

Разработка технологии извлечения комплекса биологически активных веществ из корневых культур *in vitro* лекарственных растений

Асякина Людмила Константиновна

ФГБОУ ВО «Кемеровский Государственный университет»

Адрес: 650000, г. Кемерово, ул. Красная, д. 6

E-mail: alk_kem@mail.ru

Фотина Наталья Вячеславовна

ФГБОУ ВО «Кемеровский Государственный университет»

Адрес: 650000, г. Кемерово, ул. Красная, д. 6

E-mail: fotina.natashenka@mail.ru

Степанова Анна Александровна

ФГБОУ ВО «Кемеровский Государственный университет»

Адрес: 650000, г. Кемерово, ул. Красная, д. 6

E-mail: annstepanova.04@mail.ru

Позднякова Анна Владимировна

ФГБОУ ВО «Кемеровский Государственный университет»

Адрес: 650000, г. Кемерово, ул. Красная, д. 6

E-mail: avp_7979@bk.ru

Пресеков Александр Юрьевич

ФГБОУ ВО «Кемеровский Государственный университет»

Адрес: 650000, г. Кемерово, ул. Красная, д. 6

E-mail: bionano_kem@mail.ru

В работе представлены результаты научных исследований по разработке технологии извлечения сухих экстрактов из биомассы корневых культур *in vitro* клеток лекарственных растений Сибирского Федерального округа кодонопсиса мелковолосистого *Codonopsis pilosula*, любки двулистной *Platanthera bifolia* и лимонника китайского *Schisandra chinensis*. В качестве метода извлечения биологически активных веществ (БАВ) из растительных образцов был применен метод экстракции по Сокслету. Оптимизация выделения экстрактов осуществлялась по трем параметрам: температуре, продолжительности процесса и соотношению объема органического растворителя к массе растительного образца (гидромодуль), т.е. данные параметры выступали в качестве изменяемых. В ходе эксперимента удалось подобрать оптимальные параметры для выделения сухих экстрактов из каждого лекарственного растения. Для кодонопсиса мелковолосистого оптимальными параметрами являются: температура экстракции 40 °C, продолжительность процесса 60 мин и соотношение объема растворителя к количеству высушенной биомассы корневых культур клеток растений 1:10. Наиболее эффективным экстрагентом в отношении *Codonopsis pilosula* является этилацетат. Для корневых культур любки двулистной применяли значения следующих параметров: температура 40 °C, продолжительность экстрагирования 60 мин, гидромодуль 1:10. Экстракцию проводили ацетоном. Процесс экстрагирования БАВ из лимонника китайского осуществляли ацетоном при температуре процесса 40 °C в течение 60 мин в соотношении экстрагента к образцу 1:10. Использование в эксперименте значений данных параметров позволит добиться максимального выхода экстрактов БАВ из лекарственных растений при минимально возможных затратах на ресурсы (затраты на время, реагенты и др.).

Ключевые слова: экстракция, лекарственные растения, БАВ, корневые культуры, параметры, органический растворитель

Введение

С давних времен лекарственные растения используются в медицине для лечения различных заболеваний. Предпочтение всегда отдается натуральным продуктам, как наиболее сбалансированным по биохимическому составу и оптимальным для организма. По данным авторов Babich, Sukhikh, Pungin, Ivanova, Asyakina, & Prosekov (Babich, et al., 2020) доля использования новых форм продуктов, полученных из растительного сырья, к началу XXI века не превышала 24 %. Использование растений сдерживается отсутствием технологий эффективного производства биологически активных веществ (БАВ) из растительного сырья, слабым развитием культивируемых ботанических видов лекарственных растений, а также отсутствием обученного персонала в этом направлении (Marchev & Georgiev, 2020). К тому же, техногенное и антропогенное воздействие на растительность приводит к гибели некоторых видов растений, что уменьшает их долю использования в промышленности. Поэтому одной из основных задач для бережного использования лекарственных растений является их культивирование в условиях *in vitro* и извлечение биологически активных веществ из выращенных в пробирке культур (Asyakina et al., 2020).

Согласно авторам Chupakhin, Babich, Prosekov, Asyakina, Gureev, & Krasavin (Chupakhin et al., 2020) в последнее время особый интерес вызывают лекарственные растения Сибирского Федерального округа как продуценты веществ вторичного синтеза, деятельность которых направлена на поддержание общего состояния здоровья, а также на лечение самых серьезных заболеваний, таких как заболевания сердечно-сосудистой системы, онкологические заболевания, диабет и др. Рассматриваемые в данной работе лекарственные растения с давних времен применяются в народной медицине. Так, авторы (Бабич, Ларина, Скрыпник, & Пунгин, 2021) в своей работе отмечают, что органы любки двулистной *Platanthera bifolia* применяются при боли в зубах, лихорадке, женских болезнях, гнойных заболеваниях и заболеваниях желудочно-кишечного тракта. Отвар из корней используется при воспалительных процессах мочевыделительной системы, отравлениях ядами, нервном перенапряжении и заживлении ран. Плоды и семя лимонника китайского *Schisandra chinensis* (Колесникова & Тагильцев, 2016) применяют в медицине. Лекарственное сырье лимонника китайского обладает адаптогенным, общетонизирующим и психостимулирующим свойствами. Содержащееся в плодах лимонника вещество схизандрин повышает возбудимость

центральной нервной системы и стимулирует сердечную и дыхательную деятельность. Лекарственное растение способно повысить работоспособность организма и снизить утомляемость при физических и умственных нагрузках. Кодонопсис мелковолосистый *Codonopsis pilosula* используется в традиционной китайской и корейской медицине. В качестве целебного материала применяются корни растения (Самылина, Булаев, & Ших, 2012). Отвар из корней кодонопсиса мелковолосистого обладает тонизирующим и стимулирующим действием, способным помогать при нефрите, сахарном диабете, раке шейки матки, гипертоническом заболевании сердца, анемии и др. Кодонопсис отличается общеукрепляющим, кровоостанавливающим, противокашлевым, отхаркивающим и болеутоляющим свойствами.

По заявлению авторов (Georgiev, Slavov, Vasileva, & Pavlov, 2018) в целом состояние здоровья населения вызывает необходимость развития и выхода отечественной науки о растениях на более высокий и современный уровень, включая использование всех возможных резервов в разработке технологий экстракции природных компонентов из лекарственных растений и их целевое использование при лечении тяжелых заболеваний (Efferth, 2019; Bibi, Khan, Adil, & Mashwani, 2018).

Выбор метода экстракции является ключевым в извлечении БАВ из лекарственного сырья, поскольку от метода зависит количество затрачиваемых ресурсов и, как следствие, целесообразность использования того или иного способа. Поэтому цель настоящей работы – разработка технологии извлечения БАВ из высушенных корневых культур *in vitro* лекарственных растений СФО любки двулистной *Platanthera bifolia*, лимонника китайского *Schisandra chinensis* и кодонопсиса мелковолосистого *Codonopsis pilosula*, и оптимизация параметров процесса экстракции.

Осуществляемые ранее исследования были направлены на извлечение биологически ценных соединений из каллусных, суспензионных и корневых культур сибирских лекарственных растений.

Материалы и методы исследования

Объекты

Экспериментальная работа проводилась над объектами, в качестве которых были выбраны корневые культуры сибирских лекарственных растений,

выращенные в условиях *in vitro* – любка двулистная *Platanthera bifolia*, лимонник китайский *Schisandra chinensis* и кодонопсис мелковолосистый *Codonopsis pilosula*.

Материалы

- органические растворители – ацетон и этилацетат;
- высушенные навески лекарственных растений;
- фильтровальная бумага;
- вода дистиллированная.

Оборудование

- стаканчики на 25 мл;
- пробирки на 50 мл;
- весы лабораторные;
- шейкер лабораторный;
- центрифуга;
- конические колбы на 100 мл;
- фарфоровые ступки с пестиками.

Процедура исследования

Над объектами исследования была проведена экстракция биологических соединений и дальнейшая оптимизация параметров процесса. Была выбрана методика экстракции БАВ из опытных образцов, используемая авторами (Асякина, Дышлюк, & Степанова, 2020). Методика также затронута в патенте № 2724487¹, Просеков, Бабич, Дышлюк, Асякина, Милентьева, & Заушинцева (2020); патенте № 2714403², Бабич, Заушинцева, Милентьева, Просеков, & Лукин (2020); патенте № 2726067³, Просеков, Бабич, Дышлюк, Асякина, Заушинцева, & Милентьева (2020). На начальном этапе требовалось получить высушенные навески образцов корневых культур *in vitro* любки двулистной, лимонника китайского и кодонопсиса мелковолосистого, массой в 1 г. После этого каждый образец помещали в пробирки на 50 мл и добавляли экстрагенты в количестве 35 мл. В качестве органического растворителя для любки двулистной и лимонника китайского использовался ацетон, кодонопсиса мелковолосистого – этилацетат. Полученные суспензии помещали в шейкер на 1 ч для

перемешивания. Далее суспензии фильтровали и центрифugировали при 4000 об./мин для избавления от взвесей и получения чистого раствора. Затем полученный фугат подвергался упариванию при пониженном давлении в предварительно взвешанных колбах на 100 мл. Когда процесс был полностью завершен, определяли массу колб с остаточными образцами. Из полученного значения производили вычет значения массы пустых колб. Таким способом рассчитали выход экстрактов корневых культур лекарственных растений (Espinosa-Leal, Puente-Garza, & García-Lara, 2018; Wang et al., 2017; Hendrawati, Woerdenbag, Hille, & Kayser, 2012).

Предварительно были проведены экспериментальные исследования по определению оптимального органического растворителя к опытным образцам любки двулистной, лимонника китайского и кодонопсиса мелковолосистого. В результате проделанной работы выяснилось, что наибольший выход экстракта из корневых культур любки двулистной и лимонника китайского наблюдался при использовании ацетона, а кодонопсиса мелковолосистого – этилацетата (Zhang, Lin, & Ye, 2018; Bagheri et al. 2018).

После определения оптимальных растворителей для каждой из растительных культур приступали к подбору оптимальных параметров проведения процесса экстракции с обеспечением максимального выхода БАВ из корневых культур *in vitro* любки двулистной, лимонника китайского и кодонопсиса мелковолосистого. В качестве изменяемых параметров процесса экстрагирования являлись продолжительность экстракции, температура и соотношение объема органического растворителя к высушенному массе корневых культур лекарственных растений (Ligor, Ratiu, Kiełbasa, Al-Suod1, & Buszewski, 2018; Mulabagal, 2004; Alamgir, 2018).

Результаты и их обсуждение

Используемый метод экстракции биологически активных соединений из корневых культур лекарственных растений требовал доработки с це-

¹ Просеков, А. Ю., Бабич, О. О., Дышлюк, Л. С., Асякина, Л. К., Милентьева, И. С., & Заушинцева, А. В. (2020). Пат. № 2724487 РФ. Способ экстракции комплекса биологически активных веществ из биомассы корневой культуры *in vitro* лапчатки белой (*potentilla alba* L.); заявл. 26.10.2019.

² Бабич, О. О., Заушинцева, А. В., Милентьева, И. С., Просеков, А. Ю., & Лукин, А. А. (2020). Пат. № 2714403. Способ получения корневой культуры *in vitro* *potentilla alba* L. - продуцента флавоноидов; заявл. 22.03.2019.

³ Просеков, А. Ю., Бабич, О. О., Дышлюк, Л. С., Асякина, Л. К., Милентьева, И. С., & Заушинцева, А. В. (2020). Пат. № 2726067. Способ получения биологически активных веществ - адаптогенов в клеточной культуре родиолы розовой (*rhodiola rosea* L.); заявл. 16.10.2019.

лью получения максимально возможного выхода сухого экстракта из опытных образцов. Поэтому следующим шагом в исследовательской работе является оптимизация процесса извлечения БАВ из любки двулистной, лимонника китайского и кодонопсиса мелковолосистого, результаты которого отражены в графиках и таблицах.

Рисунок 1 показывает зависимость выхода экстракта кодонопсиса мелковолосистого от продолжительности процесса и соотношения объема экстрагента к высушенной массе корневой культуры образца. Для проведения процесса была выбрана продолжительность 60 мин и гидромодуль 1:10. Однако при данных значениях параметров достигается не самый максимальный выход экстракта, но близкий к нему (16,46 % вместо 17,45 %). Выбор таких значений обусловлен целесообразностью проведения эксперимента, в противном случае продолжительность процесса возрастает в 2 раза. В качестве органического растворителя был подобран этилацетат (Sasidharan, Chen, Saravanan, Sundram, & Latha, 2011; Постраш, Соболева, & Андрушченко, 2020).

Зависимость выхода сухого экстракта БАВ кодонопсиса мелковолосистого от температуры процесса отражается на Рисунке 2. Оптимальным значением температуры, при котором достигается близкое к максимальному значение выхода экстракта кодонопсиса мелковолосистого (16,92 %), является 40 °C. Далее с увеличением продолжительности и температуры процесса выход экстракта БАВ остается примерно на одном уровне. Поэтому наиболее целесообразным решением становится выбор наиболее сокращенного

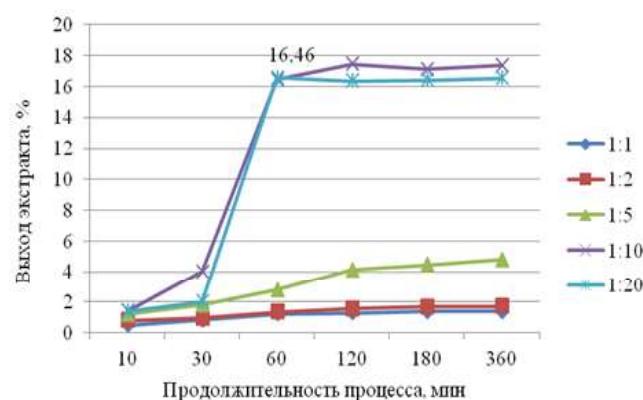


Рисунок 1. Зависимость выхода сухого экстракта БАВ корневой культуры кодонопсиса мелковолосистого от продолжительности процесса и соотношения объема экстрагента к высушенной массе корневой культуры образца

по продолжительности отрезка эксперимента, т.е. 60 мин (Вайнштейн & Каухова, 2014; Белокуров, Флисюк, & Смехова, 2019; Белобородов, Брик, & Прокофьев, 1995).

Таким образом, оптимальными параметрами экстракции БАВ из корневых культур кодонопсиса мелковолосистого являются продолжительность процесса 60 мин, соотношение органического растворителя к массе высушенного сырья 1:10 и температура экстрагирования 40 °C. Максимальный выход экстракта составил 16,92 %.

На Рисунке 3 представлен график зависимости выхода сухого экстракта биологических соединений любки двулистной от продолжительности и гидромодуля процесса. Эксперимент проходил при параметрах гидромодуля 1:10 и продолжительности процесса 60 мин, органическим растворителем выступает ацетон. В данном случае максимальный выход экстракта достигает 17,46 %.

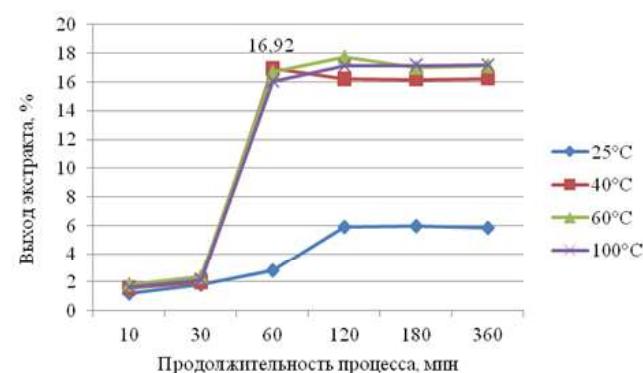


Рисунок 2. Зависимость выхода сухого экстракта БАВ корневой культуры кодонопсиса мелковолосистого от температуры процесса

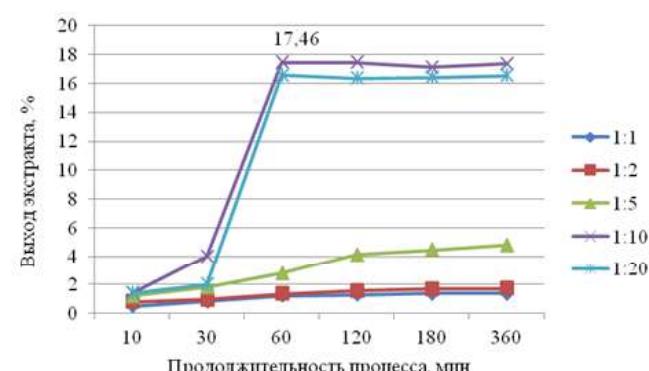


Рисунок 3. Зависимость выхода сухого экстракта БАВ корневой культуры любки двулистной от продолжительности процесса и соотношения объема экстрагента к высушенной массе корневой культуры образца

С повышением продолжительности экстракции происходило уменьшение количества выделяемых веществ, поэтому оптимальным параметром стало значение 60 мин.

Рисунок 4 отражает зависимость выхода сухого экстракта БАВ любки двулистной от температуры экстракции. Выход экстракта БАВ при всех значениях температур после преодоления отметки в 60 мин колеблется в районе 16–18 %. Поэтому был выбран наиболее короткий по продолжительности отрезок времени – 60 мин и температура, при которой достигается максимальное значение выхода экстракта в данной точке времени – 40 °C.

Таким образом, при осуществлении подбора параметров экстракции БАВ из корневых культур любки двулистной были применены: продолжительность процесса 60 мин, температура 40 °C и гидромодуль 1:10. Максимальный выход экстракта при таких параметрах достигал 17,46 %.

На Рисунке 5 показана зависимость выхода сухого экстракта корневой культуры лимонника китайского от соотношения объема растворителя к высушенной массе образца и продолжительности экстракции. Из графика видно, что наиболее выгодными параметрами проведения эксперимента является гидромодуль 1:10 при продолжительности процесса 60 мин, ацетон использовался в качестве экстрагента. При выборе данных параметров наблюдается выход сухого экстракта в 16,46 %, что не является максимальным значением, но самым оптимальным вариантом проведения процесса в целом.

Зависимость выхода сухого экстракта БАВ из корневой культуры лимонника китайского от температуры процесса отображено на Рисунке 6. Одним из ключевых параметров экстрагирования является

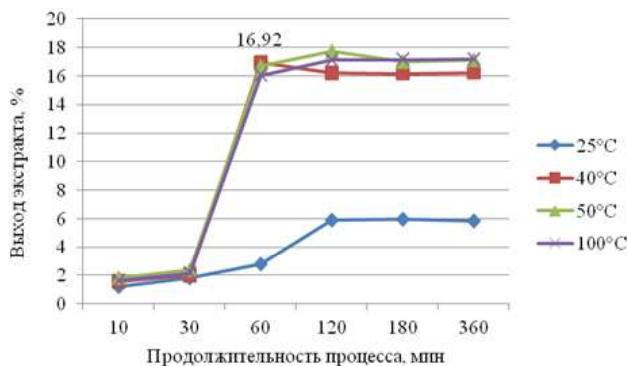


Рисунок 4. Зависимость выхода сухого экстракта БАВ корневой культуры любки двулистной от температуры процесса

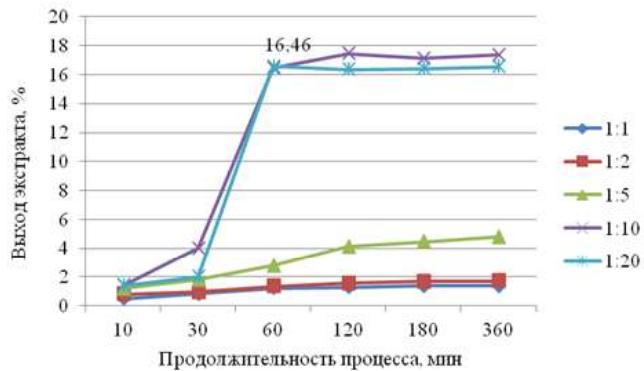


Рисунок 5. Зависимость выхода сухого экстракта БАВ корневой культуры лимонника китайского от продолжительности процесса и соотношения объема экстрагента к высушенной массе корневой культуры образца

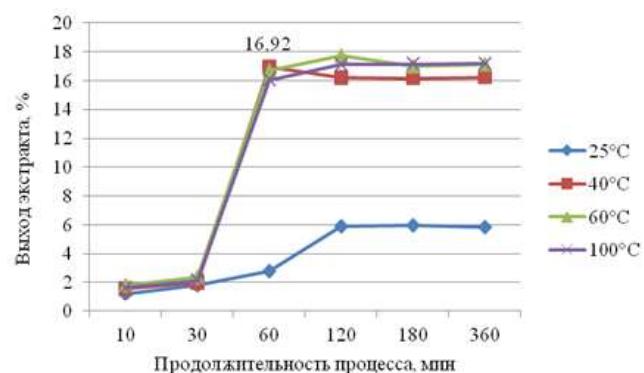


Рисунок 6. Зависимость выхода сухого экстракта БАВ корневой культуры лимонника китайского от температуры процесса

сия его продолжительность. От данного параметра зависит насколько долго будет длиться процесс в целом и соответственно рабочее время оператора. Как можно заметить из графика, диапазон выхода экстрактов при разных температурах приблизительно одинаков и держится в пределах продолжительности процесса 60–360 мин, поэтому, в первую очередь, отталкиваясь от продолжительности процесса происходит подбор оптимальной температуры, которая в конкретном случае составляет 40 °C.

Таким образом, экстракцию БАВ из корневых культур лимонника китайского следует проводить при параметрах температуры 40 °C, гидромодуле 1:10 и продолжительности процесса 60 мин. Максимальный выход экстракта при данных значениях будет составлять 16,92 %.

Полученные данные по экстракции БАВ корневых культур лекарственных растений лимонни-

ка китайского, любки двулистной и кодонопсиса мелковолосистого согласуются с результатами работ авторов Asyakina L.K., Babich O.O., Pungin A.V., Prosekov A.Yu., Popov A.D., Voblikova T.V. и Асякина Л.К., Дышлюк Л.С., Степанова А.А., использующих аналогичную методику по извлечению БАВ из лекарственного сырья, применяемую на каллусных культурах *in vitro*.

Выводы

Основные результаты научно-исследовательской работы по разработке технологии получения сухих экстрактов из биомассы корневых культур *in vitro* лекарственных растений кодонопсиса мелко-

волосистого, любки двулистной и лимонника китайского сформированы в Таблицу 1.

Таким образом, для максимального выхода экстрактов БАВ из корневых культур *in vitro* лекарственных растений были подобраны оптимальные параметры процесса экстрагирования. Во всех случаях были применены значения температуры 40 °C, продолжительности процесса 60 мин и соотношения объема растворителя к массе образца 1:10. Биотехнология в использовании корневых культур *in vitro* обладает перспективными методами, которые позволяют в будущем глубоко исследовать проблемы накопления биологически активных веществ в тканях и органах интактных растений, что позволит вывести медицину на новый уровень (Sarvin, et al., 2018).

Таблица 1

Оптимальные параметры извлечения сухих экстрактов из корневых культур лекарственных растений

Растение	Растворитель	Гидромодуль	Продолжительность, мин	Температура, °C
Кодонопсис мелковолосистый	этилацетат	1:10	60	40
Любка двулистная	Ацетон	1:10	60	40
Лимонник китайский	Ацетон	1:10	60	40

*Работы выполняются в рамках государственного задания по теме «Скрининг биологически активных веществ растительного происхождения, обладающих геропротекторными свойствами, и разработка технологии получения нутрицевтиков, замедляющих старение» (номер темы FZSR-2020-0006).

Литература

Асякина, Л. К., Дышлюк, Л. С., & Степанова, А. А. (2020). Определение эффективности экстракции биологически активных веществ из биомассы каллусных культур лекарственных растений различными растворителями. В *Современная биотехнология: актуальные вопросы, инновации и достижения: Сборник тезисов Всероссийской с международным участием онлайн-конференции* (с. 19-21). Кемерово, Кемеровский государственный университет.

Бабич, О. О., Ларина, В. В., Скрыпник, Л. Н., & Пунгин, А. В. (2021). Биологически активные свойства лекарственных растений, произрастающих на территории калининградской области, пригодных для производства фитогенников. В *Биотехнология новых материалов – окружающая среда – качество жизни: Материалы IV Международной научной конференции* (с. 208-

210). Красноярск, Сибирский федеральный университет.

Белобородов, В. В., Брик, В. Н., Прокофьев, А. В. (1995). Извлечение биологически активных веществ из пряно ароматического сырья в системе процессов экстрагирование-отжим. *Масложировая промышленность*, 3, 24-27.

Белоуров, С. С., Флисюк, Е. В., & Смехова, И. Е. (2019). Выбор метода экстрагирования для получения извлечений из семян пажитника сенного с высоким содержанием биологически активных веществ. *Разработка и регистрация лекарственных средств*, 3, 35-39. <https://doi.org/10.33380/2305-2066-2019-8-3-35-39>

Вайнштейн, В. А., & Каухова, И. Е. (2014). Экстрагирование лекарственного растительного сырья двухфазной системой экстрагентов. *Разработка и регистрация лекарственных средств*, 3, 82-88.

Колесникова, Р. Д., & Тагильцев, Ю. Г. (2016). Эфирные масла лимонника китайского (*Schisandra Chinensis* (Turcz.) Baill.). В *Биологические особенности лекарственных и ароматических растений и их роль в медицине: Сборник научных трудов Международной научно-практической конференции, посвященной 85-летию ВИЛАР* (с. 391-394). М.: Щербинская типография.

Постравш, И. Ю., Соболева, Ю. Г., & Андрушенко, В. С. (2020). Экстракция биологически ак-

- тивных веществ из цветков ромашки аптечной. *Вестник АПК Верхневолжья*, 1, 22-26. <https://doi.org/10.35694/YARCX.2020.49.1.005>
- Самылина, И. А., Булаев, В. М., & Ших, Е. В. (2012). Лекарственные растения в лечении когнитивных расстройств. *Фармация*, 8, 47-50.
- Alamgir, N. M. (2018). Biotechnology, in vitro production of natural bioactive compounds, herbal preparation, and disease management (Treatment and Prevention). In *Therapeutic Use of Medicinal Plants and their Extracts* (vol. 2, pp. 585-664). Luxemburg: Springer. https://doi.org/10.1007/978-3-319-92387-1_7
- Asyakina, L. K., Babich, O. O., Pungin, A. V., Prosekov, A. Yu., Popov, A. D., & Voblikova, T. V. (2020). Optimization of extraction parameters of biologically active substances from dried biomass of callus, suspension cells and root cultures in vitro. *IOP Conference Series: Earth and Environmental Science*, 613, 1-5. <https://doi.org/10.1088/1755-1315/613/1/012008>
- Babich, O., Sukhikh, S., Pungin, A., Ivanova, S., Asyakina, L., & Prosekov, A. (2020). Modern trends in the In Vitro production and use of callus, suspension cells and root cultures of medicinal plants. *Molecules*, 25, 1-18. <https://doi.org/10.3390/molecules25245805>
- Bagheri, F., Tahvilian, R., Karimi, N., Chalabi, M., & Azami, M. (2018). Shikonin production by callus culture of onosma bulbotrichom as active pharmaceutical ingredient. *Iranian Journal of Pharmaceutical Research*, 17, 495-504.
- Bibi, A., Khan, M. A., Adil, M., & Mashwani, Z. R. (2018). Production of callus biomass and antioxidant secondary metabolites in black cumin. *Journal of Animal and Plant Sciences*, 28(5), 1321-1328
- Chupakhin, E., Babich, O., Prosekov, A., Asyakina, L., Gureev, M., & Krasavin, M. (2020). Plants of the Russian Federation pharmacopeia: An unexhausted natural products research opportunity. *Natural Product Research*, 35(21), 1-3. <https://doi.org/10.1080/14786419.2020.1727474>
- Efferth, T. (2019). Biotechnology applications of plant callus cultures. *Engineering*, 5(1), 50-59. <https://doi.org/10.1016/j.eng.2018.11.006>
- Espinosa-Leal, C. A., Puente-Garza, C. A., & García-Lara, S. (2018). In vitro plant tissue culture: Means for production of biological active compounds. *Planta*, 248, 1-18. <https://doi.org/10.1007/s00425-018-2910-1>
- Georgiev, V., Slavov, A., Vasileva, I., & Pavlov, A. (2018). Plant cell culture as emerging technology for production of active cosmetic ingredients. *Engineering in Life Sciences*, 18, 779-798. <https://doi.org/10.1002/elsc.201800066>
- Hendrawati, O., Woerdenbag, H. J., Hille, J., & Kayser, O. (2012). Metabolic engineering of medicinal plants and microorganisms for the production of natural products. In *Pharmaceutical Biotechnology: Drug Discovery and Clinical Applications* (2nd ed., pp. 491-526). Weinheim, John Wiley & Sons Limited. <https://doi.org/10.1002/9783527632909.ch19>
- Ligor, M., Ratiu, I.-A., Kiełbasa, A., Al-Suod, H., & Buszewski, B. (2018). Extraction approaches used for the determination of biologically active compounds (cyclitols, polyphenols and saponins) isolated from plant material. *Electrophoresis*, 29603754. <https://doi.org/10.1002/elps.201700431>
- Marchev, A. S., & Georgiev, M. I. (2020). Plant In Vitro systems as a sustainable source of active ingredients for cosmeceutical application. *Molecules*, 25, 1-19. <https://doi.org/10.3390/molecules25092006>
- Mulabagal, V. (2004). Plant cell cultures: Production of biologically active secondary metabolites from medicinal plants of Taiwan. *International Journal of Applied Science and Engineering*, 2(1), 29-48.
- Sarvin, B., Fedorova, E., Shpigun, O., Titova, M., Nikitin, M., Kochkin, D., Rodin, I., & Stavrianidi, A. (2018). LC-MS determination of steroid glycosides from Dioscorea Deltoidea Wall cell suspension culture: Optimization of pre-LC-MS procedure parameters by Latin Square design. *Journal of chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences*, 1080, 64-70. <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2018.02.012>
- Sasidharan, S., Chen, Y., Saravanan, D., Sundram, K. M., & Latha, L. Y. (2011). Extraction, isolation and characterization of bioactive compounds from plants extracts. *African Journal of Traditional, Complementary and Alternative Medicines*, 8(1), 1-10.
- Wang, J., Li, J.-L., Li, J., Li, J.-X., Liu, S., Huang, L., & Gao W. (2017). Production of active compounds in medicinal plants: From plant tissue culture to biosynthesis. *Chinese Herbal Medicines*, 9, 115-125. [https://doi.org/10.1016/S1674-6384\(17\)60085-6](https://doi.org/10.1016/S1674-6384(17)60085-6)
- Zhang, Q. W., Lin, L.-G., & Ye, W.-C. (2018). Techniques for extraction and isolation of natural products: a comprehensive review. *Chinese Medicine*, 13, 1-20. <https://doi.org/10.1186/s13020-018-0177-x>

Development of a Technology for Extraction of a Complex of Biologically Active Substances from *in vitro* Root Crops of Medicinal Plants

Lyudmila K. Asyakina

Kemerovo State University

6, Krasnaya str., Kemerovo, 650000, Russian Federation

E-mail: alk_kem@mail.ru

Natalia V. Fotina

Kemerovo State University

6, Krasnaya str., Kemerovo, 650000, Russian Federation

E-mail: fotina.natashenka@mail.ru

Anna A. Stepanova

Kemerovo State University

6, Krasnaya str., Kemerovo, 650000, Russian Federation

E-mail: annstepanova.04@mail.ru

Anna V. Pozdnyakova

Kemerovo State University

6, Krasnaya str., Kemerovo, 650000, Russian Federation

E-mail: avp_7979@bk.ru

Alexander Yu. Prosekov

Kemerovo State University

6, Krasnaya str., Kemerovo, 650000, Russian Federation

E-mail: bionano_kem@mail.ru

The paper presents the results of scientific research on the development of technology for the extraction of dry extracts from the biomass of root cultures *in vitro* of cells of medicinal plants of the Siberian Federal District of *Codonopsis pilosula*, *Platanthera bifolia* and *Schisandra chinensis*. The Soxhlet extraction method was used as a method for extracting biologically active substances from plant samples. The extraction of extracts was optimized according to three parameters: temperature, duration of the process, and the ratio of the volume of the organic solvent to the mass of the plant sample (hydromodule), i.e. these parameters were modifiable. During the experiment, it was possible to select the optimal parameters for the isolation of dry extracts from each medicinal plant. Optimum parameters for *Codonopsis pilosula* are: the extraction temperature is 40 °C, the process duration is 60 min, and the ratio of the volume of the solvent to the amount of dried biomass of root cultures of plant cells is 1:10. The most effective extractant for *Codonopsis pilosula* is ethyl acetate. The following parameters were used for the root cultures of *Platanthera bifolia*: temperature 40 °C, extraction time 60 min, hydromodule 1:10. Extraction was performed with acetone. The process of extracting biologically active substances from *Schisandra chinensis* was carried out with acetone at a process temperature of 40 °C for 60 min in a ratio of the extractant to the sample of 1:10. The use of the values of these parameters in the experiment will make it possible to achieve the maximum yield of BAS extracts from medicinal plants at the lowest possible cost of resources (cost of time, reagents, etc.).

Keywords: extraction, medicinal plants, biologically active substances, root cultures, parameters, organic solvent

References

- Asyakina, L. K., Dyshlyuk, L. S., & Stepanova, A. A. (2020). Opredelenie effektivnosti ekstraktsii bi-

ologicheski aktivnykh veshchestv iz biomassy kallusnykh kul'tur lekarstvennykh rastenii razlichnymi rastvoritelyami [Determination of the efficiency of extraction of biologically ac-

- tive substances from the biomass of callus cultures of medicinal plants with various solvents]. In *Sovremennaya biotekhnologiya: aktual'nye voprosy, innovatsii i dostizheniya: Sbornik tezisov Vserossiiskoi s mezhdunarodnym uchastiem on-line-konferentsii* [Modern biotechnology: topical issues, innovations and achievements: Collection of abstracts of the All-Russian with international participation online conference] (pp. 19–21). Kemerovo, Kemerovskii gosudarstvennyi universitet.
- Babich, O. O., Larina, V. V., Skrypnik, L. N., & Pungin, A. V. (2021). Biologicheski aktivnye svoistva lekarstvennykh rastenii, proizrastayushchikh na territorii kaliningradskoi oblasti, prigodnykh dlya proizvodstva fitogenikov [Biologically active medicinal plants growing on the territory of the Kaliningrad region, suitable for the production of phytogenics]. In *Biotekhnologiya novykh materialov – okruzhayushchaya sreda – kachestvo zhizni: Materialy IV Mezhdunarodnoi nauchnoi konferentsii* [Biotechnology of new materials - environment - quality of life: Proceedings of the 4th International Scientific Conference, electronic publication] (pp. 208–210). Krasnoyarsk, Sibirskaia federal'nyi universitet.
- Beloborodov, V. V., Brik, V. N., & Prokof'ev, A. V. (1995). Izvlechenie biologicheski aktivnykh veshchestv iz pryano aromaticheskogo syr'ya v sisteme protsescov ekstragirovanie-otzhim [Extraction of biologically active substances from spicy aromatic raw materials in the system of extraction-pressing processes]. *Maslozhirovaya promyshlennost'* [Oil and fat industry], 3, 24–27.
- Belokurov, S. S., Flisyuk, E. V., & Smekhova, I. E. (2019). Vybor metoda ekstragirovaniya dlya polucheniya izvlechenii iz semyan pazhitnika sen-nogo s vysokim soderzhaniem biologicheski aktivnykh veshchestv [Selection of the extraction method for obtaining extracts from hay fenugreek seeds with a high content of biologically active substances]. *Razrabotka i registratsiya lekarstvennykh sredstv* [Development and registration of medicines], 3, 35–39. <https://doi.org/10.33380/2305-2066-2019-8-3-35-39>
- Vainshtein, V. A., & Kaukhova, I. E. (2014). Ekstragirovanie lekarstvennogo rastitel'nogo syr'ya dvukhfaznoi sistemoi ekstragentov [Extraction of medicinal plant materials with a two-phase system of extractants]. *Razrabotka i registratsiya lekarstvennykh sredstv* [Development and registration of medicines], 3, 82–88.
- Kolesnikova, R. D., & Tagil'tsev, Yu. G. (2016). Efirnye masla limonnika kitaiskogo (*Schisandra Chinensis* (Turcz.) Baill.) [Essential oils of *Schisandra Chinensis* (Turcz.) Baill.]. In *Biologicheskie osobennosti lekarstvennykh i aromaticheskikh ras-*tenii i ikh rol' v meditsine: Sbornik nauchnykh trudov Mezhdunarodnoi nauchno-prakticheskoi konferentsii, posvyashchennoi 85-letiyu VILAR
- [*Biological characteristics of medicinal and aromatic plants and their role in medicine: Collection of scientific papers of the scientific and practical conference dedicated to the 85th anniversary of VILAR*] (pp. 391–394). Moscow: Shcherbinskaya tipografiya.
- Postrash, I. Yu., Soboleva, Yu. G., & Andrushchenko, V. S. (2020). Ekstraktsiya biologicheski aktivnykh veshchestv iz tsvetkov romashki aptechnoi [Extraction of biologically active substances from chamomile flowers]. *Vestnik APK Verkhnevolzh'ya* [Agroindustrial complex of the Upper Volga region], 1, 22–26. <https://doi.org/10.35694/YARCX.2020.49.1.005>
- Samylina, I. A., Bulaev, V. M., & Shikh, E. V. (2012). Lekarstvennye rasteniya v lechenii kognitivnykh rasstroistv [Medicinal plants in the treatment of cognitive disorders]. *Farmatsiya* [Pharmacy], 8, 47–50.
- Alamgir, N. M. (2018). Biotechnology, in vitro production of natural bioactive compounds, herbal preparation, and disease management (Treatment and Prevention). In *Therapeutic Use of Medicinal Plants and their Extracts* (vol. 2, pp. 585–664). Luxemburg: Springer. https://doi.org/10.1007/978-3-319-92387-1_7
- Asyakina, L. K., Babich, O. O., Pungin, A. V., Prosekov, A. Yu., Popov, A. D., & Voblikova, T. V. (2020). Optimization of extraction parameters of biologically active substances from dried biomass of callus, suspension cells and root cultures in vitro. *IOP Conference Series: Earth and Environmental Science*, 613, 1–5. <https://doi.org/10.1088/1755-1315/613/1/012008>
- Babich, O., Sukhikh, S., Pungin, A., Ivanova, S., Asyakina, L., & Prosekov, A. (2020). Modern trends in the In Vitro production and use of callus, suspension cells and root cultures of medicinal plants. *Molecules*, 25, 1–18. <https://doi.org/10.3390/molecules25245805>
- Bagheri, F., Tahvilian, R., Karimi, N., Chalabi, M., & Azami, M. (2018). Shikonin production by callus culture of *Onosma bulbifera* as active pharmaceutical ingredient. *Iranian Journal of Pharmaceutical Research*, 17, 495–504.
- Bibi, A., Khan, M. A., Adil, M., & Mashwani, Z.-R. (2018). Production of callus biomass and anti-oxidant secondary metabolites in black cumin. *Journal of Animal and Plant Sciences*, 28(5), 1321–1328
- Chupakhin, E., Babich, O., Prosekov, A., Asyakina, L., Gureev, M., & Krasavin, M. (2020). Plants of the Russian Federation pharmacopeia: An unexhausted natural products research opportunity. *Natural*

- Product Research*, 35(21), 1-3. <https://doi.org/10.1080/14786419.2020.1727474>
- Efferth, T. (2019). Biotechnology applications of plant callus cultures. *Engineering*, 5(1), 50-59. <https://doi.org/10.1016/j.eng.2018.11.006>
- Espinosa-Leal, C. A., Puente-Garza, C. A., & García-Lara, S. (2018). In vitro plant tissue culture: Means for production of biological active compounds. *Planta*, 248, 1-18. <https://doi.org/10.1007/s00425-018-2910-1>
- Georgiev, V., Slavov, A., Vasileva, I., & Pavlov, A. (2018). Plant cell culture as emerging technology for production of active cosmetic ingredients. *Engineering in Life Sciences*, 18, 779-798. <https://doi.org/10.1002/elsc.201800066>
- Hendrawati, O., Woerdenbag, H. J., Hille, J., & Kayser, O. (2012). Metabolic engineering of medicinal plants and microorganisms for the production of natural products. In *Pharmaceutical Biotechnology: Drug Discovery and Clinical Applications* (2nd ed., pp. 491-526). Weinheim, John Wiley & Sons Limited. <https://doi.org/10.1002/9783527632909.ch19>
- Ligor, M., Ratiu, I.-A., Kiełbasa, A., Al-Suod, H., & Buszewski, B. (2018). Extraction approaches used for the determination of biologically active compounds (cyclitols, polyphenols and saponins) isolated from plant material. *Electrophoresis*, 29, 603754. <https://doi.org/10.1002/elps.201700431>
- Marchev, A. S., & Georgiev, M. I. (2020). Plant In Vitro systems as a sustainable source of active ingredients for cosmeceutical application. *Molecules*, 25, 1-19. <https://doi.org/10.3390/molecules25092006>
- Mulabagal, V. (2004). Plant cell cultures: Production of biologically active secondary metabolites from medicinal plants of Taiwan. *International Journal of Applied Science and Engineering*, 2(1), 29-48.
- Sarvin, B., Fedorova, E., Shpigun, O., Titova, M., Nikitin, M., Kochkin, D., Rodin, I., & Stavrianidi, A. (2018). LC-MS determination of steroid glycosides from *Dioscorea Deltoidea* Wall cell suspension culture: Optimization of pre-LC-MS procedure parameters by Latin Square design. *Journal of chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences*, 1080, 64-70. <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2018.02.012>
- Sasidharan, S., Chen, Y., Saravanan, D., Sundram, K. M., & Latha, L. Y. (2011). Extraction, isolation and characterization of bioactive compounds from plants extracts. *African Journal of Traditional, Complementary and Alternative Medicines*, 8(1), 1-10.
- Wang, J., Li, J.-L., Li, J., Li, J.-X., Liu, S., Huang, L., & Gao W. (2017). Production of active compounds in medicinal plants: From plant tissue culture to biosynthesis. *Chinese Herbal Medicines*, 9, 115-125. [https://doi.org/10.1016/S1674-6384\(17\)60085-6](https://doi.org/10.1016/S1674-6384(17)60085-6)
- Zhang, Q. W., Lin, L.-G., & Ye, W.-C. (2018). Techniques for extraction and isolation of natural products: a comprehensive review. *Chinese Medicine*, 13, 1-20. <https://doi.org/10.1186/s13020-018-0177-x>