

УДК 542.06.542.61.542.46.808.542.97.542.93

## СУБКРИТИЧЕСКАЯ ВОДА КАК ИНСТРУМЕНТ ПОЛУЧЕНИЯ ПРОДУКТОВ С ВЫСОКОЙ АНТИОКСИДАНТНОЙ АКТИВНОСТЬЮ ИЗ ОТХОДОВ ПРОИЗВОДСТВА НА ПРИМЕРЕ ЛИСТЬЕВ ОЛИВЫ (*OLEA EUROPAEA* L.)

© С.С. Хизриева, С.Н. Борисенко, Е.В. Максименко, Г.В. Жаркова, Н.И. Борисенко\*

Научно-исследовательский институт физической и органической химии  
Южного федерального университета, пр. Стачки, 194/2, Ростов-на-Дону,  
344090 (Россия), e-mail: niborisenko@sfnedu.ru

В последнее время для переработки отходов сельхозпроизводства с целью получения продуктов с высокой добавленной стоимостью все чаще используются методы «зеленой химии». В представленной работе среда субкритической воды (СБВ) использована для получения (в диапазоне температур от 100 до 220 °С) экстрактов из листьев оливы (ЛО) *Olea europaea* L., обогащенных полифенолами и оценки их антиоксидантной активности (АОА). Использование среды СБВ для процессов экстракции позволяет не только увеличить извлечение вторичных растительных метаболитов (ВРМ) из растительной матрицы, но и добиваться изменения фитохимического профиля экстрактов, полученных в СБВ.

Изучена зависимость содержания ВРМ (сумма полифенольных соединений и флавоноидов) и АОА экстрактов, полученных при разных температурах в СБВ и традиционной водно-спиртовой экстракцией из ЛО. Показано, что содержание полифенольных соединений и АОА активность экстрактов зависят от условий экстракции. Продemonстрировано, что полученный из ЛО в среде СБВ при 220 °С экстракт содержит максимальное количество полифенольных соединений и демонстрирует максимальную АОА ( $EC_{50}=26.9$  мкг/мл).

Представленные результаты демонстрируют перспективность использования СБВ для получения из ЛО экстрактов с высоким содержанием полифенолов для разработки фармпрепаратов и пищевых добавок с высокой АОА.

*Ключевые слова:* субкритическая вода, антиоксидантная активность, олива европейская (*Olea europaea*), полифенолы, флавоноиды, олеаноловая кислота, метод Фолина-Чокальтеу, дифенилпикрилгидразил (ДФПГ).

*Работа выполнена при поддержке Министерства науки и высшего образования РФ (государственное задание в сфере научной деятельности, проект № 0852–2020–0031).*

### Введение

Известно, что каждый год в сельскохозяйственной и пищевой промышленности вырабатывается огромное количество отходов. Очевидно, что переработка отходов будет полезна как с экономической, так и с экологической точки зрения. Так, в мировой индустрии производства оливкового масла ежегодно остается в виде отходов от 750000 до 1500000 тонн листьев, которые чаще всего сжигаются для производства энергии [1]. Показано, что листья оливы (ЛО) европейской *Olea europaea* L. содержат значительные количества вторичных растительных метаболитов (ВРМ) нескольких классов, таких как пентациклические три-

Хизриева Салима Салимовна – младший научный сотрудник, e-mail: hizrieva@sfnedu.ru

Борисенко Сергей Николаевич – кандидат химических наук, старший научный сотрудник, e-mail: snborisenko@sfnedu.ru

Максименко Елена Владимировна – научный сотрудник, e-mail: maksimenkoev52@mail.ru

Жаркова Галина Владимировна – магистрант, e-mail: galya.zharkova.1999@mail.ru

Борисенко Николай Иванович – доктор химических наук, главный научный сотрудник, e-mail: niborisenko@sfnedu.ru

терпены, полифенольные производные и полиолы с уникальными фармацевтическими и нутрицевтическими свойствами [2–4]. Например, пентациклические тритерпены в листьях оливы в основном представлены (до 3% от сухого веса) олеаноловой кислотой (ОК), обладающей широким спектром биологической активности [5–14].

Высокая антиоксидантная активность (АОА) экстрактов листьев оливы связана с содержанием в них многочисленных полифенолов [3].

\* Автор, с которым следует вести переписку.

Полифенолы в листьях оливы представлены пятью основными группами соединений [15]: 1. замещенные фенолы: тирозол (2–4-гидроксифенилэтанол), гидрокситирозол (2–3,4-дигидроксифенилэтанол) и кофейная кислота (3,4-диоксикоричная кислота); 2. олеурозиды (олеуропеин и вербаскозид); 3. флавоны (лютеолин-7-глюкозид, апигенин-7-глюкозид, диосметин-7-глюкозид, лютеолин и диосметин); 4. флавонолы (рутин); 5. флаван-3-олы (катехин).

Известно, что полифенолы ЛО обладают как АОА [2, 3], так и анти-ацетилхолинэстеразной (анти-АХЭ) активностью [16], и, следовательно, могут обладать хорошим терапевтическим потенциалом для профилактики и лечения болезни Альцгеймера. Перечисленные свойства вторичных растительных метаболитов ЛО определяет бурно растущий интерес к изучению фитохимического состава и свойств экстрактов, полученных различными способами из ЛО.

Недавно показано, что для получения экстрактов из ЛО (*Olea europaea* L.) [17], обогащенных ОК, может быть с успехом использована среда субкритической воды (СБВ) [18, 19] (в интервале температур от 100 до 220 °С). Преимущества этого метода экстракции заключаются в том, что можно избежать использования токсичных, пожароопасных и, чаще всего, дорогостоящих и токсичных органических растворителей. Также данный способ позволяет намного сократить временные затраты на экстракцию ВРМ. К нетрадиционным способам экстракции растительных метаболитов относятся ультразвуковая, микроволновая, сверхкритическая флюидная и субкритическая экстракции. Показано, что СБВ-экстракция, по сравнению с другими методами извлечения, не только обеспечивает высокий выход целевых соединений, но и соответствует фундаментальным принципам «зеленой химии» [20]. В недавних работах [21–24] изучены процессы получения ВРМ из растительных матриц в среде СБВ.

Термином «субкритическая вода» обозначается жидкая вода при температурах от 100 до 374 °С (то есть ниже критической точки) и давлении до 218 атм, достаточном для поддержания жидкой фазы [18]. В этом диапазоне температур СБВ ведет себя подобно органическому растворителю, так как имеет гораздо более низкую диэлектрическую проницаемость ( $\epsilon$ ), чем вода при комнатной температуре. Например, при повышении температуры до 225 °С величина  $\epsilon$  воды снижается с 86 до 30, что сопоставимо со значением диэлектрической проницаемости метанола ( $\epsilon=32.6$ ) при комнатной температуре. При этом для СБВ имеет место восстановление значений физико-химических параметров (константа диэлектрической проницаемости и т.д.) до обычных величин при охлаждении воды до комнатной температуры [23]. В целом ряде случаев вышеописанные свойства СБВ позволяют получить продукты экстракции и синтетической модификации в виде осадка той или иной степени чистоты при комнатной температуре [25]. Это открывает перспективы использования СБВ как «зеленого» растворителя в экстракции и синтезе новых производных из ВРМ [21–24].

Другой особенностью СБВ является возможность реализации так называемой «one-pot» техники («одного горшка») [26]. Техника «one-pot» – это процессы химической трансформации, включающие ряд отдельных реакций, последовательно проводимых в одном реакционном сосуде для получения целевого продукта без стадий выделения и очистки промежуточных продуктов. Такой подход достаточно эффективен, так как позволяет экономить время и ресурсы [23]. С использованием «one-pot» техники ранее авторами изучено получение в среде СБВ фармацевтически значимого тритерпена олеаноловой кислоты из листьев оливы [17] и корней аралии маньчжурской [23].

Цель работы – разработка и изучение процессов экстракции для получения продуктов с высокой АОА из листьев оливы (*Olea europaea* L) в среде СБВ [18]. Полученные продукты в перспективе могут стать основой для товаров с высокой добавленной стоимостью.

### Экспериментальная часть

*Химические вещества (реактивы).* В качестве объекта исследования использовали листья оливы фирмы *Oleaf* (ООО «Оквэл», Россия). Ацетонитрил (марка LC/MS) «Криохром», серная кислота (осч), хлороформ (осч) приобретали у ОАО «Вектон» (Россия). Реактив Фолина-Чокальтеу (2 М) приобретен у *Sigma-Aldrich*. Свободный радикал дифенилпикрилгидразил (ДФПГ, 95%, Япония) приобретен у *Alfa Aesar*. Галловую кислоту (б/в, не менее 98%, MW=170.12) приобретали у фирмы ДИА-М (Россия). Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (безводный, ГОСТ 83-79, ч., фирма ВЕКТОН). Соляная кислота (HCl, ГОСТ 14261-77, ос.ч., фирма Сигма Тек) и уксусная ледяная кислота (CH<sub>3</sub>COOH, ГОСТ 61-75, х.ч., фирма ВЕКТОН). Рутин приобретали у фирмы *Sichuan Xieli Pharmaceutical Co., Ltd.* (Китай).

*Используемое оборудование.* Спектрофотометр СПЕКС ССП 705 (УФ-Вид, 190–1100 нм) (производитель ЗАО «Спектроскопические системы», РФ) с программным управлением и компьютерной обработкой результатов анализа (*UV-VIS analyst*).

*Получение экстрактов.* В представленной работе для получения экстрактов из ЛО (*Olea europaea* L.) использованы два различных метода экстракции: 1) традиционный способ экстракции растворителем (этанол-вода) (трад.), и 2) методы с использованием среды СБВ, как описано ранее [17].

*Традиционная экстракция.* Водно-спиртовую экстракцию (традиционный способ) проводили следующим образом: образец сухих листьев оливы *O. europaea* массой 1.0 г (размер частиц 0.5–3 мм) кипятили в течение 90 мин с обратным холодильником с добавлением 15 мл 70%-ого водного раствора этанола. Далее жидкую фракцию отделяли через бумажный фильтр («Белая лента») от растительного сырья, добавляли свежую порцию экстрагента и снова кипятили 90 мин. Процедуру кипячения повторяли 3 раза. Вся процедура экстракции этим способом занимает 270 мин. Собранный в цилиндре объединенный фильтрат (50 мл) высушивали и анализировали описанными ниже методами.

*СБВ-экстракция.* Получение экстрактов в среде СБВ проводили с использованием изготовленного из нержавеющей стали реактора (автоклава с  $V_{\text{внутр.}}=10$  мл) [17]. Измельченные ЛО (0.5 г, размер частиц 0.5–3.0 мм) и 7 мл дистиллированной воды помещали в автоклав. При этом обеспечивается наличие свободного от жидкости объема в реакторе. Поэтому в температурном диапазоне от 100 °С до критической температуры (374 °С) парциальное давление водяного пара в реакторе соответствует давлению насыщающего пара для данной температуры. Так, при температуре 200 °С давление насыщающего пара воды равно 1.55 МПа. Автоклав герметично закрывали, устанавливали в сушильный шкаф и выдерживали в течение часа при заданной температуре (от 120 до 220 °С, точность  $\pm 1$  °С). После этого реактор охлаждали (15 мин) до комнатной температуры в резервуаре, заполненном холодной водой. Содержимое автоклава количественно переносили на бумажный фильтр и промывали (до бесцветных вод) 70% раствором этанола [22].

Все фильтраты высушивали при температуре до 50 °С под вентилятором для получения сухих экстрактов. Для определения *in vitro* АОА, суммы полифенолов и флавоноидов в ЛО, сухие экстракты растворяли в 70% этаноле ( $C_{\text{экстракта}}=1$  мг/мл).

*Определение суммы полифенолов и флавоноидов в экстрактах листьев оливы.* Оценку содержания фенольных соединений в избранных объектах проводили по методу Фолина-Чокальтеу [27]. Данный метод широко используется в биологии и химии для относительного количественного определения фенолов. Данный метод основан на восстановлении соединений молибдена в состоянии VI до молибденовой сини (молибден V). Фенолы легко окисляются с образованием радикала, способного реагировать с молибдатом с образованием голубого цвета оксида молибдена  $\text{MoO}^{4+}$ , имеющего максимум поглощения при 700–750 нм [28].

Для определения суммы полифенолов использовали водный раствор карбоната натрия с концентрацией 200 г/л. В качестве полифенольных стандартов использовали водно-спиртовой стандартный раствор галловой кислоты (подкисленный соляной кислотой до pH 3.25) с концентрацией 0.06 мг/мл и стандартный раствор рутина (в 80% растворе этанола) с концентрацией 0.12 мг/мл. Построение градуировочных кривых проводили так, как описано в [27]: готовили серию растворов, содержащих от 0.25 до 2.5 мл стандартного раствора галловой кислоты, или рутина, 0.25 мл реактива Фолина-Чокальтеу и 2.5 мл раствора карбоната натрия ( $\text{Na}_2\text{CO}_3$ ). Готовые растворы доводили дистиллированной водой до общего объема 8 мл, перемешивали и выдерживали в течение 30 мин при комнатной температуре. Затем определяли оптическую плотность растворов на спектрофотометре в кварцевой кювете (толщина слоя=10 мм) при  $\lambda=750$  нм против контрольного раствора. В качестве контрольного раствора использовали аналогичные смеси, в которых вместо стандартных растворов или экстрактов ЛО добавляли 2.5 мл дистиллированной воды. Методом линейного регрессионного анализа были получены уравнения градуировочной кривой по галловой кислоте  $y=107.3x+0.003$ ;  $R^2=0.997$  и по рутину  $y=40.913+0.031$ ;  $R^2=0.997$ . Для определения суммы полифенолов готовили из сухих экстрактов ЛО водно-спиртовые растворы (в 70% этаноле) с концентрацией 1 мг/мл.

Сумму флавоноидов в экстрактах ЛО определяли методом прямой спектрофотометрии [29] на длине волны 362 нм (в области пропорциональной зависимости оптической плотности от концентрации рутина в растворе). Для построения градуировочной кривой готовили серию растворов, содержащих от 0.5 до 2.5 мл стандартного раствора рутина ( $C=0.12$  мг/мл) и 0.05 мл 1% уксусной кислоты. Готовые растворы доводили 70% этанолом до общего объема 5 мл и измеряли оптическую плотность в кювете ( $l=10$  мм). Аналогично

измеряли оптическую плотность растворов экстрактов ЛО ( $C=1$  мг/мл в 70% этаноле) и определяли сумму флавоноидов в мг/г сырья по уравнению градуировочной кривой  $y=29.6x$ ;  $R^2=0.999$ .

*Определение антиоксидантной активности (АОА) экстрактов в тесте с ДФПГ (in vitro).* АОА экстрактов ЛО исследовали *in vitro* в реакции со стабильным свободным радикалом ДФПГ (1,1-дифенил-2-пикрилгидразил) [30], как описано ранее [31] с небольшими модификациями [32]. ДФПГ – это стабильный азотцентрированный свободный радикал. Количественный анализ реакции переноса атома водорода (Н-атома) от данного фенола к ДФПГ предоставляет очень простой и эффективный способ определения АОА фенолов. За реакциями переноса водорода следят с помощью УФ/Вид-спектроскопии путем регистрации затухания видимого поглощения ДФПГ полоса ( $\lambda_{\max}=516$  нм в этаноле), которая отражает конверсию радикала ДФПГ в соответствующий бесцветный дифенилпикрилгидразин (ДФПГ-Н) антиоксидантом [33].

Исследуемые на АОА экстракты готовили в 70% этаноле ( $C=1$  мг/мл) и разбавляли подкисленным этанолом (0.5 мМ HCl) до концентраций стандартного разведения. Кислота блокирует более быстрый *SPLET* (*sequential proton-loss electron-transfer*) механизм реакции ДФПГ с фенолами за счет подавления ионизации фенольных антиоксидантов [32]. В результате этого значительно снижается скорость реакции, что в свою очередь облегчает проведение кинетических исследований. В кювету помещали 1.7 мл этанольного раствора ДФПГ ( $C_{\text{ДФПГ}}=1 \cdot 10^{-4}$  М). Фиксировали длину волны ( $\lambda$ ), приходящуюся на максимум поглощения раствора ДФПГ и оптическую плотность  $D_0$ . Затем в кювету к тому же самому количеству ДФПГ (1.7 мл) добавляли 0.05–0.12 мл раствора антиоксиданта ( $C_{\text{экстракта}}=0.5$  мг/мл) и быстро перемешивали содержимое кюветы. Кинетические измерения проводили на спектрофотометре СПЕКС в кюветах  $l=1.0$  см при  $\lambda=516$  нм и  $t=25$  °С, регистрируя расхождение ДФПГ в реакции с полифенольным соединением. АОА активность определяли как значения величины  $EC_{50}$ , которую чаще всего выражают как количество мкг антиоксиданта в 1 мл раствора ДФПГ стандартизованной концентрации, необходимое для ее уменьшения в 2 раза. Чтобы получить количественный параметр  $EC_{50}$ , рассчитывали % непрореагировавшего ДФПГ (процент падения оптической плотности раствора ДФПГ) за 30 мин реакции по формуле

$$D_{t=30\text{мин}}/D_0 \times 100,$$

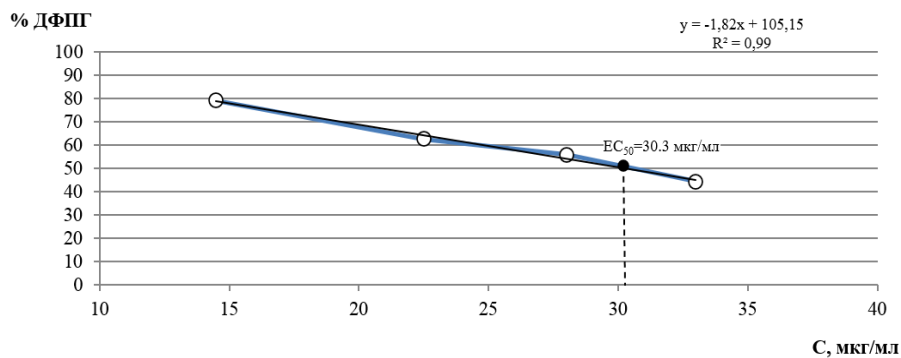
где  $D_{t=30\text{мин}}$  – поглощение раствора антиоксиданта через 30 мин реакции с ДФПГ на  $\lambda=516$  нм;  $D_0$  – поглощение стандартного этанольного раствора ДФПГ на  $\lambda=516$  нм.

Исходя из полученных данных, строили графики зависимости (по четырем концентрациям) процента падения оптической плотности раствора ДФПГ от первоначальной концентрации вещества-антиоксиданта (экстракта ЛО) в мкг/мл. Из уравнения линейной зависимости полученной прямой рассчитывали значения  $EC_{50}$  – концентрации экстракта ЛО при которой падение оптической плотности ДФПГ на  $\lambda=516$  нм за первые 30 мин реакции с растворами экстрактов ЛО достигло 50%. Например, для СБВ-экстракта 220 °С уравнение линейной зависимости имело следующий вид:  $y=-2.01x+104.02$ ;  $R_2=1.000$  (рис. 1Б).

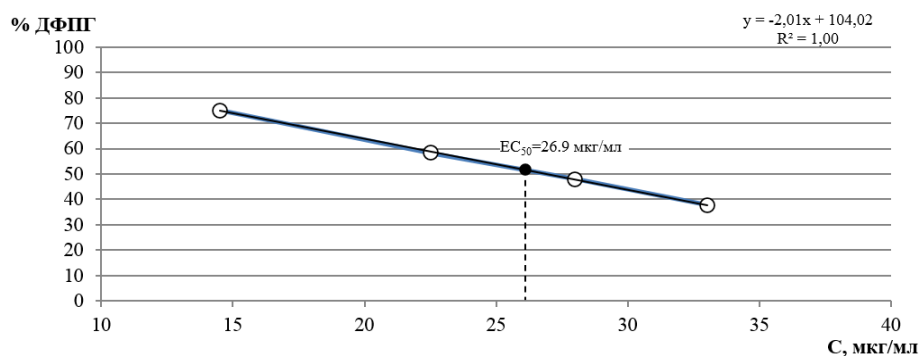
### **Обсуждение результатов**

Для достижения цели работы были получены экстракты ЛО несколькими способами: традиционной водно-спиртовой экстракцией и экстракцией в среде СБВ в температурном диапазоне 120–220 °С. Полученные экстракты оценивали по суммарному содержанию полифенолов, флавоноидов и АОА.

На первом этапе исследования определен общий фенольный профиль в экстрактах ЛО в эквивалентных единицах галловой кислоты (ЭГК). Обнаружено, что экстракт, полученный традиционной водно-спиртовой экстракцией, содержал фенольных соединений в количестве 42.6 мг ЭГК на 1 г сырья. Определены количества общих полифенолов, образующихся в среде СБВ из ЛО в интервале температур 120–220 °С. Так, общий выход полифенолов (табл.) в экстрактах, полученных с использованием СБВ при 120 °С, 180 °С, 200 °С и 220 °С, в пересчете на галловую кислоту составил 32.7 мг, 41.8 мг, 67.3 и 70.4 мг ЭГК/г сырья соответственно. Таким образом, продемонстрировано, что сумма полифенолов в пересчете на ЭГК в экстракте ЛО, полученном в среде СБВ при 220 °С (70.4 мг/г) выше, чем в экстракте, полученном традиционным способом (42.6 мг/г).



А



Б

Рис. 1. Типичные кривые зависимости поглощения молекул ДФПГ от концентрации СБВ-экстрактов листьев оливы, полученных при: А) 200 °С; Б) 220 °С

На следующем этапе определено содержание полифенолов и флавоноидов в экстрактах ЛО в пересчете на эквивалент рутина (ЭР): больше всего фенолов содержится в СБВ-экстракте ЛО, полученном при 220 °С – 160.7 мг ЭР/г, а для экстракта, полученного традиционным способом, – 98.4 мг ЭР/г сырья. Аналогично, флавоноидов больше всего обнаружено в экстракте ЛО, полученном в среде СБВ при 220 °С – 65.2 мг ЭР/г, тогда как в экстракте, полученном традиционным способом – 33.0 мг ЭР/г сырья. Таким образом, в экстрактах ЛО подобная по ЭГК зависимость содержания фенолов от способа экстракции наблюдается и для суммы полифенолов (или флавоноидов) в пересчете на ЭР.

Для определения АОА экстрактов ЛО в тесте с ДФПГ (*in vitro*) строили кинетические кривые зависимости величины поглощения А (на  $\lambda=516$  нм) растворов антиоксиданта в течение 30 мин реакции с ДФПГ. На рисунке 2 представлены типичные кинетические кривые реакции с ДФПГ растворов экстракта ЛО различной концентрации, полученного в среде СБВ при 200 °С.

Антиоксидантная активность и содержание полифенолов в эквиваленте галловой кислоты (ЭГК) и/или рутина (ЭР) и флавоноидов в эквиваленте рутина (ЭР) в экстрактах, полученных с помощью различных методов

Метод экстракции	Антирадикальная (антиоксидантная) активность	Сумма полифенолов		Сумма флавоноидов
	$EC_{50}$ , мкг/мл	по галловой кислоте, мг ЭГК/г	по рутину, мг ЭР/г	по рутину, мг ЭР/г
СБВ: 120 °С	46.3	32.7	79.8	25.4
СБВ: 180 °С	33.0	41.8	105.1	29.7
СБВ: 200 °С	30.3	67.3	154.3	52.4
СБВ: 220 °С	26.9	70.4	160.7	65.2
Водно-спиртовая (трад.)	44.2	42.6	98.4	33.0

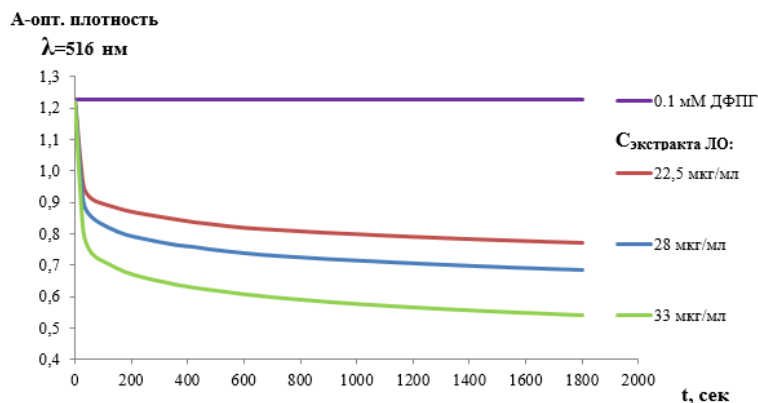


Рис. 2. Кинетические кривые реакции СВВ-экстракта ЛЮ (200 °С) с ДФПГ ( $t_{\text{реакции}}=30$  мин)

Результаты ДФПГ-теста на АОА экстрактов ЛЮ (табл.), полученных водно-спиртовой экстракцией и в среде СВВ, демонстрируют, что наивысшую активность по улавливанию свободных радикалов с самым низким значением  $EC_{50}$  проявил СВВ-экстракт при 220 °С.

Близкую по значению  $EC_{50}$  активность с СВВ-экстрактом (120 °С,  $EC_{50}=46.3$  мкг/мл) показал экстракт, полученный традиционным способом с  $EC_{50}=44.2$  мкг/мл. Кроме того, все экстракты продемонстрировали дозозависимую АОА. Таким образом, СВВ-экстракт (220 °С) листьев оказался самым активным в перехвате молекул ДФПГ со значением  $EC_{50}=26.9$  мкг/мл.

Поглощающая ДФПГ активность экстрактов, полученных различными методами экстракции из оливковых листьев, была в следующем порядке: СВВ-220 °С > СВВ-200 °С > СВВ-180 °С > Трад. > СВВ-120 °С. Таким образом, полученный из ЛЮ в среде СВВ при 220 °С экстракт демонстрирует самую высокую АОА активность, выраженную в виде значений  $EC_{50}$ .

Результаты работы демонстрируют, что значения суммарного содержания фенолов (ССФ) значительно варьируются в зависимости от условий экстракции. Можно предположить, что увеличение ССФ и АОА экстрактов с ростом температуры экстракции в среде СВВ определяется изменениями ее физико-химических характеристик, приводящих к увеличению растворимости растительных метаболитов, с одной стороны, а также термической трансформации в СВВ исходных полифенолов, содержащихся в ЛЮ. Недавно показано [21], что в среде СВВ при 180–220 °С рутин гидролизует до кверцетина. Среда СВВ при таких температурах обеспечивает выход кверцетина, сопоставимый с выходом, получаемым традиционным кислотным гидролизом [34, 35].

Последнее обстоятельство позволяет предположить, что в СВВ-экстрактах (200 и 220 °С) из ЛЮ, именно образующиеся в результате гидролиза, агликоны флавоноидных гликозидов (рутина, лютеолин-7-глюкозида и др.) определяют увеличение суммарного содержания суммы полифенолов и флавоноидов, и как следствие, АОА соответствующих высокотемпературных СВВ-экстрактов.

Кроме того, можно предположить, что в среде СВВ реализуется многоступенчатый гидролиз основного полифенольного антиоксиданта оливковых листьев – секо-иридоида олеуропеина с образованием агликона олеуропеина, который, в свою очередь, трансформируется до гидрокситирозола и эленоловой кислоты [36]. Изучение многоступенчатого превращения олеуропеина в СВВ представляется чрезвычайно интересным и запланированы авторами на следующем этапе работы.

### Заключение

Впервые среда СВВ использована для получения обогащенных полифенолами экстрактов из листьев оливы (*Olea europaea* L.), демонстрирующих антиоксидантную активность, зависящих от температуры СВВ.

Изучена антиоксидантная активность (*in vitro*) экстрактов, полученных с помощью методов субкритической воды и традиционной экстракции растворителем (этанол-вода). Определены суммы полифенолов в экстрактах ЛЮ, полученных в среде субкритической воды и традиционным способом. Показано, что суммы полифенолов в полученных экстрактах максимальны для СВВ-экстрактов при 220 °С.

Продemonстрировано, что АОА-активность экстрактов ЛО, полученных в среде СБВ в интервале температур 120–220 °С, возрастает с повышением температуры при субкритической водной экстракции. При этом раствор экстракта из ЛО, полученного в СБВ при 220 °С, демонстрирует максимальную антиоксидантную активность, в отличие от экстракта, полученного традиционным способом.

Показано, что значение величины АОА, проявляемой экстрактами из ЛО, определяется общим содержанием полифенолов в полученных экстрактах.

Представленные результаты демонстрируют высокий потенциал техники экстракции с использованием субкритической воды для получения коммерческих экстрактов из ЛО (*Olea europaea* L.), обогащенных полифенолами, которые обладают АОА активностью и, в перспективе, могут стать основой для разработки экологически чистых продуктов с высокой добавленной стоимостью: фармацевтических субстанций и пищевых добавок.

### Список литературы

1. Şahin S., Elhussein E.A.A. Valorization of a biomass: phytochemicals in oilseed by-products // *Phytochemistry Reviews*. 2018. Vol. 17. N4. Pp. 657–668. DOI: 10.1007/s11101-018-9552-6.
2. Kontogianni V.G., Gerothanassis I.P. Phenolic compounds and antioxidant activity of olive leaf extracts // *Natural Product Research*. 2012. Vol. 26. N2. Pp. 186–189. DOI: 10.1080/14786419.2011.582842.
3. Ladhari A., Zarrelli A., Ghannem M., Mimoun M.B. Olive wastes as a high-potential by-product: variability of their phenolic profiles, antioxidant and phytotoxic properties // *Waste and Biomass Valorization*. 2021. Vol. 12. N7. Pp. 3657–3669. DOI: 10.1007/s12649-020-01256-2.
4. Guinda Á., Castellano J.M., Santos-Lozano J.M., Delgado-Hervás T., Gutiérrez-Adán P., Rada M. Determination of major bioactive compounds from olive leaf // *LWT-Food Science and Technology*. 2015. Vol. 64. N1. Pp. 431–438. DOI: 10.1016/j.lwt.2015.05.001.
5. Lee W., Yang E.J., Ku S.K., Song K.S., Bae J.S. Anti-inflammatory effects of oleanolic acid on LPS-induced inflammation in vitro and in vivo // *Inflammation*. 2013. Vol. 36. N1. Pp. 94–102. DOI: 10.1007/s10753-012-9523-9.
6. Gutiérrez-Rebolledo G.A., Siordia-Reyes A.G., Meckes-Fischer M., Jiménez-Arellanes A. Hepatoprotective properties of oleanolic and ursolic acids in antitubercular drug-induced liver damage // *Asian Pacific journal of tropical medicine*. 2016. Vol. 9. N7. Pp. 644–651. DOI: 10.1016/j.apjtm.2016.05.015.
7. Rodríguez J.A., Astudillo L., Schmeda-Hirschmann G. Oleanolic acid promotes healing of acetic acid-induced chronic gastric lesions in rats // *Pharmacological Research*. 2003. Vol. 48. N3. Pp. 291–294. DOI: 10.1016/S1043-6618(03)00155-5.
8. Han B., Peng Z. Anti-HIV triterpenoid components // *J. Chem. Pharm. Research*. 2014. Vol. 6. N4. Pp. 438–443.
9. Tuncay S., Senol H., Guler E.M., Ocal N., Secen H., Kocuyigit A., Topcu G. Synthesis of oleanolic acid analogues and their cytotoxic effects on 3T3 cell line // *Medicinal Chemistry*. 2018. Vol. 14. N6. Pp. 617–625. DOI: 10.2174/1573406414666180222094544.
10. Zhu Y.Y., Huang H.Y., Wu Y.L. Anticancer and apoptotic activities of oleanolic acid are mediated through cell cycle arrest and disruption of mitochondrial membrane potential in HepG2 human hepatocellular carcinoma cells // *Molecular Medicine Reports*. 2021. Vol. 23. N6. P. 440. DOI: 10.3892/mmr.2021.12079.
11. Bai X., Lai T., Zhou T., Li Y., Li X., Zhang H. In vitro antioxidant activities of phenols and oleanolic acid from mango peel and their cytotoxic effect on A549 cell line // *Molecules*. 2018. Vol. 23. N6. P. 1395. DOI: 10.3390/molecules23061395.
12. Jesus J.A., Lago J.H.G., Laurenti M.D., Yamamoto E.S., Passero L.F.D. Antimicrobial activity of oleanolic and ursolic acids: an update // *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*. 2015. Vol. 2015. 620472. DOI: 10.1155/2015/620472.
13. Córdova C., Gutiérrez B., Martínez-García C., Martín R., Gallego-Muñoz P., Hernández M., Nieto M.L. Oleanolic acid controls allergic and inflammatory responses in experimental allergic conjunctivitis // *PLoS One*. 2014. Vol. 9. N4. e91282. DOI: 10.1371/journal.pone.0091282.
14. Chen S., Wen X., Zhang W., Wang C., Liu J., Liu C. Hypolipidemic effect of oleanolic acid is mediated by the miR-98-5p/PGC-1 $\beta$  axis in high-fat diet-induced hyperlipidemic mice // *The FASEB Journal*. 2017. Vol. 31. N3. Pp. 1085–1096. DOI: 10.1096/fj.201601022R.
15. Vogel P., Machado I.K., Garavaglia J., Zani V.T., de Souza D., Dal Bosco S.M. Polyphenols benefits of olive leaf (*Olea europaea* L) to human health // *Nutrición hospitalaria*. 2015. Vol. 31. N3. Pp. 1427–1433. DOI: 10.3305/nh.2015.31.3.8400.
16. Omar S.H., Scott C.J., Hamlin A.S., Obied H.K. Biophenols: Enzymes ( $\beta$ -secretase, Cholinesterases, histone deacetylase and tyrosinase) inhibitors from olive (*Olea europaea* L.) // *Fitoterapia*. 2018. Vol. 128. Pp. 118–129. DOI: 10.1016/j.fitote.2018.05.011.
17. Maksimenko E.V., Khizrieva S.S., Borisenko S.N., Lekar A.V., Borisenko N.I., Minkin V.I. Subcritical water as instrument for production of oleanolic acid from the olive leaf (*Olea europaea* L.) // *Russian Journal of Physical Chemistry B*. 2021. Vol. 15. N7. Pp. 1196–1199.
18. Галкин А.А., Лунин В.В. Вода в суб- и сверхкритическом состояниях – универсальная среда для осуществления химических реакций // *Успехи химии*. 2005. Т. 74. №1. С. 24–40.

19. Синёв М.Ю., Шаповалова О.В. Физическое состояние и возможности практического использования водных флюидов в различных областях параметров состояния // *Сверхкритические флюиды: теория и практика*. 2020. Т. 15. №3. С. 87–102. DOI: 10.34984/SCFTP.2020.15.3.010.
20. Liang X., Fan Q. Application of subcritical water extraction in pharmaceutical industry // *Journal of Materials Science and Chemical Engineering*. 2013. Vol. 1. N5. Pp. 1–6. DOI: 10.4236/msce.2013.15001.
21. Vetrova E.V., Maksimenko E.V., Khizrieva S.S., Bugaeva A.F., Borisenko N.I., Minkin V.I. A simple way for the preparation of natural antioxidant quercetin from rutin by subcritical water // *Journal of natural science, biology, and medicine*. 2017. Vol. 8. N2. Pp. 213–215. DOI: 10.4103/0976-9668.210009.
22. Maksimenko E.V., Lekar A.V., Borisenko S.N., Khizrieva S.S., Vetrova E.V., Borisenko N.I., Minkin V.I. The development of a one-step method for production of the antioxidant quercetin from flower buds of the *Sophora japonica* (*Sophora japonica* L.) in a subcritical water medium // *Russian Journal of Physical Chemistry B*. 2018. Vol. 12. N8. Pp. 1269–1275. DOI: 10.1134/S1990793118080092.
23. Lekar A.V., Maksimenko E.V., Borisenko S.N., Khizrieva S.S., Vetrova E.V., Borisenko N.I., Minkin V.I. One-Pot Technique for Production of Oleanolic Acid from the Roots of *Aralia Mandshurica* with Subcritical Water // *Russian Journal of Physical Chemistry B*. 2019. Vol. 13. N8. Pp. 1273–1278. DOI: 10.1134/S1990793119080049.
24. Lekar A.V., Maksimenko E.V., Borisenko S.N., Khizrieva S.S., Borisenko N.I., Minkin V.I. “One-Pot” Technique for Transformation of the Aporphine Alkaloid Boldine into Phenanthrene Seco-Boldine with Subcritical Water // *Russian Journal of Physical Chemistry B*. 2020. Vol. 14. N7. Pp. 1153–1157. DOI: 10.1134/S199079312007012X.
25. Хизриева С.С., Борисенко Н.И. Разработка «One-pot»-техники получения вторичных растительных метаболитов в среде субкритической воды // *Сверхкритические флюидные технологии в решении экологических проблем*. Архангельск, 2020. Т. 1. С. 22–26.
26. Hayashi Y. Pot economy and one-pot synthesis // *Chemical science*. 2016. Vol. 7. N2. Pp. 866–880. DOI: 10.1039/C5SC02913A.
27. Тутельян В.А., Эллер К.И., Алешко-Ожевский Ю.П. Руководство по методам контроля качества и безопасности биологически активных добавок к пище. М., 2004. С. 124–126.
28. Макарова Н.В., Зюзина А.В. Исследование антиоксидантной активности яблок различных сортов // *Известия высших учебных заведений. Пищевая технология*. 2011. Т. 5-6. №323-324. С. 24–25.
29. Марченко М.А., Зилфикаров И.Н., Ибрагимов Т.А., Малеев А.Г. Разработка методик стандартизации сухого экстракта и лекарственных препаратов гинкго двулопастного // *Фармация и фармакология*. 2017. Т. 5. №3. С. 222–241. DOI: 10.19163 / 2307-9266-2017-5-3-222-241.
30. Хасанов В.В., Рыжова Г.Л., Мальцева Е.В. Методы исследования антиоксидантов // *Химия растительного сырья*. 2004. №3. С. 63–75.
31. Хизриева С.С., Борисенко С.Н., Максименко Е.В., Ветрова Е.В., Борисенко Н.И., Минкин В.И. Антиоксидантные свойства и эффекты апорфиновых алкалоидов и их фенантроновых секо-изомеров на ацетилхолинэстеразную активность // *Химия растительного сырья*. 2021. №2. С. 237–246. DOI: 10.14258/jcrpm.2021028752.
32. Волков В.А., Пахомов П.М. Сравнительный анализ содержания антирадикальных компонентов в экстрактах некоторых лекарственных растений // *Вестник Тверского государственного университета. Серия: Биология и экология*. 2007. №5. С. 64–67.
33. Roche M., Dufour C., Mora N., Dangles O. Antioxidant activity of olive phenols: mechanistic investigation and characterization of oxidation products by mass spectrometry // *Organic and biomolecular chemistry*. 2005. Vol. 3. N3. Pp. 423–430. DOI: 10.1039/B416101G.
34. Vetrova E.V., Maksimenko E.V., Borisenko S.N., Lekar A.V., Borisenko N.I., Minkin V.I. Extraction of rutin and quercetin antioxidants from the buds of *Sophora japonica* (*Sophora japonica* L.) by subcritical water // *Russian Journal of Physical Chemistry B*. 2017. Vol. 11. N7. Pp. 1202–1206. DOI: 10.1134/S1990793117070193.
35. Maksimenko E.V., Lekar A.V., Khizrieva S.S., Borisenko S.N., Vetrova E.V., Borisenko N.I., Minkin V.I. Novel eco-friendly “One-Pot” facile strategy for production of the natural quercetin from the plant: A model study // *Journal of Natural Science, Biology and Medicine*. 2018. Vol. 9. N2. Pp. 278–281. DOI: 10.4103/jnsbm.JNSBM\_161\_17.
36. Erdogan I., Bayraktar O., Uslu M.E., Tuncel Ö. Wound healing effects of various fractions of olive leaf extract (OLE) on mouse fibroblasts // *Romanian Biotechnological Letters*. 2018. Vol. 23. N6. Pp. 14217–14228. DOI: 10.26327/RBL2018.151.

Поступила в редакцию 29 октября 2021 г.

После переработки 1 декабря 2021 г.

Принята к публикации 10 февраля 2022 г.

**Для цитирования:** Хизриева С.С., Борисенко С.Н., Максименко Е.В., Жаркова Г.В., Борисенко Н.И. Субкритическая вода как инструмент получения продуктов с высокой антиоксидантной активностью из отходов производства на примере листьев оливы (*Olea europaea* L.) // *Химия растительного сырья*. 2022. №2. С. 137–146. DOI: 10.14258/jcrpm.20220210519.



Khizrieva S.S., Borisenko S.N., Maksimenko E.V., Zharkova G.V., Borisenko N.I. \*SUBCRITICAL WATER AS A TOOL FOR OBTAINING PRODUCTS WITH HIGH ANTIOXIDANT ACTIVITY FROM PRODUCTION WASTE ON THE EXAMPLE OF OLIVE LEAVES (*OLEA EUROPAEA* L.)

Research Institute of Physical and Organic Chemistry, Southern Federal University, pr. Stachki, 194/2, Rostov-on-Don, 344090 (Russia), e-mail: niborisenko@sfnu.ru

Recently, "green chemistry" methods have been increasingly used to process agricultural waste in order to obtain products with high added value. In the presented work, the medium of subcritical water (SBW) was used to obtain (in the temperature range from 100 to 220 °C) extracts from the leaves of the olive (LO) of *Olea europaea* L. enriched with polyphenols and to assess their antioxidant activity (AOA). The use of medium of SBW for extraction processes allows not only to increase the extraction of secondary plant metabolites (SPM) from the plant matrix, but also to achieve a change in the phytochemical profile of extracts obtained in SBW.

The dependence of the content of secondary plant metabolites (the sum of polyphenolic compounds and flavonoids) and AOA of extracts obtained at different temperatures in SBW and traditional aqueous-alcoholic extraction from olive leaves was studied. It was shown that the content of polyphenolic compounds and the AOA activity of the extracts depend on the extraction conditions. It has been demonstrated that the obtained extract from LO in medium of SBW at 220 °C contains the maximum amount of polyphenolic compounds and demonstrates the maximum AOA ( $EC_{50}=26.9 \mu\text{g/ml}$ ).

The presented results demonstrate the promise of using SBW for obtaining extracts from LO with a high content of polyphenols for the development of pharmaceuticals and food additives with high AOA.

**Keywords:** subcritical water, antioxidant activity, European olive (*Olea europaea*), polyphenols, flavonoids, oleanolic acid, Folin-Chocalteu method, 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH).

## References

1. Şahin S., Elhussein E.A.A. *Phytochemistry Reviews*, 2018, vol. 17, no. 4, pp. 657–668. DOI: 10.1007/s11101-018-9552-6.
2. Kontogianni V.G., Gerothanassis I.P. *Natural Product Research*, 2012, vol. 26, no. 2, pp. 186–189. DOI: 10.1080/14786419.2011.582842.
3. Ladhari A., Zarrelli A., Ghannem M., Mimoun M.B. *Waste and Biomass Valorization*, 2021, vol. 12, no. 7, pp. 3657–3669. DOI: 10.1007/s12649-020-01256-2.
4. Guinda Á., Castellano J.M., Santos-Lozano J.M., Delgado-Hervás T., Gutiérrez-Adánez P., Rada M. *LWT-Food Science and Technology*, 2015, vol. 64, no. 1, pp. 431–438. DOI: 10.1016/j.lwt.2015.05.001.
5. Lee W., Yang E.J., Ku S.K., Song K.S., Bae J.S. *Inflammation*, 2013, vol. 36, no. 1, pp. 94–102. DOI: 10.1007/s10753-012-9523-9.
6. Gutiérrez-Rebolledo G.A., Siordia-Reyes A.G., Meckes-Fischer M., Jiménez-Arellanes A. *Asian Pacific journal of tropical medicine*, 2016, vol. 9, no. 7, pp. 644–651. DOI: 10.1016/j.apjtm.2016.05.015.
7. Rodríguez J.A., Astudillo L., Schmeda-Hirschmann G. *Pharmacological Research*, 2003, vol. 48, no. 3, pp. 291–294. DOI: 10.1016/S1043-6618(03)00155-5.
8. Han B., Peng Z. *J. Chem. Pharm. Research*, 2014, vol. 6, no. 4, pp. 438–443.
9. Tuncay S., Senol H., Guler E.M., Ocal N., Secen H., Kocoyigit A., Topcu G. *Medicinal Chemistry*, 2018, vol. 14, no. 6, pp. 617–625. DOI: 10.2174/1573406414666180222094544.
10. Zhu Y.Y., Huang H.Y., Wu Y.L. *Molecular Medicine Reports*, 2021, vol. 23, no. 6, p. 440. DOI: 10.3892/mmr.2021.12079.
11. Bai X., Lai T., Zhou T., Li Y., Li X., Zhang H. *Molecules*, 2018, vol. 23, no. 6, p. 1395. DOI: 10.3390/molecules23061395.
12. Jesus J.A., Lago J.H.G., Laurenti M.D., Yamamoto E.S., Passero L.F.D. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2015, vol. 2015, 620472. DOI: 10.1155/2015/620472.
13. Córdova C., Gutiérrez B., Martínez-García C., Martín R., Gallego-Muñoz P., Hernández M., Nieto M.L. *PLoS One*, 2014, vol. 9, no. 4, e91282. DOI: 10.1371/journal.pone.0091282.
14. Chen S., Wen X., Zhang W., Wang C., Liu J., Liu C. *The FASEB Journal*, 2017, vol. 31, no. 3, pp. 1085–1096. DOI: 10.1096/fj.201601022R.
15. Vogel P., Machado I.K., Garavaglia J., Zani V.T., de Souza D., Dal Bosco S.M. *Nutrición hospitalaria*, 2015, vol. 31, no. 3, pp. 1427–1433. DOI: 10.3305/nh.2015.31.3.8400.
16. Omar S.H., Scott C.J., Hamlin A.S., Obied H.K. *Fitoterapia*, 2018, vol. 128, pp. 118–129. DOI: 10.1016/j.fitote.2018.05.011.
17. Maksimenko E.V., Khizrieva S.S., Borisenko S.N., Lekar A.V., Borisenko N.I., Minkin V.I. *Russian Journal of Physical Chemistry B*, 2021, vol. 15, no. 7, pp. 1196–1199.
18. Galkin A.A., Lunin V.V. *Uspekhi khimii*, 2005, vol. 74, no. 1, pp. 24–40. (in Russ.).
19. Sinev M.Yu., Shapovalova O.V. *Sverkhkriticheskiye flyuidy: teoriya i praktika*, 2020, vol. 15, no. 3, pp. 87–102. DOI: 10.34984/SCFTP.2020.15.3.010. (in Russ.).
20. Liang X., Fan Q. *Journal of Materials Science and Chemical Engineering*, 2013, vol. 1, no. 5, pp. 1–6. DOI: 10.4236/msce.2013.15001.

\* Corresponding author.

21. Vetrova E.V., Maksimenko E.V., Khizrieva S.S., Bugaeva A.F., Borisenko N.I., Minkin V.I. *Journal of natural science, biology, and medicine*, 2017, vol. 8, no. 2, pp. 213–215. DOI: 10.4103/0976-9668.210009.
22. Maksimenko E.V., Lekar A.V., Borisenko S.N., Khizrieva S.S., Vetrova E.V., Borisenko N.I., Minkin V.I. *Russian Journal of Physical Chemistry B*, 2018, vol. 12, no. 8, pp. 1269–1275. DOI: 10.1134/S1990793118080092.
23. Lekar A.V., Maksimenko E.V., Borisenko S.N., Khizrieva S.S., Vetrova E.V., Borisenko N.I., Minkin V.I. *Russian Journal of Physical Chemistry B*, 2019, vol. 13, no. 8, pp. 1273–1278. DOI: 10.1134/S1990793119080049.
24. Lekar A.V., Maksimenko E.V., Borisenko S.N., Khizrieva S.S., Borisenko N.I., Minkin V.I. *Russian Journal of Physical Chemistry B*, 2020, vol. 14, no. 7, pp. 1153–1157. DOI: 10.1134/S199079312007012X.
25. Khizriyeva S.S., Borisenko N.I. *Sverkhkriticheskiye flyuidnyye tekhnologii v reshenii ekologicheskikh problem*. [Supercritical fluid technologies in solving environmental problems]. Arkhangel'sk, 2020, vol. 1, pp. 22–26. (in Russ.).
26. Hayashi Y. *Chemical science*, 2016, vol. 7, no. 2, pp. 866–880. DOI: 10.1039/C5SC02913A.
27. Tutel'yan V.A., Eller K.I., Aleshko-Ozhevskiy Yu.P. *Rukovodstvo po metodam kontrolya kachestva i bezopasno-sti biologicheskii aktivnykh dobavok k pishche*. [Guidance on methods of quality control and safety of biologically active food additives]. Moscow, 2004, pp. 124–126. (in Russ.).
28. Makarova N.V., Zyuzina A.V. *Izvestiya vysshikh uchebnykh zavedeniy. Pishchevaya tekhnologiya*, 2011, vol. 5-6, no. 323-324, pp. 24–25. (in Russ.).
29. Marchenko M.A., Zilfikarov I.N., Ibragimov T.A., Maleyev A.G. *Farmatsiya i farmakologiya*, 2017, vol. 5, no. 3, pp. 222–241. DOI: 10.19163 / 2307-9266-2017-5-3-222-241. (in Russ.).
30. Khasanov V.V., Ryzhova G.L., Mal'tseva Ye.V. *Khimiya rastitel'nogo syr'ya*, 2004, no. 3, pp. 63–75. (in Russ.).
31. Khizriyeva S.S., Borisenko S.N., Maksimenko Ye.V., Vetrova Ye.V., Borisenko N.I., Minkin V.I. *Khimiya rastitel'nogo syr'ya*, 2021, no. 2, pp. 237–246. DOI: 10.14258/jcprm.2021028752. (in Russ.).
32. Volkov V.A., Pakhomov P.M. *Vestnik Tverskogo gosudarstvennogo universiteta. Seriya: Biologiya i ekologiya*, 2007, no. 5, pp. 64–67. (in Russ.).
33. Roche M., Dufour C., Mora N., Dangles O. *Organic and biomolecular chemistry*, 2005, vol. 3, no. 3, pp. 423–430. DOI: 10.1039/B416101G.
34. Vetrova E.V., Maksimenko E.V., Borisenko S.N., Lekar A.V., Borisenko N.I., Minkin V.I. *Russian Journal of Physical Chemistry B*, 2017, vol. 11, no. 7, pp. 1202–1206. DOI: 10.1134/S1990793117070193.
35. Maksimenko E.V., Lekar A.V., Khizrieva S.S., Borisenko S.N., Vetrova E.V., Borisenko N.I., Minkin V.I. *Journal of Natural Science, Biology and Medicine*, 2018, vol. 9, no. 2, pp. 278–281. DOI: 10.4103/jnsbm.JNSBM\_161\_17.
36. Erdogan I., Bayraktar O., Uslu M.E., Tuncel Ö. *Romanian Biotechnological Letters*, 2018, vol. 23, no. 6, pp. 14217–14228. DOI: 10.26327/RBL2018.151.

Received October 29, 2021

Revised December 1, 2021

Accepted February 10, 2022

**For citing:** Khizrieva S.S., Borisenko S.N., Maksimenko E.V., Zharkova G.V., Borisenko N.I. *Khimiya Rastitel'nogo Syr'ya*, 2022, no. 2, pp. 137–146. (in Russ.). DOI: 10.14258/jcprm.20220210519.