

УДК 615.322+ 542.61.[54.061+543.544+64.062+ 543.421/.424]

ВЫБОР ОПТИМАЛЬНОГО ЭКСТРАГЕНТА И УСЛОВИЙ АНАЛИЗА ФЕНОЛЬНЫХ СОЕДИНЕНИЙ ЛИСТЬЕВ ОЛИВЫ ЕВРОПЕЙСКОЙ (*OLEA EUROPAEA* L.)

© *В.Н. Леонова**, *А.Г. Курегян*

*Пятигорский медико-фармацевтический институт – филиал ФГБОУ ВО
ВолаГМУ Минздрава России, пр. Калинина 11, Пятигорск, 357532, Россия,
sheryfka@mail.ru*

Листья оливы европейской (*Olea europaea* L.) характеризуются высоким содержанием биоактивных производных полифенолов, обладающих антиоксидантным, противовирусным, противовоспалительным, кардиопротекторным, гипотензивным, противоопухолевым действиями. Цель работы – выбор оптимального экстрагента и условий анализа фенольных соединений листьев оливы европейской. Сравнительный анализ семи полученных экстрактов проведен методами спектрофотометрии и тонкослойной хроматографии (ТСХ). На УФ-спектрах растворов сравниваемых экстрактов присутствует максимум поглощения при 280 ± 2 нм, который можно связать с поглощением комплекса производных фенолкарбоновых кислот, в том числе и с олеуропеином. Максимум при 328 ± 2 нм характеризует присутствие в экстрактах производных гидроксикоричных кислот, в водном экстракте он имеет коротковолновый сдвиг – 320 ± 2 нм. Методом ТСХ с помощью четырех подвижных фаз во всех экстрактах установлено наличие основного биологически активного соединения оливы европейской – олеуропеина, дополнительно обнаружено присутствие от 2 до 5 полифенольных соединений. Максимальное суммарное содержание фенолкарбоновых кислот в пересчете на галловую кислоту – 2.93% установлено для экстракта, полученного с использованием 40% спирта этилового. Наибольшее суммарное содержание гидроксикоричных кислот в пересчете на хлорогеновую кислоту (2.35%) также было экстрагировано раствором спирта этилового 40%. По результатам эксперимента сделан вывод, что для экстракции суммы полифенолов из листьев оливы европейской предпочтительнее использовать раствор спирта этилового 40%, для олеуропеина – воду. Методики ТСХ и метод спектрофотометрии позволяют контролировать процесс экстракции суммы биоактивных соединений листьев оливы европейской.

Ключевые слова: олива европейская, олеуропеин, полифенолы, тонкослойная хроматография, спектрофотометрия.

Для цитирования: Леонова В.Н., Курегян А.Г. Выбор оптимального экстрагента и условий анализа фенольных соединений листьев оливы европейской (*Olea europaea* L.) // Химия растительного сырья. 2024. №3. С. 198–206. DOI: 10.14258/jcprm.20240312655.

Введение

Олива европейская (*Olea europaea* L.) относится к семейству *Oleaceae*, имеет особое историческое и коммерческое значение в странах Средиземноморья [1–3], она также произрастает на юге Российской Федерации – на территории Краснодарского края и Республики Крым [4, 5].

Долгое время листья *Olea europaea* считались малопригодными для дальнейшей переработки отходами промышленного производства оливкового масла. Исследования последних лет показали, что оливковые листья характеризуются высоким содержанием биоактивных производных полифенолов, обладающих широким спектром ценных биологических свойств: антиоксидантным, противомикробным, противовирусным, противовоспалительным, кардиопротекторным, гипотензивным, гиполипидемическим, противоопухолевым действиями [1–3, 6, 7]. Листья оливы европейской являются вторичным сырьем, биологически активные соединения (БАС) которого могут быть извлечены с помощью «зеленых» технологий и используются для пищевых, агрономических, нутрицевтических и медицинских целей в соответствии со стратегией экономики замкнутого цикла [8].

* Автор, с которым следует вести переписку.

Можно констатировать, что в последние годы возрос интерес научного сообщества к оливковым листьям и их экстрактам как перспективному сырью для создания и производства лекарственных препаратов, что связано с экономической и экологической целесообразностью переработки этого вторичного растительного сырья [3, 8]. Одним из главных вопросов, который следует решать при получении БАС из любого вида природного сырья, является выбор оптимального экстрагента и условий аналитического сопровождения технологии получения этих соединений.

Цель работы – выбор оптимального экстрагента и условий сравнительного анализа фенольных соединений листьев оливы европейской.

Экспериментальная часть

Образцы сырья для исследования были собраны в фазе цветения, в 2019 г. в Греции, в районе Фермопил и высушены воздушно-теневым способом.

Влажность сырья определяли по методике ОФС.1.5.0007.15 «Определение влажности лекарственного растительного сырья» [9].

Методика получения водного экстракта. Около 2.5 г (точная навеска) сырья, измельченного до размера частиц, проходящих сквозь сито с отверстиями размером 1 мм, помещали в колбу со шлифом вместимостью 150 мл, прибавляли 25 мл воды очищенной. Колбу присоединяли к обратному холодильнику и нагревали на кипящей водяной бане в течение 30 мин, периодически встряхивая. Горячее извлечение фильтровали через бумажный фильтр в мерную колбу вместимостью 50 мл. Экстрагирование повторяли еще раз в описанных выше условиях. Полученное извлечение фильтровали в ту же мерную колбу, после охлаждения объем извлечения доводили водой до метки и перемешивали (экстракт 1).

Методика получения спиртовых экстрактов. Спиртовые экстракты готовили в условиях, аналогичных получению водного экстракта, используя в качестве экстрагентов спирт этиловый 40% (экстракт 2), спирт этиловый 50% (экстракт 3), спирт этиловый 60% (экстракт 4), спирт этиловый 70% (экстракт 5), спирт этиловый 80% (экстракт 6), спирт этиловый 95% (экстракт 7).

Анализ экстрактов методом спектрофотометрии. 1.0 мл экстракта 1 помещали в мерную колбу вместимостью 50 мл, доводили объем до метки водой (раствор А).

1.0 мл спиртового экстракта помещали в мерную колбу вместимостью 100 мл, доводили объем до метки спиртом этиловым 40% (экстракт 2), спиртом этиловым 50% (экстракт 3), спиртом этиловым 60% (экстракт 4), спиртом этиловым 70% (экстракт 5), спиртом этиловым 80% (экстракт 6), спиртом этиловым 95% (экстракт 7) и перемешивали (раствор Б).

Измеряли оптическую плотность растворов А и Б на спектрофотометре СФ-104 (спектральный диапазон от 190 до 750 нм) в кюветах с толщиной слоя 10 мм, в диапазоне длин волн от 190 до 700 нм. В качестве раствора сравнения для раствора А использовали воду, для раствора Б – раствор спирта этилового соответствующей концентрации.

Расчет содержания фенолкарбоновых кислот (X, %) в пересчете на галловую кислоту и гидроксикоричных кислот (X, %) в пересчете на хлорогеновую кислоту в сырье проводили по формуле:

$$X\% = \frac{A \cdot W_1 \cdot W_2 \cdot 100\%}{A_{1\text{см}}^{1\%} \cdot a_x \cdot V_a \cdot (100 - W)},$$

где А – оптическая плотность испытуемого раствора; a_x – навеска сырья, взятая для получения экстракта, г; W_1 , W_2 , V_a – объемы мерных колб, аликвота, мл; 527 – удельный показатель поглощения галловой кислоты при 270 нм [9]; 507 – удельный показатель хлорогеновой кислоты при 330 нм [9]; W – влажность сырья, %.

Анализ экстрактов методом ТСХ. На линию старта хроматографической пластинки марки «Sorbfil ПТСХ-П-А-УФ» наносили испытуемые экстракты в количестве 5, 10, 15, 20 мкл. В эксперименте участвовали четыре подвижные фазы (ПФ): «бензол-этилацетат-этанол (60 : 30 : 10)» – ПФ I; «бензол-этилацетат-этанол (40 : 40 : 20)» – ПФ II; «хлороформ-этанол-уксусная кислота (70 : 30 : 10)» – ПФ III; «гептан-этилацетат-этанол-вода (1 : 19 : 1 : 19)» – ПФ IV [10]. Хроматографирование проводили восходящим способом. Когда ПФ проходила около 90% длины пластинки от линии старта, пластинку вынимали, высушивали на воздухе, детекцию зон адсорбции проводили облучением УФ-светом при 254 нм и 365 нм.

Статистическую обработку результатов исследования проводили с помощью пакета компьютерных программ Microsoft Office Excel.

Обсуждение результатов

Сырье, использованное в эксперименте, – это цельные или частично измельченные листья оливы. Листовые пластинки простые, продолговатые, почти сидячие, кожистые, узколанцетные, цельнокрайные или пильчатые. Длина листовой пластинки – 3–10 см, ширина – 1–3 см, длина черешка – около 1.5 см. Цвет листьев темно-зеленый с верхней стороны и серовато-серебристый с нижней. Запах листьев слабый, вкус слабо-горьковатый с легким привкусом оливкового масла. Измельченное сырье представляло собой кусочки листьев различной формы, проходящие сквозь сито с отверстиями диаметром 7 мм [4, 5, 11, 12].

Одной из обязательных числовых характеристик растительного сырья, которая используется в расчетах количественного содержания БАС, является влажность [9]. По результатам эксперимента в трех повторностях было установлено, что растительное сырье имело остаточную влажность 10.80%. Это значение далее использовали при расчетах количественного содержания БАС в сырье.

На начальном этапе изучения любой группы БАС природного происхождения необходимо иметь данные об условиях их экстракции из растительного сырья. Согласно опубликованным литературным данным [13–23], экстрагентами полифенолов листьев оливы европейской чаще всего выступают метанол, этилацетат, вода, спирт этиловый различных концентраций, *n*-гексан, *n*-бутанол. Если рассматривать эти растворители с точки зрения их токсичности, пожаро- и взрывоопасности [9, 24], то максимально «зеленым» среди них является вода. Этилацетат относится к растворителям категории 3, применение которых должно быть ограничено требованиями GMP или другими требованиями к качеству [24]. Однако следует признать его взрывоопасность, что можно трактовать как отрицательный фактор с позиций «зеленых» технологий. Метанол и *n*-гексан, согласно классификации, приведенной в ГФ XIV и фармакопее ЕВРАЗЭС [9, 24], относятся к группе 2 – растворители, использование которых нужно ограничивать. *n*-Бутанол входит в группу растворителей с низкой токсичностью [9, 24], но вместе с этим, как и этилацетат, пожаро- и взрывоопасен, что негативно отражается на «озеленении» технологий получения экстрактов. Вопрос использования спирта этилового различных концентраций с учетом внедрения «зеленых» принципов в фармацевтическое производство на сегодняшний день остается открытым. И это, в первую очередь, связано с тем, что большинство производств адаптировано к производству именно спиртовых экстрактов из большинства природного сырья. При этом литературные данные показывают, что водные и спиртовые извлечения из листьев оливы европейской близки по фармакологическим свойствам [14], имеют сопоставимое содержание БАС. Водные извлечения не нуждаются в дополнительной очистке от остаточных органических растворителей, не требуют выделения дополнительных финансовых средств для утилизации и хранения летучих токсичных растворителей при производстве лекарственных средств, что является признаком «озеленения» фармацевтической отрасли. В рамках конкретного эксперимента вопрос замены спирта этилового на воду можно решить только после сравнительного анализа водных и спиртовых экстрактов. В связи с этим для выбора экстрагента и определения оптимальной концентрации спирта этилового в эксперименте использовали воду очищенную и спирт этиловый следующих объемных концентраций: 40, 50, 60, 70, 80 и 95%.

Сравнительный анализ полученных экстрактов решено было проводить методами спектрофотометрии в УФ-области [9] и тонкослойной хроматографии (ТСХ) [9], так как на данном этапе исследования такой подход информативен и экономически оправдан.

Для всех семи экстрактов эмпирически было подобрано оптимальное чисто ступеней разведения, которое позволяло адекватно регистрировать максимумы поглощения, а величина оптической плотности имела приемлемое значение [9] (рис. 1–3).

На рисунке 1 приведен электронный спектр водного экстракта листьев оливы европейской, на котором наблюдаются два максимума поглощения при 280 ± 2 нм и 320 ± 2 нм.

Электронные спектры растворов спиртовых экстрактов, полученных с помощью спирта этилового с концентрацией от 40 до 80%, характеризовались двумя максимумами: при 280 ± 2 и при 328 ± 2 нм (рис. 2).

На спектре 95% спиртового экстракта листьев оливы европейской присутствовал дополнительный максимум при 665 ± 2 нм, который соответствует поглощению хлорофилла (рис. 3).

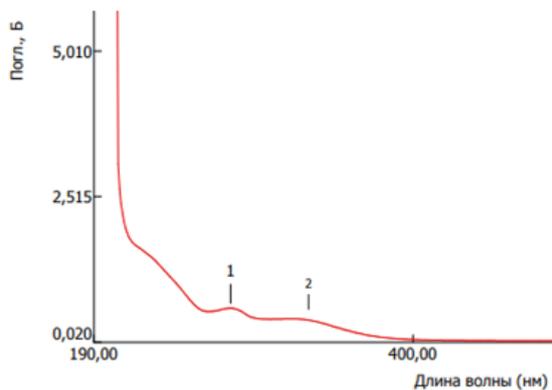


Рис. 1. Спектр поглощения раствора водного экстракта листьев оливы европейской

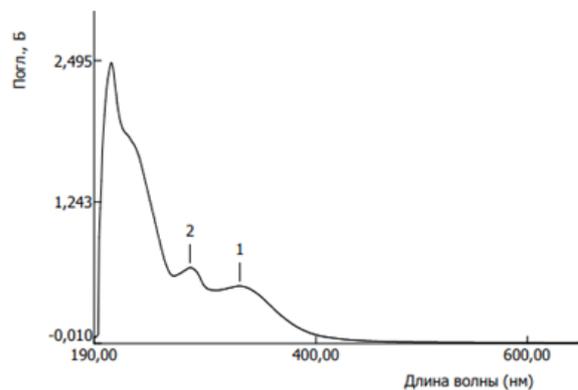
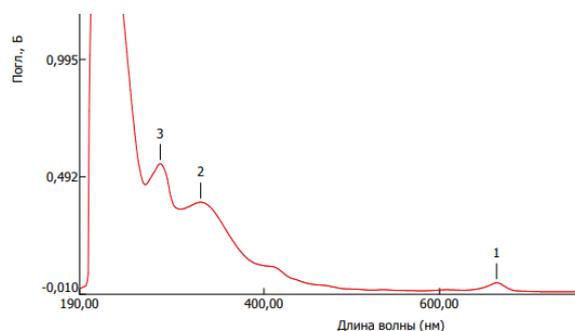


Рис. 2. Спектр поглощения раствора экстракта листьев оливы европейской, полученного 60% спиртом этиловым

Рис. 3. Спектр поглощения раствора экстракта листьев оливы европейской, полученного 95% спиртом этиловым



Данные литературы свидетельствуют, что в листьях оливы европейской присутствуют пять основных групп фенольных соединений: олеуропеозиды (олеуропеин и вербаскозид); производные фенолов (тирозол, гидрокситирозол, ванилин, ванилиновая и кофейная кислоты); флавоны (лютеолин-7-глюкозид, апигенин-7-глюкозид, диосметин-7-глюкозид, лютеолин и диосметин); флавонолы (рутин); флаван-3-олы (катехины). Доминантными соединениями являются секоиридоид олеуропеин – гликозид гидрокситирозола, связанного сложноэфирной связью с эленоловой кислотой, и вербаскозид – конъюгированный гликозид гидрокситирозола и кофейной кислоты [24]. На УФ-спектрах растворов всех сравниваемых экстрактов присутствует максимум поглощения при 280 ± 2 нм, который можно связать с поглощением комплекса производных фенолкарбоновых кислот, в том числе и олеуропеина. Максимум при 328 ± 2 нм является общим для всех полученных спиртовых экстрактов и характеризует присутствие в них производных гидроксикоричных кислот. В водном экстракте этот максимум имеет коротковолновой сдвиг – 320 ± 2 нм [25]. Положение максимумов поглощения на спектрах семи полученных экстрактов позволяют констатировать, что они имеют близкий суммарный качественный состав.

Для подтверждения этого предположения и одновременного выбора оптимальных условий провели хроматографический ТСХ-анализ изучаемых экстрактов листьев оливы европейской. При выполнении данного фрагмента эксперимента решали несколько задач: выбор оптимальных условий ТСХ-анализа для дальнейшего аналитического сопровождения получения экстрактов листьев оливы европейской; выбор лучшего экстрагента с точки зрения числа соединений, входящих в экстракт; возможность идентифицировать секоиридоид олеуропеин. Суммарный результат ТСХ-анализа семи экстрактов в четырех ПФ представлен в таблице 1.

Сопоставление числа зон адсорбции на хроматограммах показал, что с увеличением концентрации спирта этилового, увеличивается число пятен на треках экстрактов, а, следовательно, и количество веществ. Так, при использовании ПФ I максимальное число зон адсорбции – пять характерно для экстрактов, полученных спиртом этиловым с концентрацией 60, 80 и 95%. Применяя ПФ II, наблюдали пять зон на треках

извлечений, полученных спиртом этиловым с концентрацией 40% и от 70 до 95%. ПФ III позволила обнаружить по пять зон адсорбции для 60, 80% спиртовых извлечений из листьев оливы европейской. ПФ IV показала наличие максимального числа соединений – четыре только для одного экстракта, полученного спиртом этиловым 40%. Таким образом, при повышении концентрации спирта этилового происходит, как правило, увеличение числа извлекаемых веществ. Однако эта закономерность нестабильна, что, возможно, связано с неоптимальными хроматографическими условиями.

Таблица 1. Результаты ТСХ анализа экстрактов листьев оливы европейской*

Экстракты	Значения Rf в ПФ I	Значения Rf в ПФ II	Значения Rf в ПФ III	Значения Rf в ПФ IV
Экстракт 1	0.06 (олеуропеин) [10]	0.19	0.29	0.17
	0.19	0.30 (олеуропеин) [10]	0.55	0.15
	0.49 (тирозол) [10]	0.49		
Экстракт 2	0.07 (олеуропеин) [10]	0.16	0.31	0.15
	0.39	0.25(олеуропеин) [10]	0.39	0.24
		0.31	0.57	0.77
		0.40	0.69	
		0.50		
Экстракт 3	0.04 (олеуропеин) [10]	0.32(олеуропеин) [10]	0.69	0.46
	0.11	0.39	0.76	0.56
	0.33	0.49		0.65
		0.58		0.81
Экстракт 4	0.07 (олеуропеин) [10]	0.28 (олеуропеин) [10]	0.21	0.59
	0.12	0.36	0.61	0.68
	0.24 (гидрокситирозол) [10]	0.47	0.70	0.82
	0.46	0.56	0.77	
	0.50 (тирозол) [10].		0.89	
Экстракт 5	0.10 (олеуропеин) [10]	0.30(олеуропеин) [10]	0.53	0.53
	0.24 (гидрокситирозол) [10]	0.39	0.66	0.82
	0.53 (тирозол) [10]	0.51	0.74	
	0.60 (катехол, метилкатехол) [10]	0.64	0.92	
		0.76		
Экстракт 6	0.12 (олеуропеин) [10]	0.25	0.24	0.27
	0.30	0.33 (олеуропеин) [10]	0.43	
	0.57	0.40	0.56	
	0.66 (катехол, метилкатехол) [10]	0.51	0.66	
	0.95	0.72	0.90	
Экстракт 7	0.12	0.28	0.35	0.55
	0.22	0.37 (олеуропеин) [10]	0.55	0.68
	0.44	0.45	0.63	0.89
	0.78	0.55	0.88	
	0.95	0.76		

* – в таблице приведен средний результат для трех последовательных определений.

Анализируя треки хроматограмм водного и спиртовых извлечений в четырех ПФ, пришли к выводу, что достаточными для хроматографирования объемами пробы были 10 и 15 мкл. Для всех экстрактов и четырех систем растворителей оказалось, что нанесение 5 мкл извлечений на линию старта было недостаточным, так как после хроматографирования зоны адсорбции были практически не видны как в дневном свете, так и при облучении УФ-светом. Нанесение пробы объемом 20 мкл показало, что зоны адсорбции на треках экстрактов были перегруженными, а разделения БАС не происходило, это особенно было характерно для экстрактов с более высокой концентрацией спирта этилового. Взаимный учет нескольких факторов, а именно подсчет числа зон адсорбции на треках экстрактов, учет времени хроматографирования, способности ПФ к расслоению, возможности идентификации по величине фактора удерживания, опубликованного в литературе, пригодности системы для разделения ($\Delta Rf < 0.1$) позволили прийти к следующим заключениям: 1) ПФ I позволяет идентифицировать олеуропеин, гидрокситирозол, тирозол, суммарно катехол и метилкатехол; ПФ II может применяться для идентификации олеуропеина; 2) достоверно идентифицировать олеуропеин при помощи ПФ III возможно при наличии стандартного образца, так как нет опубликованных данных по величине фактора удерживания для основных БАС листьев оливы европейской; при этом, учитывая

хроматографическую подвижность, окраску в видимом свете и при УФ-облучении, можно предположить, что зона адсорбции с фактором удерживания около 0.6 принадлежит олеуропеину; 3) ПФ IV оказалась непригодна для работы с изучаемыми объектами, поскольку время хроматографирования составило около 3 ч, при столь длительном времени анализа система расслаивалась, а для большинства пятен величина ΔR_f была значительно меньше 0.1, т.е. система не выполняла задач по разделению компонентов экстрактов, о чем свидетельствовало значительное «размывание» зон адсорбции.

Выбор оптимального экстрагента для БАС листьев оливы европейской предполагал обязательный предварительный количественный анализ суммы БАС (табл. 2).

Из данных таблицы 2 следует, что вода экстрагировала наименьшее суммарное количество БАС, максимальное общее количество фенолкарбоновых кислот в пересчете на галловую кислоту и гидроксикоричных кислот в пересчете на хлорогеновую кислоту из сырья было экстрагировано 40% спиртом этиловым – 2.93 и 2.35% соответственно. Кроме того, как экстрагенты суммы БАС заслуживают внимания спирт этиловый 60 и 80%. Однако при увеличении концентрации спирта от 60 до 80% не происходит значительного увеличения эффективности экстракции БАС, а при его концентрации 95% она снижается. Следует обратить внимание на то, что хоть вода и извлекает меньшее суммарное количество БАС, этот экстрагент позволяет выделить из сырья олеуропеин с наименьшим количеством сопутствующих полифенолов, что подтверждается ТСХ анализом экстракта 1.

Таблица 2. Результаты количественного анализа суммы БАС листьев оливы европейской*

№	Экстрагент (навеска сырья, взятая для получения экстракта, г)	Максимумы поглощения, нм (оптическая плотность)	Содержание фенолкарбоновых кислот в пересчете на галловую кислоту, %	Содержание гидроксикоричных кислот в пересчете на хлорогеновую кислоту, %
1	вода очищенная (2.5033 г)	280 нм (0.984) 320 нм (0.677)	2.09±0.10	1.50±0.08
2	спирт этиловый 40% (2.5027 г)	281 нм (0.689) 327 нм (0.531)	2.93±0.15	2.35±0.12
3	спирт этиловый 50% (2.5065 г)	281 нм (0.620) 327 нм (0.456)	2.63±0.13	2.01±0.10
4	спирт этиловый 60% (2.5070 г)	281 нм (0.660) 328 нм (0.497)	2.80±0.14	2.19±0.11
5	спирт этиловый 70% (2.5001 г)	282 нм (0.627) 328 нм (0.455)	2.67±0.13	2.01±0.10
6	спирт этиловый 80% (2.5025 г)	282 нм (0.655) 329 нм (0.491)	2.78±0.14	2.17±0.11
7	спирт этиловый 95% (2.5051 г)	282 нм (0.548) 328 нм (0.384)	2.33±0.12	1.69±0.08

* – в таблице приведен средний результат для трех последовательных определений.

Выводы

1. Предложенные и использованные в эксперименте методики позволяют контролировать процесс экстракции суммы БАС из листьев оливы европейской и далее будут использованы для анализа этого вида сырья, но произрастающего на юге РФ.

2. Методом ТСХ установлено наличие доминантного БАС оливы европейской – олеуропеина, причем минимальное число сопутствующих полифенольных соединений обнаружено в водном экстракте 1.

3. Суммарное содержание в сырье фенолкарбоновых кислот (в пересчете на галловую кислоту) колебалось от 2.09 до 2.93%; гидроксикоричных кислот (в пересчете на хлорогеновую кислоту) – от 1.50 до 2.35%.

4. Максимальное суммарное количество БАС было определено в экстракте 2, полученным спиртом этиловым 40%, в связи с этим его можно признать перспективным экстрагентом суммы БАС листьев оливы европейской.

5. Однако необходимо отметить, что при использовании этого вида сырья как источника получения олеуропеина оптимально будет строить технологию на более «зеленом» экстрагенте – воде, поскольку она позволяет получить экстракт, содержащий олеуропеин, но при минимальном количестве сопутствующих

полифенолов, что значительно облегчит дальнейшую очистку индивидуального вещества и снизить содержание остаточных органических растворителей в нем.

Финансирование

Данная работа финансировалась за счет средств бюджета Пятигорского медико-фармацевтического института. Никаких дополнительных грантов на проведение или руководство данным конкретным исследованием получено не было.

Конфликт интересов

Авторы данной работы заявляют, что у них нет конфликта интересов.

Открытый доступ

Эта статья распространяется на условиях международной лицензии Creative Commons Attribution 4.0 (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>), которая разрешает неограниченное использование, распространение и воспроизведение на любом носителе при условии, что вы дадите соответствующие ссылки на автора(ов) и источник и предоставите ссылку на Лицензию Creative Commons и укажете, были ли внесены изменения.

Список литературы

1. Bianco A., Ramunno A. The chemistry of *Olea europaea* // *Studies in Natural Products Chemistry*. 2006. Vol. 33. Pp. 859–903. DOI: 10.1016/S1572-5995(06)80042-6.
2. Dekanski D., Mihailovic-Stanojevic N., Milanovic G., Jovovic D., Miloradovic Z. Effects of high dose olive leaf extract on haemodynamic and oxidative stress parameters in normotensive and spontaneously hypertensive rats // *Journal of the Serbian Chemical Society*. 2014. Vol. 79 (9). Pp. 1085–1097. DOI: 10.2298/JSC140218030D.
3. Paiva-Martins F., Barbosa S., Silva M., Monteiro D., Pinheiro V., Mourao J.L., Fernandes J., Rocha S., Belo L., Santos-Silva A. The effect of olive leaf supplementation on the constituents of blood and oxidative stability of red blood cells // *Journal of Functional Foods*. 2014. Vol. 9. Pp. 271–279. DOI: 10.1016/j.jff.2014.04.027.
4. Возделывание маслины на территории СССР [Электронный ресурс]. URL: <https://www.activestudy.info/vozdelivanie-masliny-na-territorii-sssr/>.
5. Шванова В.В. Маслина // *Большая российская энциклопедия*. М., 2011. Т. 19. С. 278–279.
6. Guinda A., Castellano J.M., Santos-Lozano J.M., Delgado-Hervas T., Gutierrez-Adanez P., Rada M. Determination of major bioactive compounds from olive leaf // *LWT – Food Science Technology*. 2015. Vol. 64. Pp. 431–438.
7. Lockyer S., Yaqoob P., Spencer J., Rowland I. Olive leaf phenolics and cardiovascular risk reduction: physiological effects and mechanisms of action // *Nutrition and Aging*. 2012. Vol. 1. Pp. 125–140. DOI: 10.3233/NUA-2012-0011.
8. Romani A., Ieri F., Urciuoli S., Noce A., Marrone G., Nediani C., Bernini R. Health Effects of Phenolic Compounds Found in Extra-Virgin Olive Oil, By-Products, and Leaf of *Olea europaea* L. // *Nutrients*. 2019. Vol. 11(8). 1776. DOI: 10.3390/nu11081776.
9. Государственная фармакопея РФ. XIV изд. М., 2018. Т. 1. 1814 с.
10. Capasso R., Evidente A., Scognamiglio F.A. Simple Thin Layer Chromatographic Method to Detect the Main Polyphenols Occurring in Olive Oil Vegetation Waters // *Phytochemical Analysis*. 1992. Vol. 3. Pp. 270–275.
11. European pharmacopoeia 10.0. France, 2019. Vol. 3. Pp. 1557–1559.
12. United States Pharmacopoeia 43 NF 38. 2020. URL: https://online.uspnf.com/uspnf/document/1_GUID-9A3B3F87-CF7E-4722-94CC-C5D343BDF64C_1_en-US.
13. Viot M., Tomao V., Colnagui G., Visinoni F., Chemat F. New microwave-integrated Soxhlet extraction. An advantageous tool for the extraction of lipids from food products // *Journal of Chromatography A*. 2007. Vol. 1174 (1-2). Pp. 138–144. DOI: 10.1016/j.chroma.2007.09.067.
14. Hashmi M.A., Khan A., Hanif M., Farooq U., Perveen S. Traditional uses, phytochemistry, and pharmacology of *Olea europaea* (Olive) // *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*. 2015. Vol. 2015. Article 541591. DOI: 10.1155/2015/541591.
15. Kheirandish F., Mosaffa N., Tarahi M.J., Fallahi S. Olive (*Olea europaea*) leaf extract alters the cytokine profile of *Leishmania major* -infected macrophages: New insight into the underlying mechanism // *Parasite Immunology*. 2018. Vol. 40 (4). e12520. DOI: 10.1111/pim.12520.
16. Pereira A.P., Ferreira I., Marcelino F., Valentão P., Andrade P., Seabra R., Estevinho L., Bento A., Pereira J.A. Phenolic Compounds and Antimicrobial Activity of Olive (*Olea europaea* L. Cv. Cobrançosa) Leaves // *Molecules*. 2007. Vol. 12 (5). Pp. 1153–1162. DOI: 10.3390/12051153.
17. Romero C., Medina E., Mateo M.A., Brenes M. Quantification of bioactive compounds in Picual and Arbequina olive leaves and fruit // *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 2016. Vol. 97 (6). Pp. 1725–1732. DOI: 10.1002/jsfa.7920.
18. Şahin S., Bilgin M. Olive tree (*Olea europaea* L.) leaf as a waste by-product of table olive and olive oil industry: a review // *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 2017. Vol. 98 (4). Pp. 1271–1279. DOI: 10.1002/jsfa.8619.
19. Flemmig J., Kuchta K., Arnhold J., Rauwald H.W. *Olea europaea* leaf (Ph. Eur.) extract as well as several of its isolated phenolics inhibit the gout-related enzyme xanthine oxidase // *Phytomedicine*. 2011. Vol. 18 (7). Pp. 561–566. DOI: 10.1016/j.phymed.2010.10.021.

20. Olmo-García L., Bajoub A., Benlamaalam S., Hurtado-Fernández E., Bagur-González M., Chigr M., Carrasco-Pan-corbo A. Establishing the Phenolic Composition of *Olea europaea* L. Leaves from Cultivars Grown in Morocco as a Crucial Step Towards Their Subsequent Exploitation // *Molecules*. 2018. Vol. 23 (10). 2524. DOI: 10.3390/molecules23102524.
21. Zaïri A., Nouir S., Zarrouk A., Haddad H., Khélifa A., Achour L. Phytochemical profile, cytotoxic, antioxidant, and allelopathic potentials of aqueous leaf extracts of *Olea europaea* // *Food Science and Nutrition*. 2020. Vol. 8 (9). Pp. 4805–4813. DOI: 10.1002/fsn3.1755.
22. Goulas V., Exarchou V., Troganis A.N., Psomiadou E., Fotsis T., Briasoulis E., Gerothanassis I.P. Phytochemicals in olive-leaf extracts and their antiproliferative activity against cancer and endothelial cells // *Molecular Nutrition and Food Research*. 2009. Vol. 53 (5). Pp. 600–608. DOI: 10.1002/mnfr.200800204.
23. Omar M., Sabry M. Review: Beneficial Health Effects of Olive Leaves Extracts // *Journal of Natural Sciences Research*. 2014. Vol. 4, no. 19. Pp. 1–9.
24. ФС 203020000-2019. Остаточные органические растворители // Фармакопей Евразийского экономического союза. М., 2020. Т. 1-1. С. 517–528.
25. Патент №2613878 С2 (РФ). Способ идентификации и раздельного количественного определения танина и галловой кислоты при совместном присутствии в растительном сырье и фитопрепаратах без предварительного разделения / О.В. Тринеева, А.И. Сливкин. – 2015.

Поступила в редакцию 14 марта 2023 г.

После переработки 8 апреля 2023 г.

Принята к публикации 11 марта 2024 г.

*Leonova V.N.**, *Kuregyan A.G.* CHOICE OF THE OPTIMAL EXTRACTANT AND CONDITIONS FOR THE ANALYSIS OF PHENOLIC COMPOUNDS FROM EUROPEAN OLIVE LEAVES (*OLEA EUROPAEA* L.)

Pyatigorsk Medical and Pharmaceutical Institute – branch of the Federal State Budgetary Educational Institution of Higher Education VolgGMU of the Ministry of Health of Russia, Kalinina av., 11, Pyatigorsk, 357532, Russia, sheryfka@mail.ru

The leaves of the European olive (*Olea europaea* L.) are characterized by a high content of bioactive polyphenol derivatives that have antioxidant, antiviral, anti-inflammatory, cardioprotective, hypotensive, antitumor effects. The aim of the work is to select the optimal extractant and conditions for the analysis of phenolic compounds from European olive leaves. A comparative analysis of the seven obtained extracts was carried out by spectrophotometry and thin layer chromatography (TLC). The UV spectra of solutions of the compared extracts show an absorption maximum at 280 ± 2 nm, which can be associated with the absorption of a complex of phenolcarboxylic acid derivatives, including oleuropein. The maximum at 328 ± 2 nm characterizes the presence of hydroxycinnamic acid derivatives in extracts; in an aqueous extract, it has a short-wavelength shift of 320 ± 2 nm. The presence of the main biologically active compound of the European olive, oleuropein, was found in all extracts by TLC using four mobile phases, and the presence of 2 to 5 polyphenolic compounds was additionally detected. The maximum total content of phenolcarboxylic acids in terms of gallic acid – 2.93% was established for the extract obtained using 40% ethyl alcohol. The highest total content of hydroxycinnamic acids in terms of chlorogenic acid (2.35%) was also extracted with a 40% ethyl alcohol solution. Based on the results of the experiment, it was concluded that for the extraction of the total polyphenols from the leaves of the European olive, it is preferable to use a solution of ethyl alcohol 40%, for oleuropein - water. TLC techniques and spectrophotometric method allow to control the process of extraction of the amount of bioactive compounds from European olive leaves.

Keywords: European olive, oleuropein, polyphenols, thin layer chromatography, spectrophotometry.

For citing: Leonova V.N., Kuregyan A.G. *Khimiya Rasititel'nogo Syr'ya*, 2024, no. 3, pp. 198–206. (in Russ.). DOI: 10.14258/jcprm.20240312655.

References

1. Bianco A., Ramunno A. *Studies in Natural Products Chemistry*, 2006, vol. 33, pp. 859–903. DOI: 10.1016/S1572-5995(06)80042-6.

* Corresponding author.

2. Dekanski D., Mihailovic-Stanojevic N., Milanovic G., Jovovic D., Miloradovic Z. *Journal of the Serbian Chemical Society*, 2014, vol. 79 (9), pp. 1085–1097. DOI: 10.2298/JSC140218030D.
3. Paiva-Martins F., Barbosa S., Silva M., Monteiro D., Pinheiro V., Mourao J.L., Fernandes J., Rocha S., Belo L., Santos-Silva A. *Journal of Functional Foods*, 2014, vol. 9, pp. 271–279. DOI: 10.1016/j.jff.2014.04.027.
4. *Vozdelyvaniye masliny na territorii SSSR* [Olive cultivation in the USSR]. URL: <https://www.activestudy.info/vozde-lyvanie-masliny-na-territorii-sssr/>. (in Russ.).
5. Shvanova V.V. *Bol'shaya rossiyskaya entsiklopediya*. [Great Russian Encyclopedia]. Moscow, 2011, vol. 19, pp. 278–279. (in Russ.).
6. Guinda A., Castellano J.M., Santos-Lozano J.M., Delgado-Hervas T., Gutierrez-Adanez P., Rada M. *LWT – Food Science Technology*, 2015, vol. 64, pp. 431–438.
7. Lockyer S., Yaqoob P., Spencer J., Rowland I. *Nutrition and Aging*, 2012, vol. 1, pp. 125–140. DOI: 10.3233/NUA-2012-0011.
8. Romani A., Ieri F., Urciuoli S., Noce A., Marrone G., Nediani C., Bernini R. *Nutrients*, 2019, vol. 11(8), 1776. DOI: 10.3390/nu11081776.
9. *Gosudarstvennaya farmakopeya RF. XIV izd.* [State Pharmacopoeia of the Russian Federation, 14th ed.]. Moscow, 2018, vol. 1, 1814 p. (in Russ.).
10. Capasso R., Evidente A., Scognamiglio F.A. *Phytochemical Analysis*, 1992, vol. 3, pp. 270–275.
11. *European pharmacopoeia 10.0*. France, 2019, vol. 3, pp. 1557–1559.
12. *United States Pharmacopeia 43 NF 38*. 2020. URL: https://online.uspnf.com/uspnf/document/1_GUID-9A3B3F87-CF7E-4722-94CC-C5D343BDF64C_1_en-US.
13. Virot M., Tamao V., Colnagui G., Visinoni F., Chemat F. *Journal of Chromatography A*, 2007, vol. 1174 (1-2), pp. 138–144. DOI: 10.1016/j.chroma.2007.09.067.
14. Hashmi M.A., Khan A., Hanif M., Farooq U., Perveen S. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2015, vol. 2015, article 541591. DOI: 10.1155/2015/541591.
15. Kheirandish F., Mosaffa N., Tarahi M.J., Fallahi S. *Parasite Immunology*, 2018, vol. 40 (4), e12520. DOI: 10.1111/pim.12520.
16. Pereira A.P., Ferreira I., Marcelino F., Valentão P., Andrade P., Seabra R., Estevinho L., Bento A., Pereira J.A. *Molecules*, 2007, vol. 12 (5), pp. 1153–1162. DOI: 10.3390/12051153.
17. Romero C., Medina E., Mateo M.A., Brenes M. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 2016, vol. 97 (6), pp. 1725–1732. DOI: 10.1002/jsfa.7920.
18. Şahin S., Bilgin M. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 2017, vol. 98 (4), pp. 1271–1279. DOI: 10.1002/jsfa.8619.
19. Flemmig J., Kuchta K., Arnhold J., Rauwald H.W. *Phytomedicine*, 2011, vol. 18 (7), pp. 561–566. DOI: 10.1016/j.phymed.2010.10.021.
20. Olmo-García L., Bajoub A., Benlamaalam S., Hurtado-Fernández E., Bagur-González M., Chigr M. *Molecules*, 2018, vol. 23 (10), 2524. DOI: 10.3390/molecules23102524.
21. Zaïri A., Nour S., Zarrouk A., Haddad H., Khélifa A., Achour L. *Food Science and Nutrition*, 2020, vol. 8 (9), pp. 4805–4813. DOI: 10.1002/fsn3.1755.
22. Goulas V., Exarchou V., Troganis A.N., Psomiadou E., Fotsis T., Briasoulis E., Gerothanassis I.P. *Molecular Nutrition and Food Research*, 2009, vol. 53 (5), pp. 600–608. DOI: 10.1002/mnfr.200800204.
23. Omar M., Sabry M. *Journal of Natural Sciences Research*, 2014, vol. 4, no. 19, pp. 1–9.
24. *Farmakopeya Yevraziyskogo ekonomicheskogo soyuza*. [Pharmacopoeia of the Eurasian Economic Union]. Moscow, 2020, vol. 1-1, pp. 517–528. (in Russ.).
25. Patent 2613878 C2 (RU). 2015. (in Russ.).

Received March 14, 2023

Revised April 8, 2023

Accepted March 11, 2024

Сведения об авторах

Леонова Виктория Нодарьевна – кандидат фармацевтических наук, доцент кафедры токсикологической и аналитической химии, sheryfka@mail.ru

Курегян Анна Гургеновна – доктор фармацевтических наук, профессор, профессор кафедры фармацевтической химии, kooreguan@mail.ru

Information about authors

Leonova Victoria Nodaryevna – candidate of pharmaceutical sciences, associate professor of the department of toxicological and analytical chemistry, sheryfka@mail.ru

Kuregyan Anna Gurgenovna – doctor of pharmaceutical sciences, professor, professor of the department of pharmaceutical chemistry, kooreguan@mail.ru