

## АНАЛІЗ ТА УЗАГАЛЬНЕННЯ КЛЮЧОВИХ МЕТОДІВ ЕКСТРАКЦІЇ, ВИДІЛЕННЯ ТА ХАРАКТЕРИСТИКИ БІОЛОГІЧНО АКТИВНИХ СПОЛУК, ОТРИМАНИХ З ЕКСТРАКТІВ РОСЛИН

Прозорова Г.О.<sup>1</sup>, Соколик О.П.<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Приватний заклад вищої освіти  
Міжнародний класичний університет ім. Пилипа  
Орлика,

<sup>2</sup>Одеський національний медичний університет

**Вступ.** Препарати на основі сполук рослинного походження досягли надзвичайно високого рівня прийнятності як терапевтичні засоби для багатьох захворювань, головним чином завдяки широкому використанню сучасною медициною, наприклад антибіотиків, стероїдів та інших синтетичних препаратів. Зростаюча популярність лікарських засобів рослинного походження призводить до швидкого зростання ринку даних лікарських засобів, фармацевтичних препаратів, нутрицевтиків, функціональних харчових продуктів і навіть косметичних засобів [1]. Розробка автентичних аналітичних методів для комплексних лікарських засобів рослинного походження, особливо політрав'яних рецептур, які допоможуть надійно сформулювати фітохімічний склад, включаючи кількісний аналіз маркерних біоактивних сполук та інших основних компонентів, є серйозним та актуальним питанням для багатьох вчених. Стандартизація є важливим кроком для встановлення послідовної біологічної активності, послідовного хімічного профілю або програми забезпечення якості виробництва лікарських засобів рослинного походження [2].

Інгредієнти фітопрепаратів оцінюються на якість насамперед для їх безпеки. Однак, оскільки це складні суміші різних груп вторинних метаболітів рослин, збереження загальної фітохімічної консистенції рослинних препаратів є вирішальним для їхньої ефективності. Автентичність і однорідність трав та суворі режими фізичної обробки й виробництва екстракту є критичними факторами для підтримки фітохімічної консистенції у кінцевих продуктах [3]. Для гарантії безпеки та ефективності лікарських засобів рослинного походження, впроваджені та суворо дотримуються належна сільськогосподарська практика та практика збирання (Good agriculture and collection practice, GACP), належна практика аутентифікації та ідентифікації рослин (Good plant authentication and identification practice GRAIP), належна виробнича практика (Good manufacturing practice, GMP), а також належна лабораторна практика (Good laboratory practice, GLP). Розробка і застосування лабораторно підтверджених методів екстракції, виділення та характеристики біологічно активних сполук є додатковими вимогами до забезпечення якості [4].

**Мета дослідження.** Проведення порівняльного аналізу та узагальнення ключових методів екстракції, виділення та характеристики біологічно активних сполук, отриманих з екстрактів рослин, базуючись на досвіді власних експериментальних робіт і літературних джерел.

**Матеріали і методи.** Для проведення даного дослідження було застосовано наступні методи аналізу сполук, отриманих з екстрактів рослин: спектрофотометрія, тонкошарова та високоефективна рідинна хроматографія, імуноферментний аналіз на основі моноклональних антитіл, фітохімічний скринінговий аналіз, інфрачервона спектроскопія з перетворенням Фур'є, екстрагування в апараті з мішалкою та методом настоювання. Використовували спектрофотометричний метод аналізу та математичне моделювання з використанням програмного пакету Excel та Mathcad. Також було проаналізовано літературні джерела вітчизняних і закордонних авторів, які вивчали методи екстракції, виділення та характеристики біологічно активних сполук, отриманих з екстрактів рослин.

**Результати та обговорення.** Екстракція є найважливішим першим кроком в аналізі лікарських рослин, оскільки необхідно витягти з рослинної сировини потрібні хімічні компоненти для подальшого поділу та характеристики. Основна процедура включає такі етапи, як попереднє промивання, сушіння рослинних матеріалів або сублімаційна сушка, подрібнення для отримання однорідного зразка і часто покращення кінетики аналітичного вилучення, а також збільшення контакту поверхні зразка з системою розчинників. Необхідно вжити належних заходів, щоб гарантувати, що потенційні активні компоненти не будуть втрачені, спотворені або зруйновані під час приготування екстракту із зразків рослин. Вибір системи розчинників значною мірою залежить від специфічної природи біологічно активної сполуки, на яку направляється. Для вилучення біоактивної сполуки з натуральних продуктів доступні різні системи розчинників. Для екстракції гідрофільних сполук використовуються полярні розчинники, такі, як метанол, етанол або етилацетат. Для вилучення ліпофільних сполук використовують дихлорметан або суміш дихлорметан / метанол у співвідношенні 1:1. У деяких випадках для видалення хлорофілу використовується екстракція гексаном [5].

Оскільки цільові сполуки можуть бути як неполярними, так і полярними, термічно лабільними, слід розглянути придатність різних методів екстракції. Для добування зразків рослин зазвичай використовуються різні методи, такі як ультразвукова обробка, нагрівання зі зворотним охолодженням, екстракція Сокслета та інші. Крім того, рослинні екстракти також отримують шляхом мацерації або перколяції свіжих зелених рослин або висушених порошкоподібних рослинних матеріалів у воді та / або системах органічних розчинників [6].

Для проведення екстракції Сокслета використовуються звичайні розчинники – метанол, етанол або суміш спирту та води, кімнатної температури, тиск не застосовується, час проведення процедури – 3-4 дні, необхідний об'єм розчинника залежить від розміру вибірки. Для проведення екстракції Сокслета у випадку соніфікації також використовуються звичайні розчинники, такі як метанол, етанол або суміш спирту та води, температура залежить від варіанту розчинника, тиск не застосовується, час проведення процедури – 3-18 год, необхідний об'єм розчинника 150-200 мл. Для процедури мацерації при екстракції Сокслета в якості розчинника застосовують метанол, етанол або суміш спирту та води, дану суміш можна нагріти, тиск не застосовується, час проведення процедури – 1 год, необхідний об'єм розчинника 50-100 мл [7].

Інші сучасні методи екстракції включають твердофазну мікроекстракцію, екстракцію надкритичною рідиною, екстракцію рідиною під тиском, екстракцію за допомогою мікрохвиль, твердофазну екстракцію та методики, опосередковані поверхнево-активними речовинами, які мають певні переваги. Серед позитивних моментів слід зазначити наступні: зменшення споживання органічних розчинників та деградації зразка, усунення додаткових етапів очищення зразка та концентрування перед хроматографічним аналізом, покращення ефективності екстракції, селективності та кінетики екстракції. Легкість автоматизації цих методів також сприяє їх широкому використанню для добування рослинних матеріалів [8].

У зв'язку з тим, що рослинні екстракти зазвичай зустрічаються у вигляді комбінації різних типів біоактивних сполук або фітохімічних речовин з різною полярністю, їх розділення все ще залишається великою проблемою для процесу ідентифікації та характеристики біоактивних сполук. Звичайною практикою при виділенні цих біологічно активних сполук є низка різних методів розділення, таких, як тонкошарова хроматографія (ТШХ), колонкова хроматографія, флеш-хроматографія, хроматографія на колонці з сефадексом та високоефективна рідинна хроматографія (ВЕРХ), для отримання чистих сполук. Потім чисті сполуки використовуються для визначення структури та біологічної активності. Крім того, нехроматографічні методи, такі, як імуноаналіз, котрий використовує моноклональні антитіла (МАТ), фітохімічний скринінговий аналіз, інфрачервона спектроскопія з перетворенням Фур'є (ІСПФ) також можна використовувати для отримання та полегшення ідентифікації біологічно активних сполук [9].

ТШХ – це проста, швидка та недорога процедура, яка дає досліднику швидку відповідь щодо того, скільки компонентів міститься в суміші. ТШХ також використовується для підтвердження ідентичності сполуки в суміші, коли  $R_f$  невідомої сполуки порівнюють з  $R_f$  відомої сполуки. Додаткові випробування включають розпилення фітохімічних реагентів для скринінгу, які викликають зміну

кольору відповідно до фітохімічних речовин, що містяться в екстракті рослин та аналіз пластини під ультрафіолетовим світлом. Це також використовувалося для підтвердження чистоти та ідентичності ізольованих сполук [10].

Біоавтографія є корисною технікою для визначення біоактивної сполуки з антимікробною активністю з рослинного екстракту. Біоавтографічні методи ТШХ поєднують хроматографічне розділення та визначення активності *in situ*, що полегшує локалізацію та цільове виділення активних компонентів у суміші. Традиційно біоавтографічна техніка використовує інгібування росту мікроорганізмів для виявлення антимікробних компонентів екстрактів, хроматографованих на шарі ТШХ. Ця методологія вважається найефективнішою для виявлення антимікробних сполук. Біоавтографія локалізує антимікробну дію на хроматограмі за допомогою трьох підходів: пряма біоавтографія, коли мікроорганізм росте безпосередньо на пластині для тонкошарової хроматографії, контактна біоавтографія, де антимікробний засіб сполуки переносяться з планшету для ТШХ на інокульовану агарову пластину шляхом прямого контакту та біоавтографії накладення агару, де засіяне агарове середовище наноситься безпосередньо на планшет для ТШХ. Зони інгібування, отримані на пластинках для ТШХ за допомогою однієї з вищевказаних біоавтографічних технік, будуть використовуватися для візуалізації положення біоактивної сполуки з антимікробною активністю в відбитку ТШХ з посиленням на значення  $R_f$ . Препаративні планшети для ТШХ товщиною 1 мм готують з використанням тих самих стаціонарних і рухливих фаз, що й вище, з метою виділення біоактивних компонентів, які виявляють антимікробну активність щодо досліджуваного штаму. Ці ділянки зішкрябають з пластин, а речовина елююється з діоксиду кремнію етанолом або метанолом. Елюйовані зразки додатково очищають за допомогою описаного вище методу препаративної хроматографії. Компоненти ідентифікують за допомогою ВЕРХ, рідинної хроматомас-спектрометрії (РХМС) та газової хроматографії з мас-спектрометрією (ГХМС). Хоча даний метод має високу чутливість, його застосування обмежено мікроорганізмами, які легко ростуть на пластинках ТШХ [11]. Іншими проблемами є необхідність повного видалення залишкових малолетких розчинників, таких як  $n$ -BuOH, трифторуксусної кислоти та аміаку та перенесення активних сполук із нерухомої фази в шар агару шляхом дифузії. Оскільки біоавтографія дозволяє локалізувати антимікробну активність екстракту на хроматограмі, вона підтримує швидкий пошук нових антимікробних агентів за допомогою ізоляції під контролем біоаналізу. Метод біоавтографічного накладання агару має перевагу в тому, що він використовує дуже малу кількість зразка в порівнянні зі звичайним методом дискової дифузії, а отже, його можна використовувати для виділення сполук під контролем біоаналізу. Оскільки неочищений екстракт розділяється на різні

компоненти, цей метод спрощує процес ідентифікації та виділення біологічно активних сполук [12].

ВЕРХ є універсальною, надійною та широко використовуваною технікою для виділення натуральних продуктів. В даний час ця методика набуває популярності серед різних аналітичних методик як основний вибір для контролю якості рослин. Натуральні продукти часто виділяють після оцінки відносно неочищеного екстракту в біологічному аналізі з метою повної характеристики активної речовини. Біологічно активна речовина часто присутня лише як другорядний компонент в екстракті, а роздільна здатність ВЕРХ ідеально підходить для швидкої обробки таких багатокомпонентних зразків як в аналітичному, так і в препаративному масштабі. Зараз багато настільних приладів ВЕРХ мають модульну конструкцію і включають насос для подачі розчинника, пристрій для введення проби, такий, як автоматичний пробовідбірник або ручний інжекційний клапан, аналітичну колонку, захисну колонку, детектор і ресстратор або принтер [13].

Хімічне розділення можна здійснити за допомогою ВЕРХ, використовуючи той факт, що певні сполуки мають різні швидкості міграції для конкретної колонки та рухомої фази. Ступінь поділу здебільшого визначається вибором стаціонарної фази та рухомої фази. Як правило, ідентифікацію та поділ фітохімічних речовин можна здійснити за допомогою ізократичної системи (використовуючи єдину незмінну рухому фазову систему). Градієнтне елюювання, при якому співвідношення органічного розчинника і води змінюється з часом, може бути бажаним, якщо досліджується більше одного компонента зразка і значно відрізняються один від одного утриманням у застосовуваних умовах [14].

Очищення речовини за допомогою ВЕРХ – це процес відділення або вилучення цільової сполуки від інших (можливо структурно пов'язаних) сполук або забруднювачів. Кожна сполука повинна мати характерний пік за певних хроматографічних умов. Залежно від того, що потрібно розділити та наскільки тісно пов'язані зразки, хроматограф може вибрати умови, такі, як належна рухлива фаза, швидкість потоку, відповідні детектори та колонки для отримання оптимального поділу.

Щоб ідентифікувати будь-яку сполуку за допомогою ВЕРХ, спочатку потрібно вибрати детектор. Після того, як детектор вибрано та встановлено на оптимальні параметри виявлення, необхідно розробити аналіз поділу. Параметри цього аналізу повинні бути такими, щоб на хроматографі спостерігався чистий пік відомого зразка. Ідентифікаційний пік повинен мати розумний час утримування і добре відділятися від сторонніх піків на рівнях виявлення, на яких буде проводитися аналіз. УФ-детектори популярні серед усіх детекторів, оскільки вони забезпечують високу чутливість, адже більшість природних сполук мають поглинання УФ-променів на низьких довжинах хвилі (190-210 нм). Якщо сполука, що цікавить, присутня

лише в невеликих кількостях у зразку, висока чутливість УФ-виявлення є перевагою. Крім ультрафіолетового випромінювання, для виявлення фітохімічних речовин також використовуються інші методи виявлення, серед яких детектор із діодною матрицею (ДДМ) у поєднанні з мас-спектрометром (МС). Рідинна хроматографія в поєднанні з мас-спектрометрією (РХ/МС) також є потужним методом для аналізу складних рослинних екстрактів. Вона надає велику кількість інформації для з'ясування структури сполук при тандемній мас-спектрометрії (МС<sup>n</sup>). Комбінація ВЕРХ і МС сприяє швидкій та точній ідентифікації хімічних сполук у лікарських травах, особливо коли чистий стандарт недоступний [15].

Обробка сирого вихідного матеріалу для отримання зразка, придатного для аналізу ВЕРХ, а також вибір розчинника для відновлення зразка можуть мати значний вплив на загальний успіх виділення природного продукту. Вихідний матеріал, наприклад, висушену порошокподібну рослину, спочатку потрібно буде обробити таким чином, щоб гарантувати, що потрібне з'єднання ефективно вивільняється у розчин. У разі висушеного рослинного матеріалу органічний розчинник (наприклад, метанол, хлороформ) може бути використаний як початковий екстрагент, і після періоду мацерації твердий матеріал потім видаляють шляхом декантації екстракту шляхом фільтрації. Потім фільтрат концентрують і вводять у ВЕРХ для поділу. При аналізі сирого екстракту необхідно використовувати захисні колонки. Багато натуральних матеріалів містять значний рівень сильно зв'язуючих компонентів, таких як хлорофіл та інші ендogenous матеріали, які в довгостроковій перспективі можуть погіршити ефективність аналітичних колонок [16]. Тому протекторні властивості захисних колонок подовжують термін служби аналітичних колонок.

Імуноаналіз, який використовує моноклональні антитіла проти ліків і низькомолекулярних природних біоактивних сполук, стає важливим інструментом в аналізі біоактивних сполук. Цей метод демонструє високу специфічність і чутливість для аналізу зв'язування рецепторів, ферментних і якісних аналізів і кількісних аналітичних методів. Імуноферментний аналіз (ІФА) на основі МАТ у багатьох випадках є більш чутливим, ніж звичайні методи ВЕРХ. Моноклональні антитіла можна виробляти в спеціалізованих клітинах за допомогою техніки, відомої як гібридомна технологія. У виробництві моноклональних антитіл за технологією гібридоми проти рослинних препаратів беруть участь наступні етапи: кролика імунізують шляхом повторної ін'єкції специфічних рослинних препаратів для вироблення специфічних антитіл завдяки проліферації бажаних В-клітин. Пухлини утворюються у миші або кролика. З наведених вище двох типів тварин клітини селезінки (ці клітини багаті В-клітинами і Т-клітинами) культивують окремо. Культивовані клітини селезінки виробляють специфічні антитіла

проти рослинного препарату та проти клітин міеломи, які утворюють пухлини. Продукція гібридами шляхом злиття клітин селезінки з клітинами міеломи індукується за допомогою поліетиленгліколю (ПЕГ). Гібридні клітини вирощують у середовищі селективного гіпоксантину аміноптерин тимідину (ГАТ) [17]. Бажану гібридому відбирають для клонування та виробництва антитіл проти рослинного препарату. Цьому процесу сприяє підготовка одноклітинних колоній, які будуть рости і можуть бути використані для скринінгу гібридом, що продукують антитіла. Відібрані гібридомні клітини культивують для виробництва моноклональних антитіл у великій кількості проти специфічних рослинних препаратів. Моноклональні антитіла використовуються для визначення аналогічних препаратів у суміші екстрактів рослин за допомогою ІФА.

Фітохімічні речовини – це хімічні речовини, отримані з рослин, і цей термін часто використовується для опису великої кількості вторинних метаболічних сполук, що містяться в рослинах. Фітохімічний скринінговий аналіз – це проста, швидка та недорога процедура, яка дає досліднику швидку відповідь про різні типи фітохімічних речовин у суміші та є важливим інструментом для аналізу біоактивних сполук. Після отримання неочищеного екстракту або активної фракції з рослинної сировини можна провести фітохімічний скринінг за допомогою відповідних тестів, щоб отримати уявлення про тип фітохімічних речовин, що містяться в суміші або фракції екстракту [18].

Для виявлення вторинних метаболітів алкалоїдів застосовують пробу Драгендорфа: наносять краплю екстракту на невеликий шматочок попередньо покритої пластини для ТШХ, покривають пластину реактивом Драгендорфа, отримують помаранчевого кольору пляму. Також для фітохімічного скринінгу алкалоїдів проводять тест Вагнера – додають 2 мл фільтрату з 1% HCl + пар. Потім додають 1 мл розчину з 6 краплями реактиву Вагнера, у підсумку з'явиться коричнево-червоний осад. Метод ТШХ 1 для алкалоїдів складається із система розчинників: хлороформ: метанол: 25% аміак (8:2:0,5), плями помаранчевого кольору можна виявити після обприскування реактивом Драгендорфа. Метод ТШХ 2 для фітохімічного скринінгу алкалоїдів полягає в наступному: змочують порошокподібні досліджувані зразки наполовину розведеним NH<sub>4</sub>OH і вилушують EtOAc протягом 24 годин при кімнатній температурі. Відокремлюють органічну фазу від підкисленого фільтрату та підключають NH<sub>4</sub> OH (pH 11-12). Потім екстрагують його хлороформом (3X), конденсують випарюванням і використовують для хроматографії. Відокремте алкалоїдні плями за допомогою суміші розчинників хлороформу та метанолу (15:1). Після обприскування плями реактивом Драгендорфа з'являється помаранчева пляма [19]. Фітохімічний скринінг вторинних метаболітів антрахінонів проводять за допомогою тесту

Борнтрейгера. Для цього нагрівають близько 50 мг екстракту з 1 мл 10% розчину хлориду заліза та 1 мл концентрованої соляної кислоти. Потім охолоджують екстракт і фільтрують. Фільтрат струшують з рівною кількістю діетилового ефіру. Далі екстрагують ефірний екстракт сильним аміаком. У підсумку виявляють рожеве або темно-червоне забарвлення водного шару. Також тест Борнтрейгера можна проводити у 2 мл екстракту хлороформу із додаванням 1 мл розведеного (10 %) аміаку, отримуючи рожево-червоне забарвлення в аміачному (нижньому) шарі [20].

Фітохімічний скринінговий аналіз вторинних метаболітів серцевих глікозидів можна провести кількома способами. Один із них – це тест Келлара – Кіліані, під час якого додають 2 мл фільтрату з 1 мл крижаної оцтової кислоти, 1 мл хлориду заліза та 1 мл концентрованої сірчаної кислоти. Результат реакції – зелено-блакитне забарвлення розчину. Для тесту Келлара-Кіліані також можна розчинити 50 мг метанольного екстракту в 2 мл хлороформу і додати H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> для утворення шару, а саме коричневого кільця в інтерфазі. Методом ТШХ для фітохімічного скринінгового аналізу вторинних метаболітів серцевих глікозидів екстрагують порошокподібні зразки 70% EtOH на ротаційній шейкері (180 /хв) протягом 10 год. Далі додають 70% ацетат свинцю до фільтрату та центрифугують при 5000 об/хв/10 хв. Наступним кроком центрифугують супернатант, додаючи 6,3% Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> при 10000 об/хв/10 хв. Надосадову рідину, що залишилася, висушують і повторно розчиняють у хлороформі та використовують для хроматографії. Розділяють глікозиди за допомогою суміші розчинників EtOAc-MeOH-H<sub>2</sub>O (80:10:10). Значення кольору та hRf цих плям можна записати в ультрафіолетовому (UV254 nm) світлі [21].

Фітохімічний скринінговий аналіз вторинних метаболітів флавоноїдів проводять за допомогою тесту Шинода – до 2-3 мл метанольного екстракту додають шматочок магнієвої стрічки та 1 мл концентрованої соляної кислоти, отримуючи рожево-червоне або червоне забарвлення розчину. Методом ТШХ екстрагують 1 г порошокподібних тестових зразків 10 мл метанолу на водяній бані (60°C/5 хв). Конденсують фільтрат шляхом випарювання, додають суміш води та EtOAc (10:1 мл) і ретельно перемішують. Зберігають фазу EtOAc і використовують для хроматографії. Відокремлюють плями флавоноїдів за допомогою суміші розчинників хлороформу та метанолу (19:1). Значення кольору та hRf цих плям можна записати в ультрафіолетовому (UV254nm) світлі. Тест на NaOH передбачає обробку екстракту розведеним NaOH з подальшим додаванням розведеної HCl. Жовтий розчин з NaOH стає безбарвним при розведеній HCl [22].

Для фітохімічного скринінгу вторинних метаболітів фенолів використовують фенольний тест, а саме наносять екстракт на фільтрувальний папір, додають краплю реактиву фосомолібденової

кислоти і пари аміаку до утворення синього забарвлення плями.

Детекція вторинних метаболітів флорбатану відбувається шляхом кип'ятіння у 2 мл екстракту з 2 мл 1% хлористоводневої кислоти HCl до утворення червоних осадів.

Скринінг вторинних метаболітів піролізидинових алкалоїдів потребує наступної методики. Готують 1 мл окислювача, що складається з 0,01 мл перекису водню (30% мас/об), стабілізованого тетранатрій пірофосфатом (20 мг/мл) і доведеного до 20 мл ізоамілацетатом, і додають до 1 мл рослинного екстракту. Перемишують зразок і додають 0,25 мл оцтового ангідриду перед нагріванням зразка при 60°C протягом 50-70 с. Охолоджують зразки до кімнатної температури. Далі додають 1 мл реактиву Ерліха і поміщають пробірки на водяну баню (60°C) на 5 хв. Вимірюють поглинання при 562 нм. Спосіб Holstege et al. (1995) слід використовувати для підтвердження результатів скринінгового методу. Піки порівнюють з бібліотекою РХ-МС [23].

Тест Фелінга проводиться для детекції вторинних метаболітів відволених цукрів, до 5 мл водного екстракту в пробірку додати 25 мл розведеної сірчаної кислоти (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) і кип'ятити 15 хв. Потім охолоджують і нейтралізують 10% гідроксидом натрію до рН 7 і 5 мл розчину Фелінга із отриманням цегляно-червоного осаду.

Фітохімічний скринінговий аналіз вторинних метаболітів сапонінів проводять за допомогою тесту на піну - додають 0,5 мл фільтрату з 5 мл дистильованої води і добре збовтують, оцінюючи стійкість спінювання. Методом ТШХ екстрагують два грами порошкоподібних досліджуваних зразків 10 мл 70% EtOH шляхом кип'ятіння із зворотним холодильником протягом 10 хв. Фільтрат сконденсують, збагачують насиченим n-BuOH і ретельно перемишують. Зберігають бутанол, конденсують і використовують для хроматографії. Розділюють сапоніни, використовуючи суміш розчинників хлороформу, крижаної оцтової кислоти, метанолу та води (64:34:12:8). Далі піддають хроматограму впливу парів йоду. Колір (жовтий) і значення hRf цих плям реєструють шляхом впливу на хроматограму парів йоду [24].

Детекцію вторинних метаболітів стероїдів можна зробити за допомогою теста Лібермана-Бурхардта, додаючи до 1 мл метанольного екстракту 1 мл хлороформу, 2-3 мл оцтового ангідриду, 1-2 краплі концентрованої сірчаної кислоти до появи темно-зеленого забарвлення. Також можна до 1 мл екстракту додати 2 мл оцтового ангідриду та 2 мл концентрованої сірчаної кислоти H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> із зміною кольору на синій або зелений. Методом ТШХ екстрагують два грами порошкоподібних тестових зразків 10 мл метанолу на водяній бані (80°C/15 хв). Конденсований фільтрат використовують для хроматографії. Стерини можна розділити за допомогою суміші розчинників хлороформу, крижаної оцтової кислоти, метанолу та води (64:34:12:8). Колір і значення hRf цих плям можна

записати під видимим світлом після розпилення пластин реагентом анізальдегідсульфатної кислоти та нагрівання (100°C/6 хв). Колір (від зеленувато-чорного до рожево-чорного) і значення hRf цих плям можна записати при видимому світлі [25].

Для визначення вторинних метаболітів таніну використовують тест Бремера – 10% спиртового хлориду заліза додають до 2-3 мл метанольного екстракту (1:1), в результаті забарвлення розчину буде темно-синє або зеленувато-сіре.

Вторинні метаболіти терпеноїдів визначають за допомогою тесту Лібермана-Бурхардта. Додаючи до 1 мл метанольного екстракту 1 мл хлороформу, 2-3 мл оцтового ангідриду, 1-2 краплі концентрованої сірчаної кислоти із одержанням рожевого або червоного забарвлення. Тест Сальковського полягає в тому, що до 5 мл екстракту додають 2 мл хлороформу та 3 мл концентрованої сірчаної кислоти H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, отримуючи червоно-коричневий колір [26].

Детекцію вторинних метаболітів ефірних олій проводять за допомогою наступної реакції – додають 2 мл екстракту з 0,1 мл розведеного NaOH і невеликою кількістю розведеної HCl. Розчин струшують до утворення білих осадів.

Інфрачервона спектроскопія з перетворенням Фур'є є цінним інструментом для характеристики та ідентифікації сполук або функціональних груп (хімічних зв'язків), присутніх у невідомій суміші рослинного екстракту. Крім того, спектри чистих сполук зазвичай настільки унікальні, що вони схожі на молекулярний «відбиток пальця». Для більшості поширених рослинних сполук спектр невідомої сполуки можна ідентифікувати шляхом порівняння з бібліотекою відомих сполук. Зразки для інфрачервоної спектроскопії з перетворенням Фур'є можна готувати кількома способами. Для рідких зразків найпростіше помістити одну краплю зразка між двома пластинами хлориду натрію. Крапля утворює тонку плівку між пластинами. Тверді зразки можна подрібнити за допомогою броміду калію (KBr), а потім спресувати в тонку гранулу, яку можна аналізувати. В іншому випадку тверді зразки можна розчинити в розчиннику, такому, як метиленхлорид, і потім помістити розчин на одну сольову пластину. Потім розчинник випаровують, залишаючи на пластині тонку плівку вихідного матеріалу [27].

**Висновок.** Оскільки біоактивні сполуки, що містяться в рослинному матеріалі, складаються з багатокомпонентних сумішей, їх розділення та визначення все ще має багато відкритих питань та проблем. Практично більшість з них має бути очищена комбінацією кількох хроматографічних методів та інших методів очищення для виділення біологічно активних сполук.

**Analysis and generalization of key extraction methods, isolation and characteristics of biologically active substances obtained from plant extracts**

**Prozorova Galina Olexandrivna, Sokolik Olena Petrivna**

**Introduction.** Development of authentic methods for analysis complex herbal medicines, especially poly-herbal formulations, to help reliably formulate phytochemical contents, including quantitative analysis of marker biologically active substances and other essential components, is a serious and pressing issue for many scientists. **Materials and methods.** The following methods of analysis of compounds obtained from plant extracts were used for this study: spectrophotometry, thin-layer and high-performance liquid chromatography, enzyme-linked immunosorbent assay based on monoclonal antibodies, phytochemical screening analysis, Fourier transform infrared spectroscopy. Spectrophotometric method of analysis and mathematical modeling using Excel and Mathcad software packages were used. Literary sources of domestic and foreign authors who studied the methods of extraction, isolation and characteristics of biologically active substances obtained from plant extracts were also analyzed. **Results and discussion.** Polar solvents such as methanol, ethanol or ethyl acetate are used to extract the hydrophilic compounds. To remove lipophilic compounds use dichloromethane or a mixture of dichloromethane / methanol in a ratio of 1:1. In some cases, hexane extraction is used to remove chlorophyll. For Soxhlet extraction the usual solvents are used – methanol, ethanol or a mixture of alcohol and water, room temperature, pressure is not used, the procedure time is 3-4 days, the required amount of solvent depends on the sample size. For the extraction of Soxhlet in the case of sonication also use common solvents such as methanol, ethanol or a mixture of alcohol and water, the temperature depends on the variant of the solvent, the pressure is not applied, the procedure time – 3-18 h. For the maceration procedure during Soxhlet extraction, methanol, ethanol or a mixture of alcohol and water is used as a solvent, this mixture can be heated, the pressure is not applied, the procedure time is 1 h, the required solvent volume is 50-100 ml. Other modern extraction methods include solid-phase microextraction, supercritical liquid extraction, pressurized liquid extraction, microwave extraction, solid-phase extraction, and surface active agents mediated techniques. The following separation methods are also used: thin layer chromatography, column chromatography, flash chromatography, Sephadex column chromatography and high performance liquid chromatography, enzyme-linked immunosorbent assay, phytochemical screening analysis, infrared spectroscopy and facilitating the identification of biologically active compounds. High performance liquid chromatography is a universal, reliable and widely used technique for isolating biologically active substances. This technique is gaining popularity among various analytical techniques as the main choice for plant quality control. Natural products are often isolated after evaluation of the relatively crude extract in biological analysis in order to fully characterize the active substance. The biologically active substance is often present only as a secondary component in the extract, and high

performance liquid chromatography resolution is ideal for rapid processing of such multicomponent samples on both analytical and preparative scales. Immunoassay, which uses monoclonal antibodies against drugs and low molecular weight natural bioactive compounds, is becoming an important tool in the analysis of bioactive compounds. This method demonstrates high specificity and sensitivity for receptor binding assays, enzymatic and qualitative assays, and quantitative assays. Phytochemical screening analysis is a simple, fast and inexpensive procedure that gives the researcher a quick answer about different types of phytochemicals in the mixture and is an important tool for the analysis of bioactive compounds. After obtaining the crude extract or active fraction of plant material, phytochemical screening can be performed using appropriate tests to get an idea of the type of phytochemicals contained in the mixture or fraction of the extract.

**Conclusion.** Because the bioactive compounds contained in plant material consist of multicomponent mixtures, their separation and determination still have many open questions. In practice, most of them must be purified by a combination of several chromatographic methods and other purification methods to isolate biologically active compounds.

**Keywords:** key extraction methods, isolation and characteristics, biologically active substances, plant extracts, analysis and generalization

**References**

1. Altemimi A, Lakhssassi N, Baharlouei A, Watson DG, Lightfoot DA. Phytochemicals: Extraction, Isolation, and Identification of Bioactive Compounds from Plant Extracts. *Plants (Basel)*. 2017 Sep 22;6(4):42. doi: 10.3390/plants6040042. PMID: 28937585; PMCID: PMC5750618.
2. Abubakar AR, Haque M. Preparation of Medicinal Plants: Basic Extraction and Fractionation Procedures for Experimental Purposes. *J Pharm Bioallied Sci*. 2020 Jan-Mar;12(1):1-10. doi: 10.4103/jpbs.JPBS\_175\_19. Epub 2020 Jan 29. PMID: 32801594; PMCID: PMC7398001.
3. Ayouaz S, Oliveira-Alves SC, Lefsih K, Serra AT, Bento da Silva A, Samah M, Karczewski J, Madani K, Bronze MR. Phenolic compounds from Nerium oleander leaves: microwave assisted extraction, characterization, antiproliferative and cytotoxic activities. *Food Funct*. 2020 Jul 1;11(7):6319-6331. doi: 10.1039/d0fo01180k. Epub 2020 Jul 1. PMID: 32608462.
4. Knez Hrnčič M, Cör D, Simonovska J, Knez Ž, Kavrakovski Z, Rafajlovska V. Extraction Techniques and Analytical Methods for Characterization of Active Compounds in Origanum Species. *Molecules*. 2020 Oct 15;25(20):4735. doi: 10.3390/molecules25204735. PMID: 33076426; PMCID: PMC7587584.
5. Sasidharan S, Chen Y, Saravanan D, Sundram KM, Yoga Latha L. Extraction, isolation and characterization of bioactive compounds from plants' extracts. *Afr J Tradit Complement Altern Med*. 2011;8(1):1-10. Epub 2010 Oct 2. PMID: 22238476; PMCID: PMC3218439.
6. Domínguez-Rodríguez G, Marina ML, Plaza M. Strategies for the extraction and analysis of non-

- extractable polyphenols from plants. *J Chromatogr A*. 2017 Sep 8;1514:1-15. doi: 10.1016/j.chroma.2017.07.066. Epub 2017 Jul 22. PMID: 28778531.
7. Deveci E, Tel-Çayan G, Duru ME, Öztürk M. Isolation, characterization, and bioactivities of compounds from *Fuscoptoria torulosa* mushroom. *J Food Biochem*. 2019 Dec;43(12):e13074. doi: 10.1111/jfbc.13074. Epub 2019 Oct 10. PMID: 31599026.
8. Anibogwu R, Jesus K, Pradhan S, Pashikanti S, Mateen S, Sharma K. Extraction, Isolation and Characterization of Bioactive Compounds from *Artemisia* and Their Biological Significance: A Review. *Molecules*. 2021 Nov 19;26(22):6995. doi: 10.3390/molecules26226995. PMID: 34834086; PMCID: PMC8618776.
9. Kumar KS, Sabu V, Sindhu G, Rauf AA, Helen A. Isolation, identification and characterization of apigenin from *Justicia gendarussa* and its anti-inflammatory activity. *Int Immunopharmacol*. 2018 Jun;59:157-167. doi: 10.1016/j.intimp.2018.04.004. Epub 2018 Apr 11. PMID: 29655057.
10. Pendota SC, Aremu AO, Slavětinská LP, Rárová L, Grúz J, Doležal K, Van Staden J. Identification and characterization of potential bioactive compounds from the leaves of *Leucosidea sericea*. *J Ethnopharmacol*. 2018 Jun 28;220:169-176. doi: 10.1016/j.jep.2018.03.035. Epub 2018 Mar 28. PMID: 29604376.
11. Guoruoluo Y, Zhou H, Zhou J, Zhao H, Aisa HA, Yao G. Isolation and Characterization of Sesquiterpenoids from *Cassia* Buds and Their Antimicrobial Activities. *J Agric Food Chem*. 2017 Jul 19;65(28):5614-5619. doi: 10.1021/acs.jafc.7b01294. Epub 2017 Jun 30. PMID: 28665598.
12. Wang J, Xie K, Duan H, Wang Y, Ma H, Fu H. Isolation and characterization of diterpene glycosides from *Siegesbeckia pubescens*. *Bioorg Med Chem Lett*. 2017 Apr 15;27(8):1815-1819. doi: 10.1016/j.bmcl.2017.02.051. Epub 2017 Mar 4. PMID: 28302401.
13. Thomas P, Essien E, Udoh A, Archibong B, Akpan O, Etukudo E, De Leo M, Eseyin O, Flamini G, Ajibesin K. Isolation and characterization of anti-inflammatory and analgesic compounds from *Uapaca staudtii* Pax (Phyllanthaceae) stem bark. *J Ethnopharmacol*. 2021 Apr 6;269:113737. doi: 10.1016/j.jep.2020.113737. Epub 2021 Jan 5. PMID: 33359855.
14. Hattan JI, Shindo K, Sasaki T, Misawa N. Isolation and Functional Characterization of New Terpene Synthase Genes from Traditional Edible Plants. *J Oleo Sci*. 2018;67(10):1235-1246. doi: 10.5650/jos.ess18163. PMID: 30305556.
15. Makhafola TJ, Elgorashi EE, McGaw LJ, Awouafack MD, Verschaeve L, Eloff JN. Isolation and characterization of the compounds responsible for the antimutagenic activity of *Combretum microphyllum* (Combretaceae) leaf extracts. *BMC Complement Altern Med*. 2017 Sep 6;17(1):446. doi: 10.1186/s12906-017-1935-5. PMID: 28874162; PMCID: PMC5585923.
16. Vedpal, Jayaram U, Wadhvani A, Dhanabal SP. Isolation and characterization of flavonoids from the roots of medicinal plant *Tadehagi triquetrum* (L.) H. Ohashi. *Nat Prod Res*. 2020 Jul;34(13):1913-1918. doi: 10.1080/14786419.2018.1561679. Epub 2019 Jan 30. PMID: 30698030.
17. Brillatz T, Jacmin M, Queiroz EF, Marcourt L, Slacanin I, Petit C, Carrupt PA, Bum EN, Herrling P, Crawford AD, Wolfender JL. Zebrafish bioassay-guided isolation of antiseizure compounds from the Cameroonian medicinal plant *Cyperus articulatus* L. *Phytomedicine*. 2020 Jan 23;70:153175. doi: 10.1016/j.phymed.2020.153175. Epub ahead of print. PMID: 32302934.
18. Sokoudjou JB, Atolani O, Njateng GSS, Khan A, Tagousop CN, Bitombo AN, Kodjio N, Gatsing D. Isolation, characterization and in vitro anti-salmonellal activity of compounds from stem bark extract of *Canarium schweinfurthii*. *BMC Complement Med Ther*. 2020 Oct 19;20(1):316. doi: 10.1186/s12906-020-03100-5. PMID: 33076876; PMCID: PMC7574196.
19. Das G, Patra JK, Kang SS, Shin HS. Pharmaceutical importance of some promising plant species with special reference to the isolation and extraction of bioactive compounds: A review. *Curr Pharm Biotechnol*. 2021 Jan 22. doi: 10.2174/1389201022666210122125854. Epub ahead of print. PMID: 33480340.
20. Iglesias-Carres L, Mas-Capdevila A, Bravo FI, Bladé C, Arola-Arnal A, Muguera B. Optimization of extraction methods for characterization of phenolic compounds in apricot fruit (*Prunus armeniaca*). *Food Funct*. 2019 Oct 16;10(10):6492-6502. doi: 10.1039/c9fo00353c. PMID: 31535681.
21. Al-Shabibi MHS, Al-Touby SSJ, Hossain MA. Isolation, characterization and prediction of biologically active glycoside compounds quercetin-3-rutinoside from the fruits of *Ficus sycomorus*. *Carbohydr Res*. 2021 Nov 30;511:108483. doi: 10.1016/j.carres.2021.108483. Epub ahead of print. PMID: 34864403.
22. Akhtar MS, Mir SR, Said SA, Hossain MA, Ali M. Extraction, isolation and structural characterization of two triterpenoid glycosides from the fruits of *Ficus bengalensis*. *Carbohydr Res*. 2021 Dec;510:108444. doi: 10.1016/j.carres.2021.108444. Epub 2021 Sep 28. PMID: 34607126.
23. Ma Y, Li M, Zhang H, Sun H, Su H, Wang Y, Du Z. Bioassay-guided isolation of active compounds from *Adenosma buchneroides* essential oil as mosquito repellent against *Aedes albopictus*. *J Ethnopharmacol*. 2019 Mar 1;231:386-393. doi: 10.1016/j.jep.2018.11.031. Epub 2018 Nov 22. PMID: 30471377.
24. Zhong L, Yuan Z, Rong L, Zhang Y, Xiong G, Liu Y, Li C. An Optimized Method for Extraction and Characterization of Phenolic Compounds in *Dendranthema indicum* var. *aromaticum* Flower. *Sci Rep*. 2019 May 23;9(1):7745. doi: 10.1038/s41598-019-44102-9. PMID: 31123283; PMCID: PMC6533307.
25. Liu Y, Hou Y, Si Y, Wang W, Zhang S, Sun S, Liu X, Wang R, Wang W. Isolation, characterization, and xanthine oxidase inhibitory activities of flavonoids from the leaves of *Perilla frutescens*. *Nat Prod Res*. 2020

- Sep;34(18):2566-2572. doi:  
10.1080/14786419.2018.1544981. Epub 2019 Jan 2.  
PMID: 30600717.
26. Barba FJ, Alcántara C, Abdelkebir R, Bäuerl C, Pérez-Martínez G, Lorenzo JM, Carmen Collado M, García-Pérez JV. Ultrasonically-Assisted and Conventional Extraction from *Erodium Glucophyllum* Roots Using Ethanol:Water Mixtures: Phenolic Characterization, Antioxidant, and Anti-Inflammatory Activities. *Molecules*. 2020 Apr 10;25(7):1759. doi: 10.3390/molecules25071759. PMID: 32290312; PMCID: PMC7181019.
27. Adenubi OT, Ali Abdalla M, Ahmed AS, Njoya EM, McGaw LJ, Eloff JN, Naidoo V. Isolation and characterization of two acaricidal compounds from *Calpurnia aurea* subsp. *aurea* (Fabaceae) leaf extract. *Exp Appl Acarol*. 2018 Jul;75(3):345-354. doi: 10.1007/s10493-018-0269-4. Epub 2018 May 30. PMID: 29846853.