

УДК 542.06.542.93.547.918.615.322.634.572

СУБКРИТИЧЕСКАЯ ВОДА КАК ИНСТРУМЕНТ ДЛЯ ПОЛУЧЕНИЯ ИЗ ЛИСТЬЕВ ГИНКГО БИЛОБА (*GINKGO BILOBA* L.) ЭКСТРАКТОВ ВТОРИЧНЫХ РАСТИТЕЛЬНЫХ МЕТАБОЛИТОВ С ВЫСОКОЙ АНТИОКСИДАНТНОЙ АКТИВНОСТЬЮ

© 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@sfedu.ru

Экстракты вторичных растительных метаболитов (ВРМ) с высокой антиоксидантной активностью (АОА) занимают все большее внимание в качестве биологических активных добавок. Для их получения все чаще рассматриваются методы «зеленой химии». В представленной работе для получения экстрактов с высокой антиоксидантной активностью, обогащенных полифенолами, из листьев гинкго билоба (ГБ) *Ginkgo biloba* использована среда субкритической воды (СБВ) в диапазоне температур от 100 до 220 °С. Использование среды СБВ для процессов экстракции позволяет не только увеличить извлечение ВРМ из растительной матрицы, но и добиваться изменения фитохимического профиля полученных экстрактов.

Изучен полифенольный профиль экстрактов листьев ГБ методами УФ/Вид-спектрофотометрии, а также зависимость содержания ВРМ, в виде суммы полифенольных соединений (в том числе флавоноидов) и АОА экстрактов от способа извлечения: в среде СБВ или водно-спиртовой (традиционной) экстракцией. Показано, что содержание полифенольных соединений и АОА активность экстрактов зависят от условий экстракции (температуры СБВ). Продемонстрировано, что полученный из листьев ГБ в среде СБВ при 220 °С экстракт содержит наибольшее количество полифенольных соединений и демонстрирует максимальную АОА (ЕС₅₀=34.7 мкг/мл) среди полученных экстрактов. Представленные результаты демонстрируют перспективность использования СБВ для получения из листьев ГБ экстрактов с высоким содержанием полифенолов для разработки фармпрепаратов и пищевых добавок с высокой АОА.

Ключевые слова: субкритическая вода, антиоксидантная активность, гинкго билоба (*Ginkgo biloba*), полифенолы, флавоноиды, метод Фолина-Чокальтеу, дифенилпикрилгидразил (ДФПГ).

Работа выполнена при поддержке Министерства науки и высшего образования Российской Федерации (государственное задание в сфере научной деятельности, проект № FENW-2023-0017).

Введение

В настоящее время весьма актуально встает тема импортозамещения лекарственных форм препаратов и нутрицевтиков. В нашей стране, богатой природными сырьевыми ресурсами, можно отыскать растительное сырье для производства биологически активных соединений (БАС) для любых медицинских

направлений. Одним из таких природных источников являются листья дерева гинкго билоба (*Ginkgo biloba* L., семейство *Ginkgoaceae*) из-за их широкого спектра целебных свойств [1, 2]. Экстракты листьев гинкго билоба (ГБ) являются ценным источником нейротропных лекарственных соединений, улучшают неврологические функции и давно используются в системах традиционной медицины Индии и Китая [3] для лечения заболеваний пери-

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

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

* Автор, с которым следует вести переписку.

ферических сосудов или церебральной недостаточности [4–6]. Препараты из ГБ получили широкое применение для лечебных целей как в Европе и США, так и в России, но на отечественном фармацевтическом рынке эти препараты практически все представлены в качестве биологически активных добавок, причем доля импортных лекарственных средств на основе гинкго двулопастного составляет более 70% [7]. Основным сырьем для получения экстрактов служат листья и семена. В настоящее время фитопрепараты на основе частично очищенных экстрактов ГБ являются одними из самых продаваемых лекарственных средств во всем мире [8], благодаря этому сухой экстракт листьев ГБ стандартизирован в промышленном производстве лекарственных средств и внесен в Европейскую фармакопею [9]. Этот экстракт содержит терпеновые лактоны, включая гинкголиды А, В, С (2.8–3.4%) и флавоногликозиды (до 27%). Последние хорошо известные антиоксиданты, представленные кверцетином, кемферолом, апигенином и их гликозидами [10].

В подробном обзоре [11] обобщен качественный анализ вторичных растительных метаболитов (ВРМ) гинкго: терпены (монотерпены: цимол, изопропилфенол, тимол, линалоола оксид и ионон; дитерпены: гинкголид А, гинкголид В, гинкголид С, гинкголид J, гинкголид М, гинкголид К и гинкголид L; сесквитерпены: билобалид, билобанон и др.; флавоноиды (гликозиды: никотифлорин (3-О-рутинозид кемпферола), нарциссин (3-О-рутинозид изорамнетина), рутин; агликоны: кемпферол, кверцетин, мирицетин, апигенин, изорамнетин, лютеолин, тамариксетин, 4'-Оме апигенин, 3'-метилмирицетин, катехин, эпикатехин, эпигаллокатехин и галлокатехин и др.). Терпеновые лактоны, флавоноидные гликозиды и их агликоны считаются важными составляющими фармакологического действия листьев гинкго (рис. 1).

Некоторые из этих соединений ГБ (кемпферол и кверцетин) проявляют противоопухолевую активность [12], билобалиды же ингибируют разрушение фосфолипидных мембран – процесс, происходящий при нейродегенерации [13]. ГБ содержит также проантоцианидины, глюкозу, рамнозу, органические кислоты и алкилфенолы (например, гинкголевые кислоты, гинкгол, билобол). Последние вызывают аллергические реакции и поэтому их удаляют из экстрактов [8]. Таким образом, листья ГБ и его стандартизованный экстракт содержат в своем составе многочисленную группу полифенолов, которым и приписываются полезные антиоксидантные и нейропротекторные свойства. Очевидно, что гидролиз флавоноидных гликозидов даст набор агликонов, которые могут иметь новые свойства.

Фармацевтическое качество различных препаратов гинкго сильно зависит от химического состава листьев ГБ и метода экстракции. Это определяет биодоступность и эффективность различных продуктов на основе ВРМ гинкго. Гинкголиды и билобалиды хорошо растворимы в полярных и среднеполярных органических растворителях, таких как низшие спирты, тетрагидрофуран, ацетон и этилацетат, при этом умеренно растворимы в диэтиловом эфире и воде и нерастворимы в неполярных растворителях, таких как хлороформ, толуол и гексан [8]. Растворимость этих ВРМ в воде значительно возрастает при повышении температуры и добавлении метанола [14]. В литературе описан следующий метод получения жидкого экстракта из листьев ГБ: реперколяция с заверренным циклом, соотношение сырье : экстрагент 1 : 4.5, экстрагент спирт этиловый 70%, время экстракции 24 ч [15].

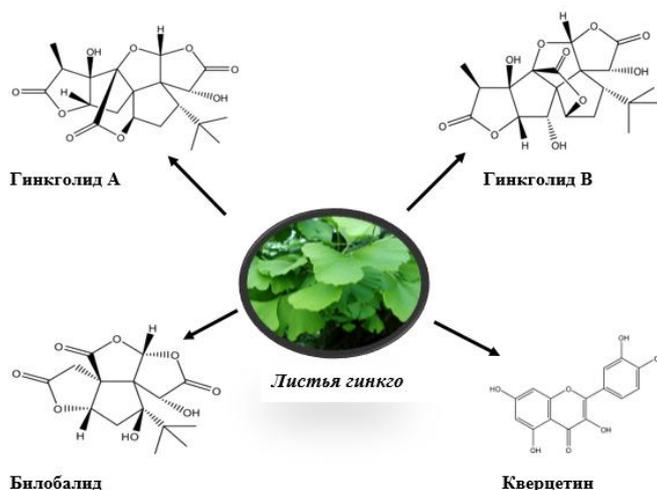


Рис. 1. Структурные формулы фармакологически значимых компонентов листьев гинкго

Одним из важнейших показаний к применению листьев ГБ является их высокая антиоксидантная активность (АОА), которая связана с содержанием в них многочисленных полифенолов [16]. Известно, что полифенольные соединения проявляют антиоксидантный эффект, подавляя свободные радикалы и/или способствуя эндогенной антиоксидантной способности [17]. Доказано, что гинкго эффективен при болезни Альцгеймера (БА) – формы слабоумия, при которой интеллектуальные способности различных областей мозга постепенно ухудшаются, особенно с возрастом [18]. Экстракт листьев ГБ ингибирует накопление активных форм кислорода, вызванное бета-амилоидным пептидом А β (в том числе благодаря наличию флавоноида кверцетина), а также снижает апоптоз нейронов и, таким образом, помогает облегчить БА [19].

Антиоксидантная способность листьев ГБ выше у спиртовых экстрактов, чем у водных экстрактов, поэтому настойки могут быть более эффективными, чем водные растворы листьев. Косметические продукты, содержащие экстракт листьев ГБ, пользуются большим спросом, так как благодаря своим антиоксидантным свойствам обладают сильным омолаживающим эффектом, способствуя клеточной регенерации [8].

По этой причине разработка новых методов извлечения экстрактов листьев ГБ, обогащенных полифенольными ВРМ и обладающих высокой АОА, является важной задачей с практической точки зрения.

Как было отмечено в ряде работ [20, 21], традиционный подход к извлечению БАС из твердых образцов для производства лекарств – это в основном экстрагирование органическими растворителями. Поскольку при производстве лекарственных препаратов довольно сложно удалить полностью остатки этих токсичных растворителей, это создает риск для здоровья при их использовании. Поэтому необходима их замена безопасными растворителями. Такой альтернативой является субкритическая вода [22], которая способна заменить токсичные и пожароопасные растворители, такие как дихлорметан, ацетон, этилацетат, метанол, традиционно используемые для экстракции органических веществ из различных матриц [8]. Так, недавно показано, что для получения экстрактов из листьев ГБ может быть с успехом использована экологически чистая среда субкритической воды (СБВ) [23]. 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 [22, 24]. В этом температурном диапазоне значительно изменяются важнейшие физико-химические характеристики СБВ (константа ионизации, поверхностное натяжение, вязкость и константа диэлектрической проницаемости). Например, при повышении температуры до 225 °С величина диэлектрической проницаемости (ϵ) воды снижается с 86 до 30, что сопоставимо со значением диэлектрической проницаемости метанола ($\epsilon=32.6$) при комнатной температуре, т.е. СБВ ведет себя подобно органическому растворителю, так как имеет гораздо более низкую ϵ , чем вода при 25 °С. Описанные свойства СБВ позволяют получить продукты экстракции в виде осадка той или иной степени чистоты после ее охлаждения до комнатной температуры [25].

В этой связи цель работы – разработка и изучение способов экстракции для получения из листьев ГБ (*Ginkgo biloba*) в среде СБВ продуктов, обогащенных полифенолами и демонстрирующих высокую АОА и сравнение СБВ-экстракции с традиционным способом извлечения.

Экспериментальная часть

Химические вещества (реактивы). В качестве объекта исследования использовали листья гинкго двудлопастного (*Ginkgo biloba*; регион произрастания – Алтайский край, Россия), которые были приобретены у ООО «Здрава Краса» (Россия). Ацетонитрил (марка LC/MS) фирмы «Криохром». Серная кислота (осч), хлороформ (осч), Na₂CO₃ (безводный, ч) и уксусная ледяная кислота (хч) приобретали у ОАО «Вектон» (Россия). Реактив Фолина-Чокальтеу (2 М) приобретен у *Sigma-Aldrich*. Дифенилпикрилгидразил (ДФПГ, 95%, Япония) фирмы *Alfa Aesar*. Галловая кислота (б/в, не менее 98%) фирмы *ДИА-М* (Россия). Соляная кислота (осч, фирма *Сигма Тек*). Рутин (98%) фирмы *Sichuan Xieli Pharmaceutical Co., Ltd.* (Китай).

Используемое оборудование. Спектрофотометр СПЕКС ССП 705 (UV-VIS, 190–1100 нм, производитель ЗАО «Спектроскопические системы», РФ) с программным обеспечением (*UV-VIS analyst*).

Получение экстрактов. В представленной работе для получения экстрактов из листьев ГБ использованы два различных метода экстракции: 1) традиционный способ экстракции растворителем (этанол-вода), и 2) методы с использованием среды СБВ, как описано ранее [23].

Традиционная экстракция. Водно-спиртовую экстракцию (традиционный способ) проводили следующим образом: навеску 1 г сухих листьев ГБ, измельченную до 10⁻¹ мм и взвешенную с учетом фракционного состава добавляли к 30 мл 70% этанола и кипятили в колбе с обратным холодильником на водяной

бане ($T=80.1\text{ }^{\circ}\text{C}$) в течение 60 мин. Процедуру повторяли 3 раза. Полученные водно-спиртовые извлечения фильтровали через бумагу марки «белая лента», отстаивали в прохладном и темном месте. Выпавшие балластные вещества повторно отфильтровывали через фильтровальную бумагу.

СБВ-экстракция. Получение экстрактов в среде СБВ проводили с использованием изготовленного из нержавеющей стали (марки 12X18Н10Т) реактора с внутренним $V=10$ мл [23, 26], в который помещали навеску 0.5 г измельченных до 10^{-1} мм сухих листьев гинкго и 7 мл дистиллированной воды. При таком соотношении обеспечивается наличие свободного от жидкости объема в реакторе. Поэтому в диапазоне температур ($100\text{--}374\text{ }^{\circ}\text{C}$) парциальное давление водяного пара в реакторе соответствует давлению насыщающего пара для данной температуры (например, $p=1.55$ МПа при $t=200\text{ }^{\circ}\text{C}$). Реактор герметично закрывали и устанавливали в сушильный шкаф при заданной температуре ($100\text{--}220\text{ }^{\circ}\text{C}$; $\pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$) на 1 ч. Затем реактор охлаждали (15 мин) до комнатной температуры в резервуаре с холодной водой. Содержимое реактора количественно переносили на бумажный фильтр и промывали остаток на фильтре 70% этанолом (до бесцветных вод) в мерный цилиндр.

Полученные после традиционной и СБВ-экстракции фильтраты высушивали при $t<50\text{ }^{\circ}\text{C}$ под вентилятором. Для определения *in vitro* АОА, суммы полифенолов и флавоноидов в листьях ГБ сухие экстракты растворяли в 70% этаноле ($C_{\text{экстракта}}=1$ мг/мл).

Определение суммы полифенолов и флавоноидов в экстрактах листьев гинкго билоба. Оценку содержания фенольных соединений в избранных объектах проводили по колориметрическому методу Фолина-Чокальтеу [27], который широко используется в биологии и химии для относительного количественного определения фенолов. Полифенолы легко окисляются основными компонентами реактива Фолина-Чокальтеу – гетерополисоединениями, содержащими молибден (VI) или вольфрам (VI), которые в восстановленном состоянии М (V) имеют максимум поглощения при $700\text{--}750$ нм [28].

Для определения суммы полифенолов 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 ранее в работе [26]. Методом линейного регрессионного анализа были получены уравнения градуировочной кривой по галловой кислоте $y=107.3x+0.003$; $R^2=0.997$ и по рутину $y=40.913x+0.031$; $R^2=0.997$. Сумму флавоноидов (мг/г сырья) в экстрактах листьев ГБ определяли методом прямой спектрофотометрии [29] на длине волны 362 нм, как описано ранее в работе [26], по уравнению градуировочной кривой $y=29.6x$; $R^2=0.999$.

Определение антиоксидантной активности (АОА) экстрактов в тесте с ДФПГ (*in vitro*). АОА экстрактов листьев ГБ исследовали *in vitro* в реакции со стабильным свободным радикалом ДФПГ (1,1-дифенил-2-пикрилгидразил) [30], как описано ранее [31] с небольшими модификациями [26]. Количественный анализ реакции переноса атома водорода (H-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 при $\lambda_{\text{max}}=516$ нм (в этаноле), которая отражает конверсию радикала ДФПГ в соответствующий бесцветный дифенилпикрилгидразин (ДФПГ-H) антиоксидантом [32].

Исследуемые на АОА растворы экстрактов ($C=1$ мг/мл) разбавляли подкисленным этанолом (0.5 мМ HCl) до концентраций стандартного разведения. В кювету помещали 1.7 мл этанольного раствора ДФПГ ($C_{\text{ДФПГ}}=1\times 10^{-4}$ М). Фиксировали длину волны (λ), соответствующую максимуму поглощения раствора ДФПГ и оптическую плотность D_0 . Затем в кювету к ДФПГ 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 в кюветах $l=10$ мм при $\lambda=516$ нм и $t=25\text{ }^{\circ}\text{C}$, регистрируя расхождение ДФПГ в реакции с полифенольным соединением. АОА активность определяли как значения величины EC_{50} , которую выражают как количество мкг антиоксиданта в 1 мл раствора ДФПГ стандартизированной концентрации, необходимое для ее уменьшения в 2 раза. Чтобы получить количественный параметр EC_{50} , рассчитывали % непрореагировавшего ДФПГ за 30 мин реакции по формуле

$$D_{t=30\text{мин}}/D_0 \cdot 100,$$

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 листьев ГБ) в мкг/мл. Из уравнения линейной зависимости полученной прямой рассчитывали значения EC_{50} – концентрации экстракта ГБ при которой падение оптической плотности ДФПГ на $\lambda=516$ нм за первые 30 мин реакции с растворами экстрактов достигло 50%. Например, для СБВ-экстракта 220 °C уравнение линейной зависимости имело вид: $y=-1.58x+104.96$; $R^2=1.00$ (рис. 2Б).

Обсуждение результатов

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

На первом этапе исследования определен общий фенольный профиль в экстрактах ГБ в эквивалентных единицах галловой кислоты (ЭГК). Обнаружено, что экстракт, полученный традиционной водно-спиртовой экстракцией, содержал фенольных соединений в количестве 24.4 мг ЭГК на 1 г сырья. Определены количества полифенолов, образующихся в СБВ-экстрактах в интервале температур 120–220 °C. Так, общий выход полифенолов (табл.) в экстрактах, полученных с использованием СБВ при 140, 160, 180, 200 и 220 °C, в пересчете на галловую кислоту составил 16.0, 19.6, 28.9, 34.2 и 35.4 мг ЭГК/г сырья соответственно. Таким образом, продемонстрировано, что сумма полифенолов в пересчете на ЭГК в экстракте ГБ, полученном в среде СБВ при 220 °C (35.4 мг/г) выше, чем в экстракте, полученном традиционным способом (24.4 мг/г).

На следующем этапе определено содержание полифенолов и флавоноидов в экстрактах листьев ГБ в пересчете на эквивалент рутина (ЭР): больше всего фенолов содержится в СБВ-экстракте листьев ГБ, полученном при 220 °C – 90.6 мг ЭР/г, а для экстракта, полученного традиционным способом – 63.0 мг ЭР/г сырья (рис. 3).

Аналогично, флавоноидов больше всего обнаружено в экстракте ГБ, полученном в среде СБВ при 220 °C – 24.6 мг ЭР/г, тогда как в экстракте, полученном традиционным способом, – 19.9 мг ЭР/г сырья (табл.). Таким образом, в экстрактах листьев ГБ подобная по ЭГК зависимость содержания фенолов от способа экстракции наблюдается и для суммы полифенолов (или флавоноидов) в пересчете на ЭР.

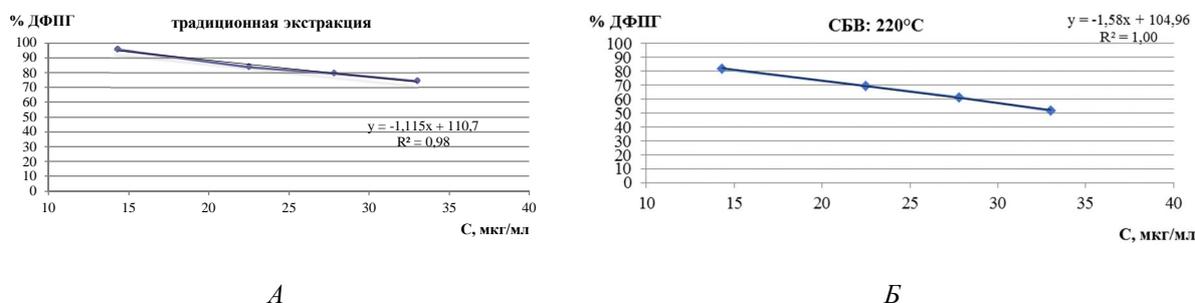


Рис. 2. Типичные кривые зависимости поглощения молекул ДФПГ от концентрации экстракта листьев ГБ, полученного при: А) традиционной и Б) СБВ-экстракции при 220 °C

Антиоксидантная активность, масса сухого экстракта и содержание полифенолов в эквиваленте галловой кислоты (ЭГК) и флавоноидов в эквиваленте рутина (ЭР) в экстрактах листьев ГБ, полученных с помощью различных методов

| Метод экстракции | Антирадикальная активность (EC_{50}), мкг/мл | Сумма полифенолов по галловой кислоте, мг ЭГК/г | Сумма флавоноидов по рутину, мг ЭР/г | Масса полученного сухого экстракта, г |
|-------------------------|--|---|--------------------------------------|---------------------------------------|
| СБВ: 140 °C | 61.3 | 16.0 | 12.3 | 0.33 |
| 160 °C | 51.5 | 19.6 | 16.7 | 0.38 |
| 180 °C | 44.1 | 28.9 | 17.9 | 0.45 |
| 200 °C | 35.1 | 34.2 | 24.6 | 0.48 |
| 220 °C | 34.7 | 35.4 | 24.6 | 0.50 |
| водно-спиртовая (трад.) | 54.5 | 24.4 | 19.9 | 0.34 |

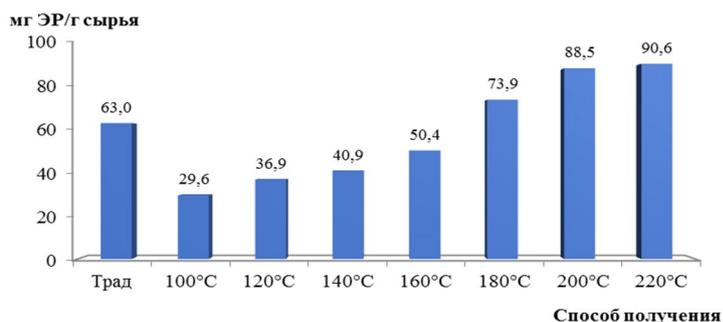


Рис. 3. Сумма полифенолов в экстрактах ГБ (метод Фолина-Чокальтеу) по рутину

Для определения АОА экстрактов листьев ГБ в тесте с ДФПГ (*in vitro*) строили кинетические кривые зависимости величины поглощения A (на $\lambda=516$ нм) растворов антиоксиданта от времени реакции с ДФПГ. На рисунке 4 представлены типичные кинетические кривые реакции с ДФПГ растворов экстракта ГБ различной концентрации, полученного традиционной экстракцией (рис. 4А) и в СБВ при 220 °С (рис. 4Б). Как видно из кинетических кривых, падение оптической плотности раствора ДФПГ (на $\lambda=516$ нм) в присутствии СБВ-экстракта (220 °С) сильнее, чем в присутствии экстракта листьев ГБ, полученного традиционной экстракцией.

Используя кинетические кривые (рис. 4) и кривые «доза-эффект» (рис. 2), были рассчитаны значения эффективных концентраций EC_{50} для АОА экстрактов ГБ (рис. 5).

Результаты ДФПГ-теста на АОА экстрактов листьев ГБ (рис. 5), полученных традиционной (водно-спиртовой) экстракцией и в среде СБВ, демонстрируют, что наивысшую активность по улавливанию свободных радикалов с самым низким значением $EC_{50}=34.7$ мкг/мл проявил СБВ-экстракт при 220 °С. Кроме того, все экстракты продемонстрировали дозозависимую АОА.

Близкую по значению EC_{50} активность с экстрактом, полученным традиционным способом ($EC_{50}=54.5$ мкг/мл), показал СБВ-экстракт (160 °С) с $EC_{50}=51.5$ мкг/мл. Таким образом, полученные в СБВ при $t=200-220$ °С экстракты листьев ГБ обладают достаточно высокой АОА по сравнению с экстрактами, полученными традиционным способом.

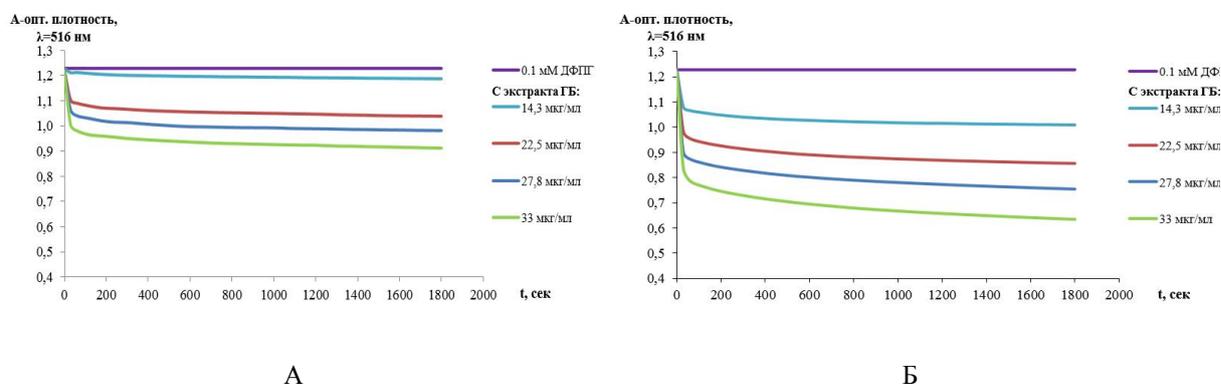


Рис. 4. Кинетические кривые реакции ДФПГ ($t_{\text{реакции}}=30$ мин) с экстрактами листьев ГБ (С от 14.3 до 33 мкг/мл), полученных: А) традиционной и Б) СБВ-экстракцией (220 °С)

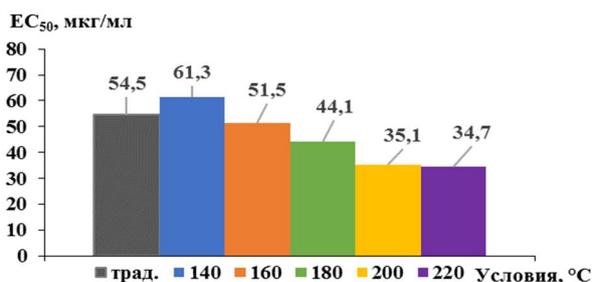


Рис. 5. Значения АОА – EC_{50} (мкг/мл) для экстрактов листьев гинкго, полученных с помощью различных методов: традиционной и СБВ-экстракцией

Результаты нашей работы демонстрируют, что значения суммарного содержания фенолов значительно варьируются в зависимости от условий экстракции. Поглощающая ДФПГ активность экстрактов листьев ГБ, полученных различными методами экстракции, варьировалась в порядке уменьшения следующим образом: СБВ-220 °С > СБВ-200 °С > СБВ-180 °С > СБВ-160 °С > Тради. > СБВ-140 °С. Таким образом, изменение только одного параметра процесса (температуры СБВ) позволяет регулировать качественный и количественный состав экстрактов листьев гинкго.

Увеличение содержания суммы фенолов и АОА экстрактов с ростом температуры экстракции в среде СБВ определяется изменениями ее физико-химических характеристик, приводящих к увеличению растворимости растительных метаболитов, с одной стороны, а также термической трансформации в СБВ исходных полифенолов, содержащихся в листьях ГБ, с другой стороны. Полученные результаты согласуются с результатами работ [33, 34], авторы которых предположили, что более высокая АОА экстрактов при высоких температурах с использованием воды в субкритическом состоянии обусловлена более эффективной экстракцией фенольных соединений, а также продуктами реакции Майяра, карамеллизации и термического окисления. В частности, мягкий пиролиз (228 °С, 15 мин) розмариновой, хлорогеновой и кофейной кислот, а также субкритическая обработка водой некоторых фенольных соединений, особенно кофейной кислоты приводила к продуктам, которые проявляли высокую активность в нейтрализации ДФПГ [35, 36]. В нашей работе повышение количества полифенолов при температуре СБВ 220 °С объясняется возможностью гидролиза гликозидов до более активных агликонов, а также разложения других компонентов гинкго до низкомолекулярных органических соединений, подобных фенольным кислотам. Совокупность и синергизм этих веществ определяют АОА полученных экстрактов.

Заключение

Впервые среда СБВ использована для получения обогащенных полифенолами экстрактов из листьев ГБ, демонстрирующих антиоксидантную активность, зависящих от температуры СБВ.

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

Продемонстрировано, что АОА-активность экстрактов ГБ, полученных в среде СБВ в интервале температур 140–220 °С, возрастает с повышением температуры при субкритической водной экстракции. При этом раствор экстракта из листьев ГБ, полученный в СБВ при 220 °С, демонстрирует максимальную антиоксидантную активность, в отличие от экстракта, полученного традиционным способом.

Представленные результаты демонстрируют высокий потенциал техники экстракции с использованием субкритической воды для получения коммерческих экстрактов из листьев ГБ, обогащенных полифенолами, которые обладают АОА активностью и в перспективе могут стать основой для разработки фармацевтических субстанций и пищевых добавок.

Список литературы

1. Singh S.K., Srivastav S., Castellani R.J., Plascencia-Villa G., Perry G. Neuroprotective and antioxidant effect of Ginkgo biloba extract against AD and other neurological disorders // *Neurotherapeutics*. 2019. Vol. 16. N3. Pp. 666–674. DOI: 10.1007/s13311-019-00767-8.
2. Kale M.K., Patil M.P., Bhusari K.P. Evaluation of Ginkgo biloba in Diabetic Nephrotoxicity // *Research Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry*. 2011. Vol. 3. N6. Pp. 286–288.
3. Natarajan S., Shunmugiah K.P., Kasi P.D. Plants traditionally used in age-related brain disorders (dementia): an ethnopharmacological survey // *Pharmaceutical biology*. 2013. Vol. 51. N4. Pp. 492–523. DOI: 10.3109/13880209.2012.738423.
4. Sasaki K., Wada K., Haga M. Chemistry and biological activities of Ginkgo biloba // *Studies in natural products chemistry*. 2003. Vol. 28. Pp. 165–198. DOI: 10.1016/S1572-5995(03)80141-2.
5. Chan P.C., Xia Q., Fu P.P. Ginkgo biloba leave extract: biological, medicinal, and toxicological effects // *Journal of environmental science and health part C*. 2007. Vol. 25. N3. Pp. 211–244. DOI: 10.1080/10590500701569414.
6. Van Beek T.A., Montoro P. Chemical analysis and quality control of Ginkgo biloba leaves, extracts, and phytopharmaceuticals // *Journal of Chromatography A*. 2009. Vol. 1216. N11. Pp. 2002–2032. DOI: 10.1016/j.chroma.2009.01.013.

7. Караева А.М., Нартикова М.И., Каболова М.З. Фитохимический анализ листьев *Ginkgo biloba*, интродуцированного в РСО-Алания // Вестник новых медицинских технологий. 2020. Т. 27. №1. С. 52–54. DOI: 10.24411/1609-2163-2020-16548.
8. Fisher E. *Ginkgo biloba: Biology, Uses and Health Benefits*. New York: Nova Science Publishers, 2016. 105 p.
9. Wiesner J., Eibl E.-M., Palomino O. Committee on Herbal Medicinal Products (HMPC). Ph. Eur. 7-th edition (7.5), ref. 04/2008:1827. 2012. 116 p.
10. Васильев В.Г., Прокопьев А.С., Калабин Г.А. Идентификация терпеновых лактонов и флавоногликозидов в препаратах на основе экстракта Гинкго билоба и новый способ полуколичественной оценки содержания флавоногликозидов методом спектроскопии ЯМР ¹H // Химия растительного сырья. 2016. №3. С. 85–93. DOI: 10.14258/jcprm.2016031234.
11. Singh B., Kaur P., Singh R.D., Ahuja P.S. Biology and chemistry of *Ginkgo biloba* // Fitoterapia. 2008. Vol. 79. N6. Pp. 401–418. DOI: 10.1016/j.fitote.2008.05.007.
12. Kang J.W., Kim J.H., Song K., Kim S.H., Yoon J.H., Kim K.S. Kaempferol and quercetin, components of *Ginkgo biloba* extract (Egb 761), induce caspase-3-dependent apoptosis in oral cavity cancer cells // Phytotherapy Research. 2010. Vol. 24. Pp. 77–82. DOI: 10.1002/ptr.2913.
13. Leistner E., Drewke C. *Ginkgo biloba* and ginkgotoxin // Journal of natural products. 2010. Vol. 73. N1. Pp. 86–92. DOI: 10.1021/np9005019.
14. Van Beek T.A., Scheeren H.A., Rantio T., Melger W.C., Lelyveld G.P. Determination of ginkgolides and bilobalide in *Ginkgo biloba* leaves and phytopharmaceuticals // Journal of Chromatography A. 1991. Vol. 543. Pp. 375–387. DOI: 10.1016/S0021-9673(01)95789-9.
15. Огай М.А., Ковтун Е.В., Чахирова А.А., Саморядова А.Б., Богатырева З.Н. Разработка и исследование фитоэкстрактов, содержащих флавоноиды // Научные результаты биомедицинских исследований. 2018. Т. 4. №2. С. 90–103. DOI: 10.18413/2313-8955-2018-4-2-0-10.
16. Ding X., Ouyang M.A., Liu X., Wang R.Z. Acetylcholinesterase inhibitory activities of flavonoids from the leaves of *Ginkgo biloba* against brown planthopper // Journal of Chemistry. 2013. Vol. 2013. Article 645086. DOI: 10.1155/2013/645086.
17. Dhiman P., Malik N., Sobarzo-Sánchez E., Uriarte E., Khatkar A. Quercetin and related chromenone derivatives as monoamine oxidase inhibitors: targeting neurological and mental disorders // Molecules. 2019. Vol. 24. N3. P. 418. DOI: 10.3390/molecules24030418.
18. Perry E.K., Pickering A.T., Wang W.W., Houghton P., Perry N.S. Medicinal plants and Alzheimer's disease: Integrating ethnobotanical and contemporary scientific evidence // The Journal of Alternative and Complementary Medicine. 1998. Vol. 4. N4. Pp. 419–428. DOI: 10.1089/acm.1998.4.419.
19. Yao Z.X., Han Z., Drieu K., Papadopoulos V. *Ginkgo biloba* extract (Egb 761) inhibits β -amyloid production by lowering free cholesterol levels // The Journal of nutritional biochemistry. 2004. Vol. 15. N12. Pp. 749–756. DOI: 10.1016/j.jnutbio.2004.06.008.
20. Kakar M.U., Kakar I.U., Mehboob M.Z., Zada S., Soomro H., Umair M., Iqbal I., Umer M., Shaheen S., Syed S.F., Deng Y., Dai R. A review on polysaccharides from *Artemisia sphaerocephala* Krasch seeds, their extraction, modification, structure, and applications // Carbohydrate Polymers. 2021. Vol. 252. 117113. DOI: 10.1016/j.carbpol.2020.117113.
21. de Mello J.C.P., Valone L. 4 Extraction, Isolation // Phytotechnology: A Sustainable Platform for the Development of Herbal Products. 2022. P. 85. DOI: 10.1201/9781003225416-6.
22. 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.
23. Хизриева С.С., Борисенко С.Н., Максименко Е.В., Жаркова Г.В., Борисенко Н.И., Минкин В.И. Оценка полифенольного состава и активности ингибирования ацетилхолинэстеразы экстрактов листьев гинкго билоба (*Ginkgo biloba* L.), полученных в субкритической воде // Сверхкритические флюиды: теория и практика. 2021. Т. 16. №4. С. 70–82. DOI: 10.34984/SCFTP.2021.16.4.007.
24. 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.
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. 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/jcprm.20220210519.
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. 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. 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.
32. 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.
33. Getachew A.T., Chun B.S. Influence of hydrothermal process on bioactive compounds extraction from green coffee bean // Innovative food science and emerging technologies. 2016. Vol. 38. Pp. 24–31. DOI: 10.1016/j.ifset.2016.09.006.
34. Carciochi R.A., Dimitrov K. Effect of malting conditions on phenolic content, Maillard reaction products formation, and antioxidant activity of quinoa seeds // Journal of food science and technology. 2016. Vol. 53. N11. Pp. 3978–3985. DOI: 10.1007/s13197-016-2393-7.
35. Guillot F.L., Malnoë A., Stadler R.H. Antioxidant properties of novel tetraoxygenated phenylindan isomers formed during thermal decomposition of caffeic acid // Journal of Agricultural and Food Chemistry. 1996. Vol. 44. N9. Pp. 2503–2510. DOI: 10.1021/jf9508155.
36. Khuwijitjaru P., Plernjit J., Suaylam B., Samuhaseneetoo S., Pongsawatmanit R., Adachi S. Degradation kinetics of some phenolic compounds in subcritical water and radical scavenging activity of their degradation products // The Canadian Journal of Chemical Engineering. 2014. Vol. 92. N5. Pp. 810–815. DOI: 10.1002/cjce.21898.

Поступила в редакцию 31 мая 2022 г.

После переработки 15 июля 2022 г.

Принята к публикации 11 марта 2023 г.

Для цитирования: Хизриева С.С., Борисенко С.Н., Максименко Е.В., Жаркова Г.В., Борисенко Н.И. Субкритическая вода как инструмент для получения из листьев гинкго билоба (*Ginkgo biloba* L.) экстрактов вторичных растительных метаболитов с высокой антиоксидантной активностью // Химия растительного сырья. 2023. №2. С. 241–251. DOI: 10.14258/jcprm.20230211437.

Khizrieva S.S., Borisenko S.N., Maksimenko Ye.V., Zharkova G.V., Borisenko N.I. SUBCRITICAL WATER AS A TOOL FOR OBTAINING EXTRACTS OF SECONDARY PLANT METABOLITES WITH HIGH ANTIOXIDANT ACTIVITY FROM GINKGO BILOBA L. LEAVES*

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

Extracts of secondary plant metabolites (SPM) with high antioxidant activity (AOA) are gaining more and more attention as biologically active additives. To obtain them, methods of "green chemistry" are increasingly being considered. In the present work, to obtain extracts with high antioxidant activity enriched of polyphenols from the leaves of Ginkgo biloba (GB), medium of a subcritical water (SCW) was used in the temperature range from 100 to 220 °C. The use medium of the SCW for extraction processes allows not only to increase the extraction of SPM from the plant matrix, but also to achieve a change in the phytochemical profile of the obtained extracts.

The polyphenol profile of extracts leaf's GB was studied by UV/Vis spectrophotometry, as well as the dependence of the content of SPM, in the form of the sum of polyphenolic compounds (including flavonoids) and AOA of extracts, on the extraction method: in medium of SCW or water-alcohol (traditional) extraction. It has been shown that the content of polyphenolic compounds and the AOA of extracts depend on the extraction conditions (temperature of SCW). It was demonstrated that the extract obtained from leaves of GB in SCW at 220 °C contains the highest amount of polyphenolic compounds and demonstrates the maximum AOA (EC₅₀=34.7 µg/ml) among the obtained extracts. The presented results demonstrate the promise of using SCW to obtain extracts from leaves of GB with a high content of polyphenols for the development of pharmaceuticals and food supplements with high AOA.

Keywords: subcritical water, antioxidant activity, ginkgo biloba (*Ginkgo biloba*), polyphenols, flavonoids, Folin-Chocalteu method, 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH).

References

1. Singh S.K., Srivastav S., Castellani R.J., Plascencia-Villa G., Perry G. *Neurotherapeutics*, 2019, vol. 16, no. 3, pp. 666–674. DOI: 10.1007/s13311-019-00767-8.
2. Kale M.K., Patil M.P., Bhusari K.P. *Research Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry*, 2011, vol. 3, no. 6, pp. 286–288.
3. Natarajan S., Shunmugiah K.P., Kasi P.D. *Pharmaceutical biology*, 2013, vol. 51, no. 4, pp. 492–523. DOI: 10.3109/13880209.2012.738423.
4. Sasaki K., Wada K., Haga M. *Studies in natural products chemistry*, 2003, vol. 28, pp. 165–198. DOI: 10.1016/S1572-5995(03)80141-2.
5. Chan P.C., Xia Q., Fu P.P. *Journal of environmental science and health part C*, 2007, vol. 25, no. 3, pp. 211–244. DOI: 10.1080/10590500701569414.
6. Van Beek T.A., Montoro P. *Journal of Chromatography A*, 2009, vol. 1216, no. 11, pp. 2002–2032. DOI: 10.1016/j.chroma.2009.01.013.
7. Karayeva A.M., Nartikoyeva M.I., Kabolova M.Z. *Vestnik novykh meditsinskikh tekhnologiy*, 2020, vol. 27, no. 1, pp. 52–54. DOI: 10.24411/1609-2163-2020-16548. (in Russ.).
8. Fisher E. *Ginkgo biloba: Biology, Uses and Health Benefits*. New York: Nova Science Publishers, 2016, 105 p.
9. Wiesner J., Eibl E.-M., Palomino O. *Committee on Herbal Medicinal Products (HMPC). Ph. Eur. 7-th edition (7.5), ref. 04/2008:1827*. 2012, 116 p.
10. Vasil'yev V.G., Prokop'yev A.S., Kalabin G.A. *Khimiya rastitel'nogo syr'ya*, 2016, no. 3, pp. 85–93. DOI: 10.14258/jcpm.2016031234. (in Russ.).
11. Singh B., Kaur P., Singh R.D., Ahuja P.S. *Fitoterapia*, 2008, vol. 79, no. 6, pp. 401–418. DOI: 10.1016/j.fitote.2008.05.007.
12. Kang J.W., Kim J.H., Song K., Kim S.H., Yoon J.H., Kim K.S. *Phytotherapy Research*, 2010, vol. 24, pp. 77–82. DOI: 10.1002/ptr.2913.
13. Leistner E., Drewke C. *Journal of natural products*, 2010, vol. 73, no. 1, pp. 86–92. DOI: 10.1021/np9005019.
14. Van Beek T.A., Scheeren H.A., Rantio T., Melger W.C., Lelyveld G.P. *Journal of Chromatography A*, 1991, vol. 543, pp. 375–387. DOI: 10.1016/S0021-9673(01)95789-9.
15. Ogay M.A., Kovtun Ye.V., Chakhirova A.A., Samoryadova A.B., Bogatyreva Z.N. *Nauchnyye rezul'taty biomeditsinskikh issledovaniy*, 2018, vol. 4, no. 2, pp. 90–103. DOI: 10.18413/2313-8955-2018-4-2-0-10. (in Russ.).
16. Ding X., Ouyang M.A., Liu X., Wang R.Z. *Journal of Chemistry*, 2013, vol. 2013, article 645086. DOI: 10.1155/2013/645086.
17. Dhiman P., Malik N., Sobarzo-Sánchez E., Uriarte E., Khatkar A. *Molecules*, 2019, vol. 24, no. 3, p. 418. DOI: 10.3390/molecules24030418.
18. Perry E.K., Pickering A.T., Wang W.W., Houghton P., Perry N.S. *The Journal of Alternative and Complementary Medicine*, 1998, vol. 4, no. 4, pp. 419–428. DOI: 10.1089/acm.1998.4.419.
19. Yao Z.X., Han Z., Drieu K., Papadopoulos V. *The Journal of nutritional biochemistry*, 2004, vol. 15, no. 12, pp. 749–756. DOI: 10.1016/j.jnutbio.2004.06.008.
20. Kakar M.U., Kakar I.U., Mehboob M.Z., Zada S., Soomro H., Umair M., Iqbal I., Umer M., Shaheen S., Syed S.F., Deng Y., Dai R. *Carbohydrate Polymers*, 2021, vol. 252, 117113. DOI: 10.1016/j.carbpol.2020.117113.

* Corresponding author.

21. de Mello J.C.P., Valone L. *Phytotechnology: A Sustainable Platform for the Development of Herbal Products*, 2022, p. 85. DOI: 10.1201/9781003225416-6.
22. Galkin A.A., Lunin V.V. *Uspekhi khimii*, 2005, vol. 74, no. 1, pp. 24–40. (in Russ.).
23. Khizriyeva S.S., Borisenko S.N., Maksimenko Ye.V., Zharkova G.V., Borisenko N.I., Minkin V.I. *Sverkhkriticheskiye flyuidy: teoriya i praktika*, 2021, vol. 16, no. 4, pp. 70–82. DOI: 10.34984/SCFTP.2021.16.4.007. (in Russ.).
24. Sinov 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.).
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. Khizriyeva S.S., Borisenko S.N., Maksimenko Ye.V., Zharkova G.V., Borisenko N.I. *Khimiya rastitel'nogo syr'ya*, 2022, no. 2, pp. 137–146. DOI: 10.14258/jcprm.20220210519. (in Russ.).
27. Tutel'yan V.A., Eller K.I., Aleshko-Ozhevskiy Yu.P. *Rukovodstvo po metodam kontrolya kachestva i bezopasnosti 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, 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. Volkov V.A., Pakhomov P.M. *Vestnik Tverskogo gosudarstvennogo universiteta. Seriya: Biologiya i ekologiya*, 2007, no. 5, pp. 64–67. (in Russ.).
32. Roche M., Dufour C., Mora N., Dangles O. *Organic and biomolecular chemistry*, 2005, vol. 3, no. 3, pp. 423–430. DOI: 10.1039/B416101G.
33. Getachew A.T., Chun B.S. *Innovative food science and emerging technologies*, 2016, vol. 38, pp. 24–31. DOI: 10.1016/j.ifset.2016.09.006.
34. Carciochi R.A., Dimitrov K. *Journal of food science and technology*, 2016, vol. 53, no. 11, pp. 3978–3985. DOI: 10.1007/s13197-016-2393-7.
35. Guillot F.L., Malnoë A., Stadler R.H. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 1996, vol. 44, no. 9, pp. 2503–2510. DOI: 10.1021/jf9508155.
36. Khuwijitjaru P., Plernjit J., Suaylam B., Samuhaseneetoo S., Pongsawatmanit R., Adachi S. *The Canadian Journal of Chemical Engineering*, 2014, vol. 92, no. 5, pp. 810–815. DOI: 10.1002/cjce.21898.

Received May 31, 2022

Revised July 15, 2022

Accepted March 11, 2023

For citing: Khizrieva S.S., Borisenko S.N., Maksimenko Ye.V., Zharkova G.V., Borisenko N.I. *Khimiya Rastitel'nogo Syr'ya*, 2023, no. 2, pp. 241–251. (in Russ.). DOI: 10.14258/jcprm.20230211437.

