его подсемействам // Международн. журн. прикл. фундамент. иссл. 2017. №1. С. 287–290.

37. Эрст А.А., Зибарева Л.Н., Железниченко Т.В., Ковзунова О.В. Культура генетически трансформированных корней (hairy roots) *Silene roemerii* Friv. – источник получения фитоэктистероидов // Вестн. Томского госуд. ун-ва. 2017. №37. С. 17–30.
38. Kayser H., Eilinger P. HPLC method for the analysis of acetonides of ecdysteroids providing structural information on different vicinal diols // Arch. Insect Biochem. Physiol. 1999. Vol. 41. Pp. 162–170. DOI: 10.1002/(SICI)1520-6327(1999)41:3<162::AID-ARCH8>3.0.CO;2-O.
39. Мунхжаргал Н., Зибарева Л.Н., Оюнчимэг Д., Пяк А.И. Поиск эктистероидсодержащих видов во флоре Монголии и Русского Алтая // Вестн. Томск. гос. ун-ва. 2007. № 305. С. 192–196.
40. Ревина Т.А., Ревушкина А.С., Ракитин А.В. Эктистероид содержащие виды из флоры Горного Алтая // Растит. ресурсы. 1988. Т. 34. С. 565–570.
41. Zang X.-P., Zhang J., Dong M., Zhang M.-L., Hun C.-H., Shi Q.-W., Gu Y.-C. Chemical constituents of plants from the genus *Rhaponticum* // Chem. Biodiv. 2010. Vol. 7. Pp. 594–609. DOI: 10.1002/cbdv.200800275.
42. Vorob'eva A.N., Rybin V.G., Zarembo E.V., Boltenkov E.V. Phytoecdysteroids from *Serratula centauroides* // Chem. Nat. Comp. 2005. Vol. 41. Pp. 105–106. DOI: 10.1007/s10600-005-0090-2.
43. Оленников Д.Н., Кащенко Н.И. Фитоэктистероиды родов *Serratula* L. и *Klasea* Cass. (Asteraceae): Хеморазнообразие, методы выделения и анализа // Химия растит. сырья. 2017. № 4. С. 123–135. DOI: 10.14258/jcrpm.2017042016.
44. Volodin V.V., Alexeeva L.I., Kolegova N.A., Sarker S.D., Sik V., Lafont R., Dinan L. Further ecdysteroids from *Serratula coronata* L. (Asteraceae) // Biochem. Syst. Ecol. 1998. Vol. 26. Pp. 459–461. DOI: 10.1016/S0305-1978(97)00130-0.
45. Olennikov D.N. Phytoecdysteroids and flavonoids of *Gastrolychnis tristis* // Chem. Nat. Comp. 2018. Vol. 54. Pp. 104–106.
46. Zibareva L. Distribution and levels of phytoecdysteroids in plants of the genus *Silene* during development // Arch. Insect Biochem. Physiol. 2000. Vol. 43. Pp. 1–8. DOI: 10.1002/(SICI)1520-6327(200001)43:1<1::AID-ARCH1>3.0.CO;2-D.
47. Girault J.-P., Bathori M., Varga E., Szendrei K., Lafont R. Isolation and identification of new ecdysteroids from the Caryophyllaceae // J. Nat. Prod. 1990. Vol. 53. Pp. 279–293. DOI: 10.1021/np50068a002.
48. Novozhilova E., Rybin V., Gorovoy P., Gavrilenko I., Doudkin R. Phytoecdysteroids of East Asian Caryophyllaceae // Pharmacogn. Magazine. 2015. Vol. 11. Pp. 225–230. DOI: 10.4103/0973-1296.157746.
49. Tomás J., Camps F., Claveria E., Coll J., Melé E., Messeguer J. Composition and location of phytoecdysteroids in *Ajuga reptans* in vivo and in vitro cultures // Phytochemistry. 1992. Vol. 31. Pp. 1585–1591. DOI: 10.1016/0031-9422(92)83112-C.
50. Takemoto T., Okuyama T., Jin H., Arai T., Kawahara M., Konno C., Nabetani S., Arihara S., Hikino Y., Hikino H. Isolation of phytoecdysones from Japanese ferns // Chem. Pharm. Bull. 1973. Vol. 21. Pp. 2336–2338. DOI: 10.1248/cpb.21.2336.
51. Avdeeva E., Reshetov Y., Shurupova M., Zibareva L., Borisova E., Belousov M. Chemical analysis of bioactive substances in seven Siberian *Saussurea* species. AIP Conf. Proc. 2017. Vol. 1899. Art. No 050001. DOI: 10.1063/1.5009864.
52. Dinan L., Savchenko T., Whiting P. On the distribution of phytoecdysteroids in plants. Cell. Molec. Life Sci. 2001. Vol. 58. Pp. 1121–1132.
53. Volodin V., Chadin I., Whiting P., Dinan L. Screening plants of European North-East Russia for ecdysteroids // Biochem. Syst. Ecol. 2002. Vol. 30. Pp. 525–578. DOI: 10.1016/S0305-1978(01)00128-4.
54. Dinan L. Distribution and levels of phytoecdysteroids within individual plants of species of the Chenopodiaceae // Eur. J. Entomol. 1995. Vol. 92. Pp. 295–300.
55. DellaGreca M., D'Abrosca B., Fiorentino A., Previtera L., Zarrelli A. Structure elucidation and phytotoxicity of ecdysteroids from *Chenopodium album* // Chem. Biodiv. 2005. Vol. 2. Pp. 457–462. DOI: 10.1002/cbdv.200590025.
56. Dinan L., Whiting P., Scott A.J. Taxonomic distribution of phytoecdysteroids in seeds of members of the Chenopodiaceae // Biochem. Syst. Ecol. 1998. Vol. 26. Pp. 553–576. DOI: 10.1016/S0305-1978(98)00005-2.
57. Savchenko T., Whiting P., Sarker S.D., Dinan L. Analysis of species of the Ranunculaceae for ecdysteroid agonists and antagonists II. Ecdysteroids in the genus *Anemone* // Biochem. Syst. Ecol. 1998. Vol. 26. Pp. 131–134. DOI: 10.1016/S0305-1978(97)00086-0.
58. Sarker S.D., Savchenko T., Whiting P., Šik V., Rees H.H., Dinan L. Analysis of species of the Ranunculaceae for ecdysteroid agonists and antagonists I: Ecdysteroids in the genus *Pulsatilla*. Biochem. Syst. Ecol. 1997. Vol. 25. Pp. 473–474. DOI: 10.1016/S0305-1978(97)00042-2.

Поступило в редакцию 30 декабря 2017 г.

После переработки 4 марта 2018 г.

**Для цитирования:** Оленников Д.Н., Кащенко Н.И. Методика быстрого анализа 20-гидроксиэктизона в растениях и папоротниках с применением твердофазной экстракции на полиамиде и микроколоночной ВЭЖХ-УФ // Химия растительного сырья. 2018. №3. С. 41–52. DOI: 10.14258/jcrpm.2018033639.

Olennikov D.N.\*, Kashchenko N.I. METHOD OF THE RAPID ANALYSIS OF 20-HYDROXYECDYSONE CONTENT IN PLANTS AND FERNS USING SOLID-PHASE EXTRACTION ON POLYAMIDE AND MICROCOLUMN HPLC-UV

*Institute of General and Experimental Biology, Siberian Branch, Russian Academy of Science, 6 Sakh'yanyovoy Street, Ulan-Ude, 670047 (Russia), e-mail: olennikovdn@mail.ru*

A method for the rapid quantitative analysis of 20-hydroxyecdysone in plants was developed using the microcolumn reversed-phase HPLC with UV detection (246 nm) on the ProntoSIL-120-5-C18 column (2×75 mm) and the gradient eluent system LiClO<sub>4</sub>/HClO<sub>4</sub>-acetonitrile. The chromatographic stage of the analysis was 5 minutes long, which made it possible to characterize the technique as the fastest. For preliminary purification of the plant extracts, solid phase extraction on polyamide was used which led to an increase in the sensitivity of the analysis. Validation studies showed that the technique characterized by satisfactory metrological data. The values of the limit of detection (LOD) and the limit of quantification (LOQ) of 20-hydroxyecdysone were 3.3 and 10 µg/ml, respectively. The accuracy indices for various levels of 20-hydroxyecdysone content (80–120%) did not exceed 98.57–101.38%. The method applied to the analysis of 20-hydroxyecdysone in 359 species of flowering plants and 12 ferns species growing on the territory of the Buryatia Republic. The presence of 20-hydroxyecdysone was established in 22 species including 18 flowering plants and 4 ferns. The concentration levels of 20-hydroxyecdysone in plants varied from trace (*Athyrium filix-femina*, *Diplazium sibiricum*, *Pteridium aquilinum*) to very high (25.40 mg/g in *Rhaponticum uniflorum* and 25.87 mg/g in *Silene jenseensis*). The presence of 20-hydroxyecdysone was firstly detected in three species including *Gastrolychnis gracilis*, *G. saxatilis* and *Silene violascens*. The developed technique is fast, simple, sensitive and stable and can be recommended for searching purpose to evaluate the new plant sources of 20-hydroxyecdysone.

*Keywords: ecdysteroids, 20-hydroxyecdysone, quantitative analysis, solid phase extraction, microcolumn chromatography, HPLC, flora of Buryatia.*

### References

1. Abubakirov N.K. *Chem. Nat. Comp.*, 1981, vol. 17, pp. 489–503. DOI: 10.1007/BF00574363.
2. Baltaev U.A. *Russ. J. Bioorg. Chem.*, 2000, vol. 26, pp. 799–831.
3. Lafont R., Dinan L. *J. Insect Sci.*, 2003, vol. 3, pp. 1–30.
4. Parr M.K., Botrè F., Naß A., Hengevoss J., Diel P., Wolber G. *Biol. Sport*, 2015, vol. 32, pp. 169–173. DOI:10.5604/20831862.1144420.
5. Volodin V.V., Sidorova Iu.S., Mazo V.K. *Vopr. Pitan.*, 2013, vol. 82, pp. 24–30. (in Russ.).
6. Hu J., Luo C.X., Chu W.H., Shan Y.A., Qian Z.-M., Zhu G., Yu Y.B., Feng H. *PLoS ONE*, 2012, vol. 7, ID e50764. DOI: 10.1371/journal.pone.0050764.
7. Volodin V.V. *Phytoecdysteroids*. St Petersburg, 2003. 293 p. (in Russ.).
8. Katsarova M., Dimitrova S., Lukanov L., Sadakov F. *Cr. Acad. Bulg. Sci.*, 2017, vol. 70, pp. 947–956.
9. Nikolaeva I.G., Tsybiktarova L.P., Garmaeva L.L., Nikolaeva G.G., Olennikov D.N., Matkhanov I.E. *J. Anal. Chem.*, 2017, vol. 72, pp. 854–861. DOI:10.1134/S1061934817080093.
10. Novozhilova E.V., Rybin V.G., Gorovoi P.G., Gavrilenko I.G. *Turczaninowia*, 2014, vol. 17, pp. 42–48. (in Russ.).
11. Stevens J.F., Reed R.L., Morrè J.T. *J. Agric. Food Chem.*, 2008, vol. 56, pp. 3945–3952. DOI: 10.1021/jf800211k.
12. Rybin V., Boltentov E., Novozhilova E. *Nat. Prod. Comm.*, 2007, vol. 2, pp. 1101–1104.
13. Ghosh D., Laddha K.S. *J. Chromatogr. Sci.*, 2006, vol. 44, pp. 22–26.
14. Lapenna S., Dinan L. *J. Chromatogr. B*, 2009, vol. 877, pp. 2996–3002. DOI:10.1016/j.jchromb.2009.07.014.
15. Karusevich A.A., Moiseev D.V., Buzuk G.N. *Vestn. Pharmats.*, 2007, vol. 37, pp. 1–5. (in Russ.).
16. Zibareva L.N., Volkova O.V., Morozov S.V., Chernyak E.I. *Khim. Rastit. Syr'ya*. 2017. №1. С. 71–75. DOI:10.14258/jcprpm.2017011416. (in Russ.).
17. Da Rosa H.S., Salgueiro A.C.F., Colpo A.Z.C., Paula F.R., Mendez A.S.L., Folmer V. *Braz. J. Med. Biol. Res.*, 2016, vol. 49, E5282. DOI: 10.1590/1414-431X20165282.
18. Hunyadi A., Gergely A., Simon A., Tóth G., Veress G., Báthori M. *J. Chromatogr. Sci.*, 2007, vol. 45, pp. 76–86.
19. Wilson I.D., Morgan E.D., Lafont R., Shockcor J.P., Lindon J.C., Nicholson J.K., Wright B. *Chromatographia*, 1999, vol. 49, pp. 374–378. DOI: 10.1007/BF02467609.
20. Al'magambetov A.M., Tuleuov B.I., Adekenov S.M. *Biological features of medicinal and aromatic plants and their role in medicine*, 2016, pp. 444–446. (in Russ.).
21. Meng Y., Whiting P., Zibareva L., Bertho G., Girault J.-P., Lafont R., Dinan L. *J. Chromatogr. A*, 2001, vol. 935, pp. 309–319. DOI: 10.1016/S0021-9673(01)00893-7.
22. Reixach N., Lafont R., Camps F., Casa J. *Eur. J. Biochem.*, 1999, vol. 266, pp. 608–615. DOI:10.1046/j.1432-1327.1999.00905.x.
23. Ho R., Girault J.-P., Cousteau P.-Y., Bianchini J.-P., Raharivelomanana P., Lafont R. *J. Chromatogr. Sci.*, 2008, vol. 46, pp. 102–110. DOI:10.1093/chromsci/46.2.102.
24. Punegov V.V., Savinovskaya N.S. *Rastit. Resursy*, 2001, vol. 37, pp.97–102. (in Russ.).
25. Olennikov D.N., Kashchenko N.I. *Chem. Nat. Comp.*, 2017, vol. 53, pp. 1199–1201. DOI: 10.1007/s10600-017-2239-1.
26. Tsybiktarova L.P. *Farmakognosticheskoye issledovanie Serratula centauroides L. I razrabotka lekarstvennogo sredstva na eyo osnove, obladaushego adaptogennoi aktivnost'yu: dis. ... kand. farm. nauk. [Pharmacognostic research of Serratula centauroides L. and the development of the medical remedy with adaptogenic activity: dis. cand. pharm. sciences]*. Ulan-Ude, 2016. 200 p. (in Russ.).
27. Petruk A.A., Vysochina G.I., Ershova E.A. *Khim. Rastit. Syr'ya*, 2013, №4, pp. 151–157. DOI:10.14258/jcprpm.1304151. (in Russ.).
28. Alieva N.K., Nigmatullaev A.M., Bobaev I.D., Taizhanov K., Ramazanov N.Sh. *Rastit. Resursy*, 2014, vol. 50, pp. 505–512. (in Russ.).

29. Abdukadirov I.T., Yakubova M.R., Nuriddinov Kh.R., Mamatkhanov A.U., Turakhozhaev M.T. *Chem. Nat. Comp.*, 2005, vol. 41, pp. 475–476. DOI:10.1007/s10600-005-0184-x.
30. Wang Y.-H., Avula B., Jadhav A.N., Smillie T.J., Khan I.A. *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, 2008, vol. 22, pp. 2413–2422. DOI:10.1002/rcm.3625.
31. Snogan E., Vahirua-Lechat I., Ho R., Bertho G., Girault J.-P., Ortiga S., Maria A., Lafont R. *Phytochem. Anal.*, 2007, vol. 18, pp. 441–450. DOI:10.1002/pca.1000.
32. Wu J.-J., Cheng K.-W., Wang H., Ye W.-C., Li E.T.S., Wang M. *Phytochem. Anal.*, 2009, vol. 20, pp. 58–63. DOI:10.1002/pca.1097.
33. Shi Q., Yan S., Liang M., Yang Y., Wang Y., Zhang W. *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 2007, vol. 43, pp. 994–999. DOI:10.1016/j.jpba.2006.09.028.
34. Louden D., Handley A., Taylor S., Lenz E., Miller S., Wilson I.D., Sage A., Lafon R. *J. Chromatogr. A*, 2001, vol. 910, pp. 237–246. DOI: 10.1016/S0021-9673(00)01204-8.
35. Munkhzhargal N., Zibareva L.N., Lafont R., Pribytkova L.N., Pisareva S.I. *Russ. J. Bioorg. Chem.*, 2010, vol. 36, pp. 133–138. DOI: 10.1134/S1068162010070216.
36. Darmograi S.V., Erofeeva N.S., Filippova A.S., Dubodelova G.V., Morozova V.A., Darmograi V.N. *Mezhdunarodn. Zhurn. Prikl. Fundament. Issled.*, 2017, №1, pp. 287–290. (in Russ.).
37. Erst A.A., Zibareva L.N., Zheleznichenko T.V., Kovzunova O.V. *Vestn. Tomsk. Gosud. Univ.*, 2017, №37, pp. 17–30. (in Russ.).
38. Kayser H., Eilinger P. *Arch. Insect. Biochem. Physiol.*, 1999, vol. 41, pp. 162–170. DOI: 10.1002/(SICI)1520-6327(1999)41:3<162::AID-ARCH8>3.0.CO;2-O.
39. Munkhzhargal N., Zibareva L.N., Oyunchimeg D., Pyak A.I. *Vestn. Tomsk. Gosud. Univ.*, 2007, № 305, pp. 192–196. (in Russ.).
40. Revina T.A., Revushkina A.S., Rakitin A.V. *Rastit. Resursy*, 1988, vol. 34, pp. 565–570. (in Russ.).
41. Zang X.-P., Zhang J., Dong M., Zhang M.-L., Hun C.-H., Shi Q.-W., Gu Y.-C. *Chem. Biodiv.*, 2010, vol. 7, pp. 594–609. DOI: 10.1002/cbdv.200800275.
42. Vorob'eva A.N., Rybin V.G., Zarembo E.V., Boltenev E.V. *Chem. Nat. Comp.*, 2005, vol. 41, pp. 105–106. DOI:10.1007/s10600-005-0090-2.
43. Olennikov D.N., Kashchenko N.I. *Khim. Rastit. Syr'ya*, 2017, № 4, pp. 123–135. DOI: 10.14258/jcprm.2017042016. (in Russ.).
44. Volodin V.V., Alexeeva L.I., Kolegova N.A., Sarker S.D., Sik V., Lafont R., Dinan L. *Biochem. Syst. Ecol.*, 1998, vol. 26, pp. 459–461. DOI: 10.1016/S0305-1978(97)00130-0.
45. Olennikov D.N. *Chem. Nat. Comp.*, 2018, vol. 54, pp. 104–106.
46. Zibareva L. *Arch. Insect Biochem. Physiol.*, 2000, vol. 43, pp. 1–8. DOI: 10.1002/(SICI)1520-6327(200001)43:1<1::AID-ARCH1>3.0.CO;2-D.
47. Girault J.-P., Bathori M., Varga E., Szendrei K., Lafont R. *J. Nat. Prod.*, 1990, vol. 53, pp. 279–293. DOI: 10.1021/np50068a002.
48. Novozhilova E., Rybin V., Gorovoy P., Gavrilenko I., Doudkin R. *Pharmacogn. Magazine*, 2015, vol. 11, pp. 225–230. DOI: 10.4103/0973-1296.157746.
49. Tomás J., Camps F., Claveria E., Coll J., Melé E., Messeguer J. *Phytochemistry*, 1992, vol. 31, pp. 1585–1591. DOI: 10.1016/0031-9422(92)83112-C.
50. Takemoto T., Okuyama T., Jin H., Arai T., Kawahara M., Konno C., Nabetani S., Arihara S., Hikino Y., Hikino H. *Chem. Pharm. Bull.*, 1973, vol. 21, pp. 2336–2338. DOI: 10.1248/cpb.21.2336.
51. Avdeeva E., Reshetov Y., Shurupova M., Zibareva L., Borisova E., Belousov M. *AIP Conf. Proc.*, 2017, vol. 1899, Art. No 050001. DOI: 10.1063/1.5009864.
52. Dinan L., Savchenko T., Whiting P. *Cell. Molec. Life Sci.*, 2001, vol. 58, pp. 1121–1132.
53. Volodin V., Chadin I., Whiting P., Dinan L. *Biochem. Syst. Ecol.*, 2002, vol. 30, pp. 525–578. DOI: 10.1016/S0305-1978(01)00128-4.
54. Dinan L. *Eur. J. Entomol.*, 1995, vol. 92, pp. 295–300.
55. DellaGreca M., D'Abrosca B., Fiorentino A., Previtera L., Zarrelli A. *Chem. Biodiv.*, 2005, vol. 2, pp. 457–462. DOI: 10.1002/cbdv.200590025.
56. Dinan L., Whiting P., Scott A.J. *Biochem. Syst. Ecol.*, 1998, vol. 26, pp. 553–576. DOI: 10.1016/S0305-1978(98)00005-2.
57. Savchenko T., Whiting P., Sarker S.D., Dinan L. *Biochem. Syst. Ecol.*, 1998, vol. 26, pp. 131–134. DOI: 10.1016/S0305-1978(97)00086-0.
58. Sarker S.D., Savchenko T., Whiting P., Šik V., Rees H.H., Dinan L. *Biochem. Syst. Ecol.*, 1997, vol. 25, pp. 473–474. DOI: 10.1016/S0305-1978(97)00042-2.

Received December 30, 2017

Revised March 4, 2018

**For citing:** Olennikov D.N., Kashchenko N.I. *Khimiya Rastitel'nogo Syr'ya*, 2018, no. 3, pp. 41–52. (in Russ.). DOI: 10.14258/jcprm.2018033639.