

Joanna GŁAZOWSKA, Marian KAMIŃSKI\*

Katedra Inżynierii Chemicznej i Procesowej, Wydział Chemiczny Politechnika Gdańska  
ul. Gabriela Narutowicza 11/12 80-233 Gdańsk

\*markamin@pg.gda.pl

## Techniki chromatografii w rozdzielaniu i oznaczaniu ekdysteroidów w *Rhaponticum carthamoides* – artykuł przeglądowy

**Streszczenie:** *Rhaponticum carthamoides* (syn. *Leuzea carthamoides*, pol. szczodrak krokoszowaty) to syberyjska, endemiczna, wieloletnia bylina, od wieków wykorzystywana w medycynie ludowej, w postaci wyciągów alkoholowych, jako preparat wzmacniający organizm. Szczególnie ważną grupą związków chemicznych, występujących w roślinie, wzbudzających szczególne zainteresowanie, ze względu na wykazywaną aktywność, są ekdysteroidy. Poznanie dokładnego składu metabolicznego oraz stężeń ekdysteroidów, a także innych metabolitów w tkankach roślinnych staje się istotnym elementem poznawczym. Ich znajomość może przyczynić się do wytwarzania preparatów leczniczych i wspomagających na bazie *Leuzei*. W rozdzielaniu ekdysteroidów zastosowanie znajduje przede wszystkim wysokosprawna chromatografia cieczowa w normalnych (NP) i odwróconych (RP) układach faz, a ostatnio, także, w warunkach oddziaływań hydrofilowych (HILIC) - z reguły, w warunkach elucji gradientowej, a także chromatografia cienkowarstwowa (TLC) w jednym, a szczególnie w dwóch wymiarach. W dalszym ciągu poszukuje się możliwie nieskomplikowanych metodok pozwalających na rozdzielanie i oznaczenie ekdysteroidów i innych metabolitów wtórnych obecnych w surowym ekstrakcie. Ważne, szczególnie w przypadku tej rośliny, byłoby opanowanie metodyki rozdzielania i wydzielania wszystkich metabolitów, ponieważ, niektóre badania wykazują, że działanie ekdysteroidów w organizmach ssaczych jest wzmacniane w sposób synergiczny przez nieznanne dotychczas składniki rośliny. Prace nad rozdzielaniem mają duże znaczenie dla dalszych badań nad tą, ciągle jeszcze niewystarczająco zbadaną rośliną, w tym także, dla opracowania procedury standaryzacji "materiału roślinnego", obecnego na rynku w postaci różnego rodzaju wyciągów i preparatów. Przedmiotem niniejszej pracy jest zestawienie oraz porównanie technik i warunków chromatograficznych wykorzystywanych dotychczas w rozdzielaniu i oznaczaniu ekdysteroidów w wyciągach roślinnych z *Rhaponticum carthamoides*. W związku z ogromnym bogactwem metabolicznym *Rhaponticum carthamoides*, szczególnie obiecujące wydaje się zastosowanie w dalszych badaniach dwuwymiarowej wysokosprawnej kolumnowej chromatografii cieczowej z elucją gradientową w obu "wymiarach" rozdzielania (2D-Grad/Grad-HPLC), albo ortogonalnego rozdzielania wielokolumnowego, z przepływem zwrotnym eluentu w dowolnej kolumnie rozdzielczej ((MC-HPLC-EBF), a w przypadku techniki chromatografii cienkowarstwowej - elucji kilkustopniowej (NS-TLC), lub rozdzielania dwuwymiarowego (2D-TLC), być może także z elucją kilkustopniową w drugim "wymiarze" rozdzielania (2D-NS-TLC).

**Słowa kluczowe:** *Rhaponticum carthamoides*, *Leuzea carthamoides*, Fitoekdysteroidy, Wysokosprawna elucyjna chromatografia cieczowa kolumnowa - HPLC, Chromatografia cienkowarstwowa - TLC, Odwrócone układy faz - RP, Normalne układy faz - NP, Warunki oddziaływań hydrofilowych - HILIC

## Chromatographic techniques in separation and determination of ecdysteroids in *Rhaponticum carthamoides* – A review

**Abstract:** *Rhaponticum carthamoides* (*Leuzea carthamoides*) is a Siberian endemic perennial used for centuries in folk medicine as a body-strengthening specimen based on alcohol extracts. The main group of substances which is in particular interest, due to exhibiting high activity, are ecdysteroids. The determination of the exact composition and concentration of metabolites in the plant tissues is an important element of cognitive. The knowledge can contribute to the development of new medicinal preparations based on *Leuzea*. The separation of ecdysteroids is carried out using the normal and reverse phase high performance liquid chromatography, as well as the hydrophilic interactions liquid chromatography, in a gradient elution, and thin layer chromatography in one- and two-dimension. However there is still a need to look for an uncomplicated method for the separation and identification of ecdysteroids and other plant secondary metabolites, present in the crude extract of *Rhaponticum*. Separation and isolation of all metabolites showing synergic interactions with ecdysteroids in mammalian organisms is important to investigate their "mode of action". Further studies, on this still not well known plant, and also on the development of procedures of standardization of plant material, present on the market in form of different extracts and preparation are needed. The object of this work is to collate and compare the most popular chromatographic techniques used in separation and determination of ecdysteroids in plant material of *Rhaponticum carthamoides*. Due to its enormous wealth of secondary metabolite it is important to apply two dimensional high performance liquid chromatography with gradient elution in both directions (2D-Grad/Grad-HPLC), or

orthogonal column separations with eluent backflush on each column (MC-HPLC-EBF), and in TLC: step- and multi-dimensional elution (2D-TLC and 2D-NS-TLC).

**Key words:** *Phytoecdysteroids, Rhaponticum carthamoides, Leuzea carthamoides, Liquid Chromatography, Thin Layer Chromatography - TLC, Reversed Phase High Performance Chromatography - RP-HPLC, Normal Phase High Performance Chromatography - NP-HPLC, Hydrophilic Interaction Chromatography - HILIC.*

**Użyte skróty:** NP-HPLC – wysokosprawna chromatografia cieczowa w normalnych układach faz, RP-HPLC – wysokosprawna chromatografia cieczowa w odwróconych układach faz, TLC – chromatografia cienkowarstwowa, HILIC – chromatografia oddziaływań hydrofilowych, OPTLC – chromatografia cienkowarstwowa z wykorzystaniem nadciśnienia (z wymuszonym przepływem eluentu, HPTLC – wysokosprawna chromatografia cienkowarstwowa, FFPC – chromatografia planarna z wymuszonym przepływem fazy ruchomej, UV – promieniowanie nadfioletowe

## 1. Wstęp (Introduction)

*Rhaponticum carthamoides* (synonim *Leuzea carthamoides*) (Rysunek 1), po polsku szczodrak krokoszowaty jest endemiczną rośliną, porastającą duże obszary południowej Syberii, w szczególności łąki gór Altaj i Sajan, gdzie spotykana jest na wysokości powyżej 1200 m n.p.m. *L. carthamoides* to wieloletnia bylina dożywająca nawet 150 lat. Od ponad 5000 lat znana jest jako roślina lecznicza, stosowana szeroko w medycynie ludowej ludności syberyjskiej, mongolskiej, tybetańskiej oraz chińskiej w wyniku czego obecnie zagrożona jest wyginięciem ze względu na wzrost zainteresowania tą rośliną szczególnie, niestety, jej korzeniami [1-4]. Szczęśliwie, obecnie istnieje coraz więcej upraw tej rośliny, szczególnie w krajach Europy Środkowej i Zachodniej, a także na terenie Chin i Rosji (rys. 1).

Szczodrak krokoszowaty bogaty jest w związki chemiczne należące do różnych klas, takich jak steroidy, sterole, flawonoidy i antocyjany, kwasy fenolowe, garbniki, a także triterpeny i tiofeny. Uważa się, że bogate w ekdysteroidy ekstrakty i preparaty na bazie tej rośliny mają działanie wzmacniające organizm po wysiłku, zwiększające odporność na długotrwały stres, działają przeciwbakteryjnie, przeciwutleniająco oraz wykazują właściwości adaptogenów [2, 3, 5-11].

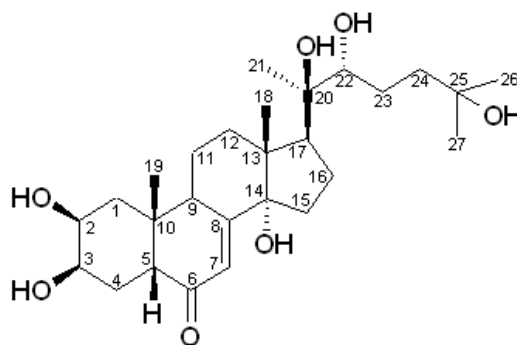


Rys.1. Uprawa *Rhaponticum carthamoides*. (Źródło:www.leuzea.ru)

Fig. 1. Cultivation of *Rhaponticum carthamoides* (source: www.leuzea.ru)

W *Rhaponticum carthamoides*, jak do tej pory, zidentyfikowano około 50 różnych ekdysteroidów [3]. Są one obecne w częściach podziemnych rośliny (korzenie i kłącza) oraz nadziemnych, zarówno wegetatywnych (łodygach, liściach), jak i generatywnych (kwiaty i nasiona). W zależności od pory roku oraz stadium rozwoju rośliny stężenia poszczególnych ekdysteroidów zmieniają się [12, 13]. Dotychczasowe badania dowiodły obecności ekdysteroidów w różnych partiach rośliny: korzeniach, liściach i nasionach na poziomie, odpowiednio: 0,04 - 0,81 %, 0,03 - 1,22 % i 0,27 - 1,51 % [3].

Do najważniejszych ekdysteroidów występujących w *Rhaponticum carthamoides*, zalicza się 20-hydroksyekdyson (Rysunek 2, 20E, spotykany również pod nazwą  $\beta$ -ekdyson, ekdysteron, polipodyna A),  $\alpha$ -ekdyson oraz inokosteron [3]. Szczegółową budowę wszystkich jak dotąd odkrytych ekdysteroidów, w tym tych występujących w *Rhaponticum carthamoides* można znaleźć w literaturze [3, 14] oraz bazie „The Ecdysone Handbook”.



Rys. 2. Struktura chemiczna 20-hydroksyekdysonu z numeracją atomów węgla.

Fig.2. Chemical structure of 20-hydroxyecdysone with the numeration of carbon atoms.

## 2. Struktura ekdysteroidów i jej wpływ na retencję (The chemical structure of ecdysteroids and its influence on retention)

Ekdysteroidy należą do rodziny związków o bardzo zbliżonej budowie. Są to czteropierścieniowe steroidy, posiadające od 27 do 29 atomów węgla w cząsteczce. Wyjątki, powstałe w wyniku usunięcia łańcucha bocznego, to rubrosteron – 19 atomów węgla oraz posteron – 21 atomów węgla [3].

Cechą charakterystyczną ekdysteroidów jest grupa  $\Delta^7$ -keto-6-enowa w pierścieniu B, będąca silnym chromoforem absorbującym fale o długości 242 nm [15], pierścienie A i B w pozycji *cis*, a także grupa hydroksylowa w pozycji 14 [16]. Numerację węgli w cząsteczce ekdysteroidów przedstawiono na rysunku 2. Są to związki o zróżnicowanej polarności, zawierające od 2 do 10 grup OH w swej strukturze. Posiadają łańcuch boczny, przyłączony w pozycji 17, który łatwo ulega modyfikacjom i reakcjom podczas syntezy i metabolizmu ekdysteroidów. Główne reakcje, jakim ulegają ekdysteroidy to reakcje hydroksylacji (najczęściej w pozycjach 5, 11, 25 lub 26), utleniania (np. w pozycji 26), reakcje tworzenia  $\gamma$ - i  $\delta$ -laktonów (łańcuch boczny), alkilowania (rozgałęzienie łańcucha bocznego, w pozycji 24) oraz reakcje koniugacji, mające miejsce na sąsiadujących grupach hydroksylowych w pozycjach 2, 3 oraz 20, 22. Grupy hydroksylowe w tych pozycjach mają szczególne znaczenie w przypadku tworzenia się trwałych pochodnych powodując zmiany w polarności tych ekdysteroidów. Związki te spotykane są często w postaci pochodnych oraz koniugatów polarnych: glikozydów, siarczanów, fosforanów oraz niepolarnych: eterów, estrów, octanów i benzoesanów. Skutkuje to obecnością w roślinie związków o bardzo zróżnicowanych właściwościach fizykochemicznych, również często występujących w ilościach śladowych [3, 14, 16-18].

## 3. Metodyki ekstrakcji lub ługowania ekdysteroidów z surowego bądź suszonego materiału roślinnego (Methods of ecdysteroids extraction from a dry of fresh plant material)

Na podstawie badań przeprowadzonych do tej pory, wpływ na retencję ekdysteroidów w układzie NP jak i RP, ma nie tylko ilość grup OH w cząsteczce, ale przede wszystkim ich położenie. Dlatego też dodatkowa grupa -OH w rejonie o charakterze hydrofilowym (np. pozycje 1 lub 24) nie wpłynie znacząco na retencję w warunkach RP w przeciwieństwie do dodatkowej grupy OH obecnej w bardziej hydrofobowym rejonie cząsteczki (pozycje 11, 25 lub 26). Odwrotnie sytuacja przedstawia się dla warunków w normalnym układzie faz. Wyjątkiem jest grupa  $5\beta$ -OH w polipodynie B, gdzie tworzy ona silne wiązanie wodorowe z grupą ketonową w pozycji 6 [19, 20] i retencja cząsteczki jest inna w badanych układach i warunkach rozdzielania, niż mogłoby się to wydawać z teoretycznych założeń.

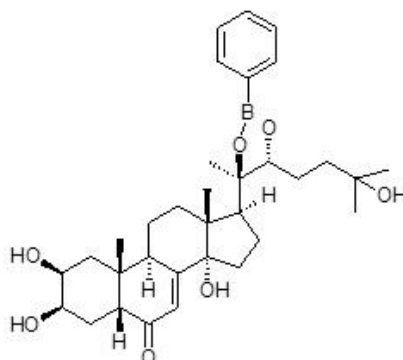
Reakcje utleniania, szczególnie w pozycji 3 oraz 22 wpływają na spadek polarności a co za tym idzie na spadek retencji ekdysteroidów w normalnym układzie faz. Może to powodować trudności w uzyskaniu pełnego rozdzielania związków o takiej budowie. Na spadek retencji – wzrost hydrofobowości ekdysteroidów w układach NP mają także wpływ podstawienia grupy alkilowej w pozycji 24, a także reakcje estryfikacji (acetylacji) w pozycjach 2 i 3 oraz 20, 22, co powoduje, że związki te jak np. 20-hydroksyekdyson 2, 3-monoacetonid lub 20-hydroksyekdyson 2, 3;20,22-diacetonid są trudne do rozdzielania [19].

W odwróconych układach faz sytuacja w większości przypadków przedstawia się odmiennie niż w układach NP. W przypadku układów RP spadek polarności w wyniku np. utleniania grup OH do grup ketonowych w pozycji 3, przy zastosowaniu eluentów na bazie rozpuszczalnika o większej polarności (np. metanol) może powodować trudności w rozdzielaniu. Zmienia się to przy zastosowaniu mniej polarnych rozpuszczalników organicznych jak np. acetonitryl. Duży wpływ na retencję mają wszelkie rozgałęzienia łańcucha bocznego, szczególnie w pozycji 24. Skutkuje to wzrostem hydrofobowości ekdysteroidów i zwiększeniem ich retencji. Podobna sytuacja ma miejsce w przypadku związków z grupami estrowymi oraz

acetylowymi w pozycjach 2, 3, 20, 22. Związki wykazują znaczną retencję w odwróconych układach faz i ulegają lepszemu rozdzielaniu niż w przypadku normalnego układu faz [20].

#### 4. Modyfikacje strukturalne ecdysteroidów (*The structural modifications of ecdysteroids*)

Piš i współpracownicy [17] zaproponowali szybką i skuteczną metodę oczyszczania ekstraktów alkoholowych ecdysteroidów za pomocą ekstrakcji do fazy stałej pochodnych kwasu fenyloboronowego. Reakcji z kwasem fenyloboronowym ulegają jedynie ecdysteroidy posiadające układ diolowy w łańcuchu bocznym, w pozycji 20, 22. Przykład takiej pochodnej przedstawia rysunek 3. Pierwotne formy ecdysteroidów można uzyskać w reakcji pochodnych z roztworem nadtlenu wodoru. Fenyloboroniany ecdysteroidów mogą być przygotowane w różnych rozpuszczalnikach, również zawierających wodę, co jest ważne w przypadku rozdzielania ich w odwróconych układach faz. Jest to szczególnie korzystne w przypadku badania próbek biologicznych. Dzięki modyfikacji, ecdysteroidy zmieniają swoje właściwości na bardziej hydrofobowe, dzięki czemu w układach typu RP wykazują większą retencję. Wzrost wydajności oczyszczania fenyloboronianów ecdysteroidów, można osiągnąć w wyniku zastosowania faz ruchomych bardziej polarnych i o niższej sile elucyjnej, w pierwszej kolejności, do wymycia ze złoża polarnych zanieczyszczeń obecnych w ekstraktach roślinnych, a następnie stosowania eluentów o większej sile elucyjnej do elucji ecdysteroidów ze złoża. Pozwala to na bardziej selektywne oczyszczenie natywnych ecdysteroidów. Dodatkową zaletą jest fakt, że wstępnie oczyszczone ecdysteroidy można w tej samej formie poddać rozdzielaniu w warunkach wysokosprawnej chromatografii cieczowej. Istotną wadą procedury jest to, że reakcji ulegają jedynie ecdysteroidy posiadające układ diolowy w pozycji 20, 22. Wiele składników ekstraktów o inaczej zbudowanym łańcuchu bocznym nie może w ten sposób zostać selektywnie izolowanych.



Rys.3. Struktura chemiczna 20,22-fenilo-20-hydroksyeckydsonu

Fig. 3. Chemical structure of a 20,22-phenyl-20-hydroxyecdysone.

#### 5. Metody chromatografii w rozdzielaniu i analizie ecdysteroidów (*The chromatographic methods for separation and analysis of ecdysteroids*)

##### 5.1. Chromatografia cienkowarstwowa jedno- i dwuwymiarowa (*Thin-layer chromatography in one-and two dimension*)

Chromatografia cienkowarstwowa jest efektywną techniką do rozdzielania ecdysteroidów. Rozdział odbywa się na płytkach aluminiowych lub szklanych, pokrytych żelalem krzemionkowym w układach NP albo HILIC lub na płytkach pokrytych żelalem krzemionkowym modyfikowanym grupami oktadecylowymi (tzw. C18, układ RP) [21].

TLC należy do grupy nieskomplikowanych w wykonaniu, tanich i szybkich technik separacyjnych, a wykorzystywana jest przede wszystkim do określania odcisku palca, a także do kontroli procesu ekstrakcji. Opracowanych zostało wiele faz ruchomych zarówno dla normalnego jak i odwróconego układu faz [15], zapewniających rozdzielanie zarówno polarnych, średnio polarnych, a także niepolarnych ecdysteroidów. W analizie ecdysteroidów roślinnych, a w szczególności tych obecnych w *Rhaponticum carthamoides*, wykorzystuje się popularne mieszaniny rozpuszczalników organicznych (Tabela 1).

W normalnych układach faz stosuje się eluenty na bazie organicznych rozpuszczalników takich jak: octanu etylu, dichlorometan, chloroform w połączeniu z alkoholami takimi jak metanol, etanol i izopropanol [15, 19, 22, 23]. W przypadku stosowania dodatku wody do fazy ruchomej, w ilości od 0,1-0,2 % mówimy już o chromatografii oddziaływań hydrofilowych (HILIC).

W odwróconych układach faz, jako fazę ruchomą, stosuje się głównie mieszaninę metanolu i wody w różnych stosunkach objętościowych [15, 19, 22]. Obecnie możliwe jest wykorzystanie technik z użyciem nadciśnienia (OPTLC, HPTLC, FFPC), co znacznie skraca czas trwania rozdzielania na płytkach TLC [21], a

przede wszystkim umożliwiła użycie płytek typu HPTLC, co zapewnia znacznie wyższą wartość tzw. pojemności względnej pików (węższe strefy rozdzielanych substancji). Technika ta charakteryzuje się krótkim czasem analizy, lepszą rozdzielczością niż w przypadku tradycyjnego TLC [22].

Rozdzielenie trudnych do separacji ekdysteroidów, takich jak np. ponasteron A i 2-deoksyekdyson, możliwe jest dzięki zastosowaniu modyfikacji kwasem boronowym ekdysteroidów zawierających układ 20, 22-diolowy w swojej cząsteczce, zarówno w układach TLC jak i HPLC. Możliwe jest to dzięki zmniejszeniu polarności cząsteczek poprzez modyfikację resztą kwasu boronowego [15, 17].

Do wykrywania ekdysteroidów na płytkach TLC wykorzystuje się techniki niespecyficzne dla danego związku, np.: absorpcję światła UV dla 254 i 366 nm [15, 22, 23], wygaszanie fluorescencji za pomocą płytek TLC typu „F<sub>254+366</sub>” zawierających czynnik luminescencyjny (np. ZnSe), a także wywoływanie w oparach jodu [15, 21]. Do bardziej specyficznych metod, pozwalających na kolorystyczne rozróżnienie poszczególnych plamek, zaliczyć można rozpylanie mieszaniny waniliny lub kwasu siarkowego w 95 % etanolu, dające charakterystyczne zabarwienie plamkom ekdysteroidów, a także kwas siarkowy i amoniak w formie aerozolu [15, 19]. Ekdysteroidy z *Rhaponticum carthamoides* barwią się pod wpływem wyżej wymienionych czynników na kolor: od niebieskiego przez turkusowy, zielony, oliwkowy, szary, fioletowy do brązowego, pomarańczowego i żółtego.

Lopenna i współpracownicy [23] poddali analizie estry etylowe ekdysteroidów, m. in. techniką TLC, uzyskując dobre rozdzielanie analogów 20E. W swoich badaniach zastosowali fazę ruchomą składającą się z chloroformu i metanolu w stosunku 7:1 (v/v) oraz fazy o niższym stężeniu metanolu bardziej odpowiednią dla rozdzielania 2,3- i/lub 20,22- dioli chronionych grupą acetylową.

**Tabela 1.** Zestawienie opisów literaturowych stosowanych warunków rozdzielania ekdysteroidów techniką TLC.

**Table 1.** A list of the TLC separation conditions of ecdysteroids.

Tryb (Mode)	Faza stała (The stationary phase)	Faza ruchoma (v/v) (The mobile phase (v/v))		Detekcja (Detection)	Literatura (References)
NP	Żel krzemionkowy	DCM:EtOH	85:15	Światło widzialne oraz UV (254 nm) 366 nm; Zastosowanie kwasu siarkowego	[22]
		CHCl <sub>3</sub> :MeOH: CO(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>	6:2:1		
		DCM:96 % EtOH	96:4		
		CHCl <sub>3</sub> :EtOH	9:1		
RP	C18	MeOH:H <sub>2</sub> O	65:35		
		MeOH:H <sub>2</sub> O	6:4		
NP- HPTLC, FFPC	Żel krzemionkowy 60 F <sub>254</sub>	CHCl <sub>3</sub> :MeOH	7:1	Detekcja przy długości fali 254 nm, zanurzenie płytki w 5% (w/v) p- anizaldehydzie i 5% (v/v) roztworze kwasu siarkowego w etanolu, podgrzewanie do pojawienia się fioletowego, niebieskiego, szarego lub zielonego zabarwienia	[22, 23]
			10:1		
			15:1		
			9:1		
			92,5:7,5		
NP	Żel krzemionkowy F <sub>254</sub>	DCM:96 % EtOH	8:2	Detekcja przy długości fali 254 nm	[24, 25]
		CHCl <sub>3</sub> :MeOH:Benzen	25:5:3		
NP	Żel krzemionkowy	CHCl <sub>3</sub> :95% EtOH	7:3	Detekcja przy długości fali 254 nm, oprócz zastosowania faz ruchomych z dodatkiem DCM; dla wszystkich faz MS	[15]
		CHCl <sub>3</sub> :Pr-1-OH	9:5		
		DCM: CO(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> :MeOH	2:1:1		
		DCM: CO(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> :EtOH	16:4:5		
RP	Merck C <sub>18</sub>	MeOH:H <sub>2</sub> O	1:1		
	Whatman C <sub>18</sub>				
HILIC	Żel krzemionkowy	AcOEt:MeOH:25% NH <sub>3</sub> w H <sub>2</sub> O	85:10:5	Światło widzialne oraz UV (254 nm) 366 nm przy zastosowaniu kwasu siarkowego	[22]
		AcOEt:96 % EtOH:H <sub>2</sub> O	8:2:1		
		AcOEt:MeOH:H <sub>2</sub> O	85:10:5		
		AcOEt:EtOH:H <sub>2</sub> O	80:5:2		
		AcOEt:96 % EtOH:H <sub>2</sub> O	16:2:1		
HILIC	Żel krzemionkowy	DCM:MeOH:H <sub>2</sub> O	79:15:1	Detekcja przy długości fali 254 nm, oprócz zastosowania faz ruchomych z dodatkiem DCM; dla wszystkich faz MS	[15]
		DCM:MeOH: 25 % NH <sub>3</sub> w H <sub>2</sub> O:H <sub>2</sub> O	77:20:2: 1		
NP/ HILIC	Żel krzemionkowy F <sub>254</sub>	AcOEt:96 % EtOH:H <sub>2</sub> O	80:10:5	Światło widzialne oraz UV (254 nm) 366 nm przy zastosowaniu kwasu siarkowego z waniliną	[24]
		Toluen: CO(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> :96%EtOH:25 % NH <sub>3</sub> w H <sub>2</sub> O	100:140: 32:9		
RP	Żel krzemionkowy mod. C 18 F <sub>254</sub>	THF:H <sub>2</sub> O	45:55		
		MeOH:H <sub>2</sub> O	55:45		

## 5.2. Wysokosprawna chromatografia cieczowa w normalnych układach faz (*The Normal Phase High Performance Liquid Chromatography*)

### Fazy stacjonarne

W normalnych układach faz w chromatografii cieczowej ekdyteroidów wykorzystuje się jako fazy stacjonarne kolumny wypełnione żelom krzemionkowym niemodyfikowanym lub modyfikowanym polarnymi grupami, np. –diol (DIOL), -poliol (n-OL), -aminopropylsilan, -aminowymi (NH<sub>2</sub>) oraz nitrowymi (NO<sub>2</sub>). Kolumny te stosuje się zarówno w analityce, jak i w semi-preparatywnym i preparatywnym rozdzielaniu ekdyteroidów z ekstraktów szczodraka krokoszowego. Układ faz normalnych pozwala na rozdzielanie ekdyteroidów o zróżnicowanej polarności, od niepolarnych do polarnych [15, 26]. W przypadku kolumn z polarną fazą stacjonarną kolejność elucji ekdyteroidów nie zależy od rodzaju wypełnienia. Związane jest to z inną naturą oddziaływań jakie mają miejsce na powierzchni złoża pomiędzy grupami hydroksylowymi ekdyteroidów i żelu krzemionkowego. Istotną wadą stosowania żelu krzemionkowego jest jego powolna dezaktywacja w wyniku silnej adsorpcji na jego powierzchni śladowych ilości wody. Jednakże, jeżeli kolumna stosowana jest w tych warunkach w stałej temperaturze oraz jest zrównoważona z eluentem, problem dezaktywacji złoża nie powinien występować [15]. Szczegółowe zestawienie warunków rozdzielania chromatograficznego w normalnych układach faz oraz układach oddziaływań hydrofilowych przedstawia tabela 2.

**Tabela 2.** Zestawienie opisów literaturowych warunków rozdzielania ekdyteroidów w normalnych układach faz wysokosprawnej chromatografii cieczowej (NP-HPLC) oraz chromatografii oddziaływań hydrofilowych (HILIC).

**Table 2.** A list of the NP-HPLC and HILIC separation conditions of ecdysteroids.

Układ (Mode)	Kolumna (The column)	Warunki Lucji (Elution conditions)			Detekcja (Detection)	Literatura (References)
		Faza ruchoma (Mobile phase)	Program elucji (The elution program)	Przepływ eluentu (The flow rate)		
HILIC	Zorbax-Sil (DuPont), 250x4,6 mm	DCM:2-PrOH:H <sub>2</sub> O 125:30:2	Izokratyczna	1 mL/min	242 nm	[15]
		DCM:2-PrOH:H <sub>2</sub> O 125:40:3 lub 100:40:3				
		DCM:2-PrOH:H <sub>2</sub> O 125:15:1				
		Cykloheksan:2-PrOH:H <sub>2</sub> O (100:40:3)				
	Silasorb 600, 5 µm, 250x4 mm	n-heksan:EtOH:H <sub>2</sub> O 812:180:8	Izokratyczna	0,8 mL/min	MS	[27]
		Eter dietylowy:ACN:H <sub>2</sub> O 880:102:18 DCM:2-PrOH:H <sub>2</sub> O 84:15:1				
NP	Apex II diol column, 5 µm, 150x4,6 mm (GRACE, Wilmington, DE, USA)	A: MeOH B: DCM	Liniowy program elucji od 2 do 10% B w 20 min	1 mL/min	242 i 300 nm	[23]
			Liniowy program elucji od 4 do 10% B w 20 min			

### Fazy ruchome

W normalnych układach faz preferowanymi składnikami eluentów stosowanymi w rozdzielaniu ekdyteroidów są dichlorometan i chloroform, modyfikowane alkoholami takimi jak metanol, etanol lub izopropanol. Stosuje się również inne rozpuszczalniki niepolarne do tworzenia eluentu takie jak, *n*-heksan czy cykloheksan lub eter dietylowy. Niestety te fazy charakteryzują się większą lepkością niż fazy na bazie wody, co powoduje powstawanie dużych oporów przepływu i w konsekwencji wysokie ciśnienie robocze, przy stosunkowo niskim przepływie eluentu. Stosowanie dichlorometanu oraz chloroformu jest niekorzystne również z innego powodu. Rozpuszczalniki te uniemożliwiają detekcję ekdyteroidów za pomocą UV dla długości fali 235 i 245 nm, ponieważ absorbują UV w zakresie do 245 nm.

Lapenna [23] zaproponował zastosowanie elucji gradientowej o malejącej sile elucyjnej (malejącej zawartości dichlorometanu w fazie ruchomej). Ma to szczególnie zastosowanie w rozdzielaniu związków



średnio i nisko polarnych, w tym przypadku ekdysteroidów zawierających grupy eterowe i estrowe w miejscu polarnych grup OH. Zastosowanie tego typu układu umożliwi rozdzielanie ekdysteroidów w zależności od ilości grup eterowych oraz możliwość ich rozdzielania w przypadku bardzo niewielkich różnic w polarności.

W rozdzielaniu ekdysteroidów w układzie faz normalnych stosowanie kolumn zrównoważonych z eluentami zawierającymi wodę korzystnie wpływa na ograniczenie „ogonowania” pików oraz poprawia symetrię pików. Jednocześnie należy mieć na uwadze, że nawet niewielkie, dodatkowe ilości wody np. w próbce, powodują powolną dezaktywację fazy stacjonarnej, co skutkuje zmianami w czasach retencji eluowanych pików. Według przeprowadzonych badań [15, 28], najbardziej „odporną kolumną” na zmienne zawartości wody w eluencie jest kolumna Zorbax-Sil. Zauważono, że w przypadku normalnych układów faz rodzaj wypełnienia kolumny oraz obecność wody w fazie ruchomej bądź próbce, nieznacznie wpływa na wartości czasów retencji ekdysteroidów. Obecnie technika wykorzystująca eluenty zawierające znaczne ilości wody (więcej niż 0,1 %) znana jest jako chromatografia oddziaływań hydrofilowych (HILIC).

### 5.3. Wysokosprawna chromatografia cieczowa w odwróconych układach faz (The Reverse Phase High Performance Liquid Chromatography)

#### Fazy stacjonarne

W chromatografii ekdysteroidów stosuje się typowe fazy stacjonarne o charakterze hydrofobowym, takie jak, żele krzemionkowe modyfikowane grupami C22, C18, C8, C6, a także grupami fenyłowymi. Wypełnienia te charakteryzują się dużą uniwersalnością i możliwością rozdzielania ekdysteroidów o bardzo szerokim spektrum właściwości fizykochemicznych i zróżnicowanej budowie, a także innych składników matrycy roślinnej. W przypadku ekdysteroidów różnorodność struktury wpływa na kolejność elucji poszczególnych związków. Dlatego istotne jest dobranie indywidualnie najkorzystniejszych warunków chromatograficznych w zależności od posiadanej kolumny i stosowanego układu [15, 20]. Szczegółowe przedstawienie omawianych warunków rozdzielania ekdysteroidów przedstawia tabela 3.

**Tabela 3.** Zestawienie opisów literaturowych warunków rozdzielania ekdysteroidów w odwróconych układach faz wysokosprawnej chromatografii cieczowej (RP-HPLC).

**Table 3.** A list of the RP-HPLC separation conditions of ecdysteroids.

Kolumna (The column)	Warunki elucji (The elution conditions)			Detekcja (Detection)	Litera tura (Referenc es)
	Faza ruchoma (The mobile phase)	Program elucji (The elution program)	Natężenie przepływu eluentu (The flow rate)		
Lichrospher 100 RP-18e, 250x4.6 mm, 5 µm (Merck, Niemcy)	ACN:H <sub>2</sub> O 25:75 (+0.01% TFA)	Izokratyczna	1 mL/min	246 nm	[29]
Spherisorb 5ODS2 (Biochrom), 250x4,6 mm	ACN:H <sub>2</sub> O 23:77(+0.01% TFA)	Izokratyczna	1 mL/min	242 nm	[15, 21]
	H <sub>2</sub> O:MeOH 50:50 (0.01% TFA)				
	H <sub>2</sub> O:2-PrOH 82:18 (0.01% TFA)				
C18 Phenomenex Sphereclone ODS2, 5µm, 150mmx4.60mm (Phenomenex, Macclesfield, UK)	A: MeOH B: H <sub>2</sub> O	Liniowy program elucji od 30 do 100% w 25 min	1 mL/min	242 i 300 nm	[23]
C6 Phenomenex Sphereclone, 5µm, 150mmx4.6mm (Phenomenex, Macclesfield, UK)					
Separon SGX C18, 5 µm, 250x4mm	A: H <sub>2</sub> O B: MeOH	Liniowy program elucji od 10 do 70% B w 50 min	0,6 mL/min	MS	[27]
Sherisorb ODS-2	A: MeOH B: H <sub>2</sub> O	Liniowy program elucji od 30 do 100 % A w 30 min 100 % A 10 min	1 mL/min	242 nm	[30]
Symmetry C18, 150x3,9mm, 5 µm (Waters)	A:woda B:acetonitryl	20-25% B w 0-20min 90% B w 20min 90% B w 20-30min Rekondycjonowanie kolumny 20% B przez 5min	0,7 mL/min	254 nm	[31, 32]

### Fazy ruchome

W układach faz odwróconych (RP) w rozdzielaniu ekdysteroidów najpopularniejszymi eluentami są mieszaniny metanol:woda oraz acetonitryl:woda. Te organiczne dodatki do eluentów stosowane są zarówno w elucji izokratycznej, jak i gradientowej [15, 21]. Stosowanie buforu, najczęściej mrówczanowego lub dodatku 0,01% kwasu trifluorooctowego w mieszaninie wody z acetonitrylem, pozwala na osiągnięcie pików o lepszym kształcie, a także znacznie polepsza rozdzielanie ekdysteroidów bardzo zbliżonej strukturze lub występujących w postaci zdysocjowanej lub glikozydowej. Wymienione eluenty są dość uniwersalne i nadają się do rozdzielania ekdysteroidów zarówno polarnych (jonowych i niejonowych), jak i średnio polarnych związków [15].

Retencja w odwróconych układach faz zależy przede wszystkim od ilości wolnych grup OH oraz struktury łańcucha bocznego. Obecność lub brak którejs z grupy OH również wpływa na kolejność elucji. Wraz z większą ich ilością zwiększa się polarność związku, a co za tym idzie zmniejsza się ich hydrofobowość i retencja. Szczególne znaczenie ma w tym przypadku grupy hydroksylowe w pozycji 11, 25 i 26, które znacznie wpływają na hydrofilowy charakter cząsteczki. Jednakże nie tylko to ma znaczący wpływ na stopień oddziaływań danej cząsteczki z fazą stacjonarną i ruchomą. Ważne są tu również oddziaływania steryczne oraz konformacja i układ przestrzenny cząsteczki – pozycja aksjalna lub ekwatorialna grupy OH, czy grupa ta jest wolna czy oddziałuje z innymi grupami w cząsteczce. Niektóre ekdysteroidy posiadają łańcuch boczny (grupy metylowe lub etylowe w pozycji 24), który, o ile niepodstawiony, powoduje wzrost hydrofobowości cząsteczki i zwiększenie retencji, a podstawienie przynajmniej jedną grupą hydroksylową powoduje zmianę charakteru cząsteczki czyniąc ją znacznie bardziej polarną [19, 20, 28].

## 5.4. Chromatografia gazowa (Gas Chromatography)

Ekdysteroidy, jako bardzo polarne związki chemiczne są nietłotne, a także termo labilne (najniższą temperaturę topnienia posiada kartamosteron: 170 °C, [33]). Z tych względów nie mogą być w prosty sposób rozdzielane i oznaczane za pomocą chromatografii gazowej. Wykorzystanie tej techniki możliwe jest jedynie po przeprowadzeniu ekdysteroidów w ich lotne pochodne w wyniku derywatywacji. Takimi pochodnymi stosowanymi w analizie GC są pochodne trimetylosililowe, zmniejszające polarność, zwiększające lotność oraz wytrzymałość pochodnych na wysoką temperaturę. Poważną wadą tej metody jest fakt, że ekdysteroidy mogą tworzyć podczas derywatywacji pochodne o zróżnicowanej budowie, utrudniające satysfakcjonujące rozdzielanie otrzymanych pochodnych oraz jednoznaczny identyfikację [15, 28].

## 6. Podsumowanie (Summary)

Ekstrakty ekdysteroidów z *Rhaponticum* stanowią bardzo skomplikowaną mieszaninę związków chemicznych. Wiele z nich należy do grup o bardzo zbliżonej budowie i właściwościach, przez co uzyskanie pełnego rozdzielania podczas jednej operacji chromatograficznej stanowi problem. Inne grupy związków chemicznych, obecnych w tkankach rośliny posiadające podobne właściwości tzn. polarność, hydrofobowość, mogą i w praktyce przeszkadzać w rozdzielaniu, identyfikacji i oznaczaniu ekdysteroidów, które są szczególnym przedmiotem zainteresowania. Stosowane dotychczas metodyki rozdzielania ekdysteroidów opierają się głównie na jednowymiarowej chromatografii cieczowej z elucją izokratyczną albo gradientową. Nie eliminuje to, jednak, możliwości koelucji analogów strukturalnych ekdysteroidów oraz innych związków chemicznych o zbliżonych właściwościach. Jednym z „rozwiązań” tego problemu rozdzielczego jest tworzenie pochodnych ekdysteroidów, pozwalających, tak na bardziej selektywną ekstrakcję, jak i na selektywne rozdzielanie chromatograficzne. Nie wszystkie ekdysteroidy obecne w próbce można jednak w ten sposób rozdzielić i oznaczyć. Wilson ze współpracownikami [31, 32] zaproponował jednowymiarowe rozdzielanie w warunkach elucji gradientowej, z zastosowaniem odwróconych układów faz, równocześnie wykorzystując detektor UV oraz spektroskopię magnetycznego rezonansu jądrowego do jednoczesnego określania struktury rozdzielanych ekdysteroidów.

Technika chromatografii cienkowarstwowej (TLC) stanowi dobrą technikę wstępnego doboru warunków rozdzielania i kontroli efektywnej ekstrakcji/lugowania oraz wstępnej oceny składu frakcji. W przypadku techniki TLC należy zbadać rozdzielanie dwuwymiarowe oraz wielostopniowe, pozwalające na rozdzielanie wszystkich ekdysteroidów, a także innych składników obecnych w ekstrakcie podczas jednej operacji rozdzielczej. Najkorzystniejsze warunki rozdzielania ekdysteroidów, z zastosowaniem TLC zaproponowała Báthori [24] zarówno w warunkach normalnych jak i odwróconych układów faz. Zaproponowała warunki dwuwymiarowej chromatografii cienkowarstwowej pozwalające na rozdzielanie kilkunastu ekdysteroidów obecnych w badanych ekstraktach roślinnych.

Optymalnym rozwiązaniem wydaje się opracowanie metodyki opartej o wielowymiarowe oraz wielostopniowe rozdzielanie ekdysteroidów, dwu- lub wyżej wymiarowe (HPLC oraz UPLC), ze względu na zwiększoną wydajność i rozdzielczość tychże układów. W szczególności zastosowanie elucji gradientowej,



również jako dwuwymiarowej wysokosprawnej chromatografii cieczowej, do rozdzielania i oznaczania bogatych w ekdysteroidy ekstraktów, wydaje się być bardziej celowe ze względu na zwiększoną sprawność i selektywność tych układów w porównaniu do układów izokratycznych. Dalsze prace badawcze powinny być skoncentrowane na rozdzielaniu i oznaczaniu ekdysteroidów w ekstraktach *Rhaponticum carthamoides*, oraz innych roślin zawierających te metabolity.

## Literatura

### (References)

1. Lotocka B., Geszprych A., *Anatomy of the vegetative organs and secretory structures of Rhaponticum carthamoides (Asteraceae)*. Bot. J. Linn. Soc., **144** (2004) 207.,
2. Timofeev N.P., *Leuzea carthamoides DC.: Application prospects as pharmpreparations and biologically active components*. Functional Foods for Chronic Diseases, D&A Inc. 2006.,
3. Kokoska L., Janovska D., *Chemistry and pharmacology of Rhaponticum carthamoides: A review*. Phytochemistry **70** (2009) 842.,
4. Zhang X.-P., Zhang J., Dong M., Zhang M.-L., Hou C.-H., Shi Q.-W., Gu Y.-C., *Chemical constituents of plant from the genus Rhaponticum*. Chem Biodivers **7** (2010) 594.,
5. Janovská D., Klouček P., Urban J., Vaněk T., Rada V., Kokoška L. *Susceptibility of some clinical isolates of Staphylococcus aureus to fractions from the aerial parts of Leuzea carthamoides*. Biologia **63** (2008) 607.,
6. Le Bizec B., Antignac J.-P., Monteau F., Andre F. *Ecdysteroids: one potential new anabolic family in breeding animals*. Anal Chim Acta **473** (2002) 89.,
7. Miliauskas G., Venskutonis R.P., van Beek T.A. *Screening of radical scavenging activity of some medicinal and aromatic plant extracts*. Food Chem **85** (2004) 231.,
8. Miliauskas G., van Beek T.A., de Waard P., Venskutonis R.P., Sudhölter E.J.R. *Identification of radical Scavenging Compounds in Rhaponticum carthamoides by means of LC-DAD-SPE-NMR*. J Nat Prod **68** (2005) 168.,
9. Todorov I.N., Mitrokhin Yu.I., Efremova O.I., Sidorenko L.I. *Effect of Extract from Rhaponticum carthamoides on RNA and Protein Biosynthesis in Mice*. Pharm Chem J-USSR **34** (2000) 479.,
10. Biskup E., Lojkowska E., *Evaluation of biological activities of Rhaponticum carthamoides extracts*. J Med Plants Res **3** (2009) 1092.,
11. Biskup E., Szyklarz B., Golebiowski M., Borsuk K., Stepnowski P., Lojkowska E., *Composition and biological activity of Rhaponticum carthamoides extracts obtained from plants collected in Poland and Russia*. J Med Plants Res **11** (2013) 687.,
12. Adler J.H., Grebenok R.J., *Biosynthesis and distribution of Insect-molting hormones in plants – A review*. Lipids **30** (1995) 257.,
13. Timofeev N.P., *Ecological relations of agricultural populations of ecdysteroid-containing plants Rhaponticum carthamoides (Willd.) Iljin and Serratula coronata L. with herbivorous insects Report 2. Composition variability of phytoecdysteroids in agrocenoses and their role in the vulnerability of plants to phytophagans*. Contemp Probl Ecol **2** (2009) 531.,
14. Baltaev U.A. *Phytoecdysteroids: structure, sources, and biosynthesis in plants*. Russ J Bioorg Chem **26** (2000) 799.,
15. Lafont R., Blais C., Harmatha J., Wilson I.D., *Ecdysteroids: Chromatography*.w: Encyclopedia of Separation Science (2000) 2631.,
16. Adler H., Grebenok R. J., *Occurrence, Biosynthesis, and Putative Role of Ecdysteroids in Plants*, Crit Rev Biochem Mol **34** (1999) 253.,
17. Píš J., Hykl J., Vaisar T., Harmatha J., *Rapid determination of 20-hydroxyecdysteroids in complex mixtures by solid-phase extraction and mass spectrometry*. J Chromatogr A **658** (1994) 77.,
18. Báthori M., Pongracz Z., *Phytoecdysteroids – From Isolation to Their Effects on Humans*. Curr Med Chem **12** (2005) 153.,
19. Lafont R., Kaouadji N., Morgan E.D., Wilson I.D., *Selectivity in the high-performance liquid chromatography of ecdysteroids*. J Chromatogr A **658** (1994) 55.,
20. Wilson I.D., Bielby C.R., Morgan E.D., *Selective effects of mobile and stationary phases in reversed-phase high-performance liquid chromatography of ecdysteroids*. J Chromatogr A **238** (1982) 97.,
21. Dinan L., Harmatha J., Lafont R. *Chromatographic procedures for the isolation of plant steroids*. J Chromatogr A **935** (2001) 105.,
22. Báthori M., *Purification and characterization of plant ecdysteroids of Silene species*. Trends Anal. Chem **17** (1998) 372.,
23. Lapenna S., Dinan L., *HPLC and TLC characterisation of ecdysteroid alkyl ethers*. J Chromatogr B **877** (2009) 2996.
24. Báthori M., Blunden G., Kalasz H., *Two-Dimensional Thin-Layer Chromatography of Plant Ecdysteroids*. Chromatographia **52** (2000) 815.,

25. Báthori M., Mathe I., Guttman A., *Determination of 20-hydroxyecdysone content by TLC and Micellar electrokinetic chromatography*. *Chromatographia* **48** (1998) 145.,
26. 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* **935** (2001) 309.,
27. Buděšínský M., Vokáč K., Harmatha J., Cvačka J. *Additional minor ecdysteroid components of Leuzea carthamoides*. *Steroids* **73** (2008), 502.,
28. Lafont R., Morgan E.D., Wilson I.D. *Chromatographic procedures for phytoecdysteroids*. *J Chromatogr A* **658** (1994) 31.,
29. Ghosh D., Laddha K.S., *Extraction and monitoring of phytoecdysteroids through HPLC*. *J Chromatogr Sci* **44** (2006) 22.,
30. Volodin V., Chadin I., Whiting P., Dinan L. *Screening plants of European North-East Russia for ecdysteroids*. *Biochem Syst Ecol* **30** (2002) 525.,
31. Wilson I.D., Morgan E.D., Lafont R., Wright B., *High-performance liquid chromatography coupled to nuclear magnetic resonance spectroscopy: Application to the ecdysteroids of Silene otites*. *J Chromatogr A* **799** (1998) 333.,
32. 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 otites*. *Chromatographia* **49** (1999) 374.,
33. Ramazanov N.Sh., Maksimov E.S., Saatov Z., Abdullaev N.D., *Phytoecdysteroids of plants of the genus Rhaponticum II. Carthamosterone A from Rh. carthamoides*. *Chem Nat Compd* **33** (1997) 301.