

**ИЗУЧЕНИЕ СОСТАВА И АНТИ-АЦЕТИЛХОЛИНЭСТЕРАЗНОЙ  
АКТИВНОСТИ ЭКСТРАКТОВ, ПОЛУЧЕННЫХ  
В СУБКРИТИЧЕСКОЙ ВОДЕ ИЗ ЛИСТЬЕВ ОЛИВЫ  
(*OLEA EUROPAEA* L.)**

**С.С. Хизриева** — НИИ физической и органической химии Южного федерального университета, Ростов-на-Дону, Россия. ORCID: 0000-0001-7064-2402. Эл. почта: hizrieva@sfedu.ru

**С.Н. Борисенко** — НИИ физической и органической химии Южного федерального университета, Ростов-на-Дону, Россия. ORCID: 0000-0001-9966-9529. Эл. почта: nbor.borisenko@yandex.ru

**Е.В. Максименко** — НИИ физической и органической химии Южного федерального университета, Ростов-на-Дону, Россия. ORCID: 0000-0002-8715-4517. Эл. почта: maksimenko@sfedu.ru

**Н.И. Борисенко** — НИИ физической и органической химии Южного федерального университета, Ростов-на-Дону, Россия. ORCID: 0000-0003-4733-1985. Эл. почта: niborisenko@sfedu.ru (*для переписки*).

**В.И. Минкин** — НИИ физической и органической химии Южного федерального университета, Ростов-на-Дону, Россия. ORCID: 0000-0001-6096-503X. Эл. почта: viminkin@sfedu.ru

©2021. Поступила в редакцию 04.06.2021 г. Прошла рецензирование 20.06.2021 г.  
Принята к публикации 20.06.2021 г.

Изучено содержание вторичных растительных метаболитов (сумма полифенольных соединений и флавоноидов), полученных субкритической водной (СБВ) и традиционной водно-спиртовой экстракциями из листьев оливы (*Olea europaea* L.) и определена их ацетилхолинэстеразная (анти-АХЭ) активность, характеризующая концентрацией экстрактов листьев оливы, приводящей к 50 %-ному ингибированию активности фермента ацетилхолинэстеразы (АХЭ) —  $IC_{50}$ . Показано, что содержание полифенольных соединений и анти-АХЭ-активность экстрактов зависят от используемого метода экстракции. Полученный при 220 °С СБВ-экстракт из листьев оливы содержит максимальное количество полифенольных соединений и демонстрирует самую высокую анти-АХЭ-активность ( $IC_{50} = 0,4$  мг/мл). Наименее активным в отношении ингибирования фермента АХЭ оказался экстракт, полученный традиционной водно-спиртовой экстракцией ( $IC_{50} = 3,6$  мг/мл). Полученные результаты показывают перспективность использования субкритической воды для получения экстрактов с высоким содержанием полифенолов, необходимых при разработке фармацевтических продуктов и пищевых добавок для профилактики и лечения различных нейродегенеративных заболеваний, таких как болезнь Альцгеймера, из отходов производства оливкового масла (листьев оливы).  
Ключевые слова: субкритическая вода, экстракция, листья оливы (*Olea europaea* L.), полифенолы, анти-ацетилхолинэстеразная активность, метод Эллмана, болезнь Альцгеймера.

**ВВЕДЕНИЕ**

В последние годы растет число исследований, направленных на разработку новых фармацевтических субстанций для лечения различных нейродегенеративных

заболеваний, таких как болезнь Альцгеймера (БА), на основе вторичных растительных метаболитов (ВРМ — органические вещества, синтезируемые растением, но не участвующие непосредственно в росте, развитии или репродукции) [1, 2]. Назначаемые при БА препараты, как правило, вызывают побочные эффекты. Как сейчас полагают, некоторые из нейродегенеративных заболеваний, в том числе БА, имеют воспалительную основу, что определяет новые терапевтические стратегии для борьбы с этими заболеваниями [3]. Одна из таких стратегий лечения БА — использование ВРМ и их производных, способных оказывать нейропротекторное действие путем ингибирования ацетилхолинэстеразы (АХЭ) и/или окислительного стресса. Одной из перспективных групп ВРМ являются полифенолы и их производные, которые демонстрируют антиацетилхолинэстеразную и антиоксидантную активность и в перспективе могут стать основой для разработки фармацевтических субстанций и пищевых добавок для профилактики и лечения БА [4]. Важно отметить, что доступным и дешевым источником полифенолов могут служить вырабатываемые каждый год в огромных количествах отходы сельскохозяйственной и пищевой промышленности. Типичный пример — отходы мировой индустрии производства оливкового масла, в которой ежегодно образуется от 750 до 1 500 тыс. т листьев, которые обычно сжигаются для производства энергии [5]. Известно, что листья оливы европейской (ЛО) содержат значительные количества ВРМ нескольких классов, таких как пентациклические тритерпены, полифенольные производные и полиолы с уникальными свойствами, являющимися потенциальными лекарственными препаратами и биологически активными пищевыми добавками [6]. При этом надо отметить, что в самих плодах оливы тритерпены обнаружены исключительно в кожуре и в концентрации в 30 раз меньшей, чем в листе. В недавно опубликованной работе [7] показано, что ЛО могут использоваться в качестве дешевого источника фармацевтически значимой олеаноловой кислоты, обладающей широким спектром биологической активности [8, 9] при применении субкритической воды как экстрагента.

В данной работе в соответствии с [10, 11] термином субкритическая вода (СБВ) обозначается жидкая вода при температурах от 100 до 374 °С (то есть ниже критической точки). При этих температурах и повышенном давлении вода остается в жидком состоянии, в котором она приобретает свойства, позволяющие использовать среду для экстракции широкого спектра ВРМ. В этих условиях вода имеет гораздо более низкую диэлектрическую проницаемость ( $\epsilon$ ), чем при комнатной температуре. Так, например, при повышении температуры до 225 °С величина  $\epsilon$  воды снижается с 86 до 30, а для такого органического растворителя, как метанол, она равна 32,6 при комнатной температуре. То есть СБВ при такой температуре может быть использована в качестве экстрагента, подобного водно-спиртовым растворам, традиционно используемым для извлечения ВРМ. С другой стороны, при повышении температуры происходит изменение структуры водородных связей в воде и увеличение ее ионного произведения: в диапазоне температур 220—270 °С величина  $K_w$  (константа равновесия диссоциации воды на противоионы) примерно на три порядка выше, чем для жидкой воды при 25 °С, т.е. увеличивается концентрация ионов гидроксония ( $H_3O^+$ ) и гидроксила ( $OH^-$ ). По этой причине СБВ может выступать в этом температурном интервале как катализатор кислотно-основных процессов. В целом, СБВ можно рассматривать как «зеленый» растворитель, интересный с точки зрения использования в про-

цессах превращения биомассы и отходов растительного сырья в продукты с высокой добавленной стоимостью.

Полифенолы в листьях оливы представлены пятью основными группами соединений [13]:

- олеуриды (олеуропеин и вербаскозид),
- флавоны (лютеолин-7-глюкозид, апигенин-7-глюкозид, диосметин-7-глюкозид, лютеолин и диосметин),
- флавонолы (рутин),
- флаван-3-олы (катехин),
- замещенные фенолы [тирозол (4-(2-гидроксиэтил)фенол); гидрокси-тирозол (4-(2,3-дигидроксиэтил)фенол); кофейная кислота (3,4-дигидроксикоричная кислота)].

Многочисленные данные свидетельствуют о том, что полифенолы ЛО обладают антиоксидантной и анти-ацетилхолинэстеразной (анти-АХЭ) активностью и, по-видимому, обладают хорошим терапевтическим потенциалом для предотвращения нейродегенеративных заболеваний [14—16]. Поэтому разработка новых высокоэффективных и экологически чистых методов получения таких экстрактов из ЛО и изучение их состава и потенциала как ингибиторов АХЭ, является чрезвычайно актуальной и имеет значение как с экономической, так и экологической точки зрения. С другой стороны, наличие многочисленных полифенольных метаболитов в ЛО определяет чрезвычайную привлекательность их обработки в среде СБВ для промышленного производства фармацевтически значимых продуктов с высокой добавленной стоимостью в виде обогащенных полифенолами экстрактов.

Недавно показано [17—22], что растительные полифенолы в среде СБВ подвержены разного рода трансформациям, в первую очередь — гидролизу. Последнее обстоятельство позволяет проводить гидролиз растительных полифенольных гликозидов до их базовых агликонов в процессе обработки СБВ без использования дорогостоящих, а зачастую и токсичных органических растворителей. В результате экстракты, полученные в среде СБВ, имеют иной полифенольный состав, чем экстракты, полученные в водно-спиртовой среде.

В связи со сказанным, цель представленной работы — изучение полифенольного состава и анти-ацетилхолинэстеразной активности экстрактов из листьев оливы (*Olea europaea* L.), полученных в СБВ, в сравнении со свойствами экстрактов, полученных в водно-спиртовой среде.

## ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

### Материалы и реактивы

В качестве объекта исследования в работе использованы: листья оливы фирмы Oleaf приобретены у ООО «Оквэл» (Россия); ацетонитрил (марка LC/MS) «Криохром»; серная кислота (ос. ч.), хлороформ (ос. ч.) приобретены у ОАО «Вектон» (Россия). Фермент ацетилхолинэстераза (АХЭ, тип VI-S, 3.1.1.7, 200—1000 единиц/мг белка) из электрического угря (*Electrophorus electricus*), ацетилтиохолин иодид (АТХи) ( $\geq 98\%$ ), 5,5'-дитиобис(2-нитробензойная) кислота (ДТНБ) (99%) были приобретены у «Sigma-Aldrich».

Сумму полифенолов в экстрактах определяли с использованием реактива Фолина—Чокальтеу (2 М, производство фирмы «Sigma»). Галловая кислота (безводн.,  $>98\%$ ) приобретена у фирмы «ДИА-М» (Россия).  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  (безводный, ч,

ГОСТ 83—79, фирма «Вектон»). Соляная кислота (ГОСТ 14261—77, осч, фирма «Сигма Тек») и ледяная уксусная кислота ( $\text{CH}_3\text{COOH}$ , ГОСТ 61—75, хч) приобретены у фирмы «Вектон». Рутин приобретен у фирмы «Sichuan Xieli Pharmaceutical Co., Ltd». Китай.

### Методы исследования

Для определения анти-холинэстеразной активности использован метод Элмана с небольшими модификациями [16, 23].

Для определения суммы полифенолов и суммы флавоноидов применялись, соответственно, дифференциальная [24] и прямая [25] спектрофотометрия с использованием спектрофотометра СПЕКС ССП 705 (УФ-Вид, 190—1100 нм) (производитель ЗАО «Спектроскопические системы», РФ) с программным обеспечением управления и компьютерной обработки результатов анализа «UV-VIS analyst».

### Получение экстрактов

Традиционную водно-спиртовую экстракцию проводили следующим образом. К 1,0 г измельченных до 0,5—3 мм ЛО добавляли 15 мл 70 %-ного этилового спирта и кипятили в колбе с обратным холодильником на водяной бане в течение 90 мин (температура бани 82 °С). После отделения раствора методом декантации в мерный цилиндр емкостью 100 мл, к остатку ЛО в колбе добавляли свежую порцию 15 мл 70 %-ного этилового спирта и повторно кипятили в течение 90 мин. Процедуру слива раствора и кипячения повторяли еще раз (всего процедуру кипячения проводили 3 раза). После этого содержимое колбы количественно переносили на бумажный фильтр и промывали остаток ЛО на фильтре 70 %-ным этиловым спиртом, промывочный раствор соединяли с экстрактом из колбы. Вся процедура экстракции этим способом занимает 270 мин. Собранный в цилиндре объединенный фильтрат анализировали описанными ниже методами.

Получение экстрактов в среде СБВ проводили с использованием изготовленного в лаборатории реактора (автоклава) из нержавеющей стали с внутренним объемом 10 мл [7]. 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, например, при температуре 200 °С давление насыщающего пара воды равно 1,55 МПа. Реактор герметично закрывали, устанавливали в сушильный шкаф и выдерживали при заданной температуре (в диапазоне от 120 до 220 °С, точность  $\pm 1$  °С) в течение 30—60 мин. После этого реактор охлаждали (30 мин) до комнатной температуры в резервуаре, заполненном холодной водой. Содержимое реактора количественно переносили на бумажный фильтр и промывали дистиллированной водой (до бесцветных вод).

### Определение суммы полифенолов и флавоноидов в экстрактах листьев оливы

Оценку содержания фенольных соединений в избранных объектах проводили по колориметрическому методу Фолина—Чокальтеу с использованием

в качестве полифенольных стандартов растворов галловой кислоты и рутина [24, 25]. Метод используется для условного количественного определения фенолов, которые легко окисляются основными компонентами реактива Фолина—Чокальтеу — гетерополисоединениями, содержащими молибден(VI) или вольфрам(VI), которые в восстановленном состоянии M(V) имеют максимум поглощения при 700—750 нм [26, 27].

Для приготовления стандартного раствора галловой кислоты (0,06 мг/мл) 25 мл этанола разбавляли дистиллированной водой до объема 200 мл и добавляли концентрированную соляную кислоту до pH = 3,25. Полученный раствор переносили в мерную колбу объемом 250 мл, растворяли в нем 15 мг галловой кислоты и доводили до метки дистиллированной водой.

Исходный раствор рутина (1,22 мг/мл) готовили следующим образом: 61,1 мг рутина растворяли в 25 мл 80 %-го этилового спирта в мерной колбе вместимостью 50 мл. Колбу с раствором помещали в ультразвуковую баню («Сапфир», Россия) на 10—15 с, после чего перемешивали с помощью лабораторного шейкера (BIOSAN, Латвия). После полного растворения рутина доводили объем раствора тем же растворителем до метки и перемешивали. Затем полученный раствор разбавляли в 10 раз дистиллированной водой и получали стандартный раствор рутина с концентрацией 0,12 мг/мл, используемый для построения градуировочной кривой.

Раствор карбоната натрия (200 г/л) готовили растворением 100 г безводной соли в дистиллированной воде и доведением объема до 500 мл.

Для построения градуировочных кривых по методике [24] 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.

Для определения суммы полифенолов готовили аналогичные смеси с использованием полученных экстрактов ЛО вместо стандартных растворов.

Оптическую плотность растворов определяли при длине волны 750 нм через 30 мин после смешения всех компонентов в кювете с оптической длиной 10 мм; в качестве контрольного раствора использовали аналогичные смеси, в которых вместо стандартных растворов или экстрактов ЛО добавляли 2,5 мл дистиллированной воды. Все измерения проводили в области линейной зависимости оптической плотности от концентрации галловой кислоты или рутина, соответственно.

Сумму флавоноидов в экстрактах ЛО определяли методом прямой спектрофотометрии [25] на длине волны 362 нм (что близко к 356 нм — длине волны максимального поглощения рутина в растворе [28]) в области пропорциональной зависимости оптической плотности от концентрации рутина.

### **Определение антихолинэстеразной активности экстрактов**

Для определения анти-ацетилхолинэстеразной активности (*in vitro*) использовали метод Элмана [23] с небольшими модификациями, описанными в работе [16]. Рабочий раствор фермента (2 ед./мл) готовили в фосфатном буфере с pH = 7,0. Для стабилизации растворов фермента и реактивов использовали фосфатные буферы с pH = 7,0 и pH = 7,4 (0,1 М). Рабочие растворы ДТНБ (0,25 мМ) и ацетилтиохолина иодида (1,88 мМ) готовили в фосфатном буфере с pH = 7,4. Основные растворы экстрактов листьев оливы готовили в 50 %-ном этаноле. Реакционную систему готовили при 25 °С из 0,6 мл

раствора экстракта, 0,36 мл субстрата АТХи (1,88 мМ) и 1,44 мл реагента Элмана—ДТНБ (0,25 мМ).

Реакцию инициировали добавлением 0,12 мл раствора фермента АХЭ (2 ед./мл) после 5 мин инкубации. Раствор для холостой пробы (контроля) состоял из всех перечисленных веществ, кроме ингибитора (раствор экстракта), вместо которого добавляли раствор фосфатного буфера. Смесь перемешивали и измеряли оптическую плотность на длине волны 412 нм через промежуток в 1 мин в течение 6 мин от начала реакции (после добавления фермента). Гидролиз АТХи контролировали по возникновению желтого окрашивания за счет образования аниона 5-тио-2-нитробензоата в результате реакции ДТНБ с тиохалинами, катализируемой АХЭ. Измерения и расчеты проводили с использованием программного обеспечения UV-VIS analyst. Результаты представлены как среднее значение между показаниями трех параллельных анализов. Активность ингибитора характеризуется величиной процента ингибирования, который рассчитывали по формуле:

$$\text{Ингибирование, \%} = [1 - A_{412}/A_{412}^0] \cdot 100,$$

где  $A_{412}$  — поглощение опытной пробы на длине волны 412 нм;  $A_{412}^0$  — поглощение контрольного раствора на длине волны 412 нм.

По результатам рассчитывали значения  $IC_{50}$  (концентрации экстрактов ЛО, которая приводит к 50 %-ному ингибированию активности АХЭ), которые использованы для определения и сравнения ингибирующей активности экстрактов.

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

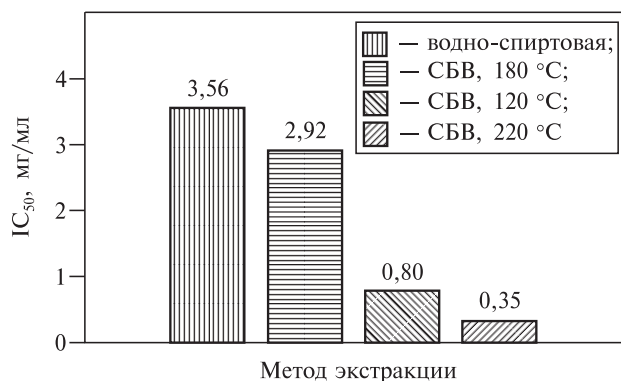
В таблице приведены данные о концентрациях целевых соединений (полифенолов и флавоноидов) в пересчете на галловую кислоту и рутин в экстрактах ЛО, полученных как традиционным методом водно-спиртовой экстракции, так и с использованием СБВ при 120, 180 и 220 °С.

Приведенные данные показывают, что сумма полифенолов в эквиваленте галловой кислоты (ЭГК) в экстракте ЛО, полученном в среде СБВ при 220 °С (70,4 мг ЭГК/г сырья), выше, чем в экстракте, полученном традиционным способом (42,6 мг ЭГК/г сырья). Аналогичная зависимость наблюдается и для сумм полифенолов и флавоноидов в пересчете на рутин. Полифенолов (в пересчете на эквивалент рутина — ЭР) больше всего содержится в экстракте

Таблица

**Содержание полифенолов в эквиваленте галловой кислоты (ЭГК) и флавоноидов в эквиваленте рутина (ЭР) в экстрактах, полученных с помощью различных методов — традиционной (водно-спиртовой) и субкритической водной (СБВ) экстракции**

Метод экстракции	Сумма полифенолов по галловой кислоте, мг ЭГК/г	Сумма флавоноидов по рутину, мг ЭР/г
Водно-спиртовая	42,6	33,0
СБВ, 120 °С	32,7	25,4
СБВ, 180 °С	41,8	29,7
СБВ, 220 °С	70,4	65,2



**Рисунок.** Значения  $IC_{50}$  (мг/мл) экстрактов ЛО, полученных с использованием различных методов экстракции: традиционной экстракции водно-спиртовым растворителем; в среде субкритической воды (СБВ) при 120, 180 и 220 °С

ЛО, полученном в среде СБВ при 220 °С — 160,7 мг ЭР/г сырья, тогда как в экстракте, полученном традиционным способом — 98,4 мг ЭР/г сырья. Аналогично, флавоноидов больше всего содержится в экстракте ЛО, полученном в среде СБВ при 220 °С — 65,2 мг ЭР/г сырья, тогда как в экстракте, полученном традиционным способом — 33,0 мг ЭР/г сырья.

Полученные данные по содержанию полифенолов демонстрируют преимущества экстракции в среде СБВ при получении экстрактов ЛО, обогащенных полифенолами и флавоноидами.

На основании кривых зависимости «доза—ответ» определено значение ингибирующей активности АХЭ ( $IC_{50}$ ) для экстракта ЛО, полученного традиционным способом ( $IC_{50}=3,6$  мг/мл). Значения ингибирующей активности АХЭ, выраженные как  $IC_{50}$  для полученных СБВ-экстрактов, составили:  $IC_{50}=2,9$  мг/мл (120 °С);  $IC_{50}=0,8$  мг/мл (180 °С);  $IC_{50}=0,4$  мг/мл (220 °С), соответственно.

На рисунке представлены данные об антихолинэстеразной активности в виде значений показателя  $IC_{50}$  (мг/мл) полученных экстрактов ЛО. Как видно из этого рисунка, наименее активным в отношении фермента АХЭ (что соответствует наибольшему значению  $IC_{50}$ ) оказался экстракт, полученный традиционной водно-спиртовой экстракцией ( $IC_{50}=3,6$  мг/мл). При использовании в качестве экстрагента СБВ значения  $IC_{50}$  снижаются с 2,9 до 0,4 мг/мл при повышении температуры экстракции со 120 до 220 °С, соответственно.

Таким образом, минимальное значение  $IC_{50}$  и, следовательно, максимальную анти-АХЭ-активность (*in vitro*) демонстрирует экстракт ЛО, полученный в среде СБВ при температуре 220 °С. Этот же экстракт содержит наибольшее количество полифенолов и флавоноидов.

Можно предположить, что увеличение анти-АХЭ-активности экстрактов с ростом температуры экстракции СБВ определяется изменениями ее физико-химических характеристик, приводящих к увеличению растворимости растительных метаболитов, а также превращением исходных полифенолов, содержащихся в ЛО. Недавно показано, что в среде СБВ при 180–220 °С рутин гидролизует до кверцетина [17–20, 29]. Ранее показано [16, 30], что кверцетин более активен в отношении фермента АХЭ, чем его гликозид рутин, присутствующий в исходных ЛО. Последнее обстоятельство позволяет предположить,

что в СБВ-экстрактах (180 и 220 °С) из ЛО (*Olea europaea* L.), именно образующиеся в результате гидролиза агликоны многочисленных гликозидов флавоноидов (рутина, лютеолин-7-глюкозида, апигенин-7-глюкозида, диосметин-7-глюкозида) определяют увеличение анти-АХЭ-активности соответствующих высокотемпературных СБВ-экстрактов.

Таким образом, в данной работе СБВ впервые использована для получения экстрактов из многотоннажных отходов производства оливкового масла — листьев оливы (*Olea europaea* L.), обогащенных полифенолами и флавоноидами и обладающих анти-ацетилхолинэстеразной активностью. Полученные результаты демонстрируют перспективность данного способа. На основе таких экстрактов могут быть получены препараты для регулирования окислительного стресса и нейропротекции при многих нейродегенеративных заболеваниях, в том числе болезни Альцгеймера.

### БЛАГОДАРНОСТИ

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

### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Akram M., Shamma M. // Nawaz. Neural Regen. Res. 2017. Vol. 12. No 4. P. 660.
2. Roy A. // Int. J. Complement Alt. Med. 2018. Vol. 11. No 4. P. 205.
3. Milian L., Estelles R., Abarca B., Ballesteros R., Sanz M.J., Blázquez M.A. // Chem. Pharm. Bull. 2004. Vol. 52. No 6. P. 696.
4. O'Brien P., Carrasco-Pozo C., Speisky H. // Chem. Biol. Interact. 2006. Vol. 159. No 1. P. 1.
5. Şahin S., Elhussein E.A.A. // Phytochem. Rev. 2018. Vol. 17. No 4. P. 657.
6. Guinda Á., Castellano J.M., Santos-Lozano J.M., Delgado-Hervás T., Gutiérrez-Adán P., Rada M. // LWT-Food Science and Tech. 2015. Vol. 64. No 1. P. 431.
7. Максименко Е.В., Хизриева С.С., Борисенко С.Н., Лекарь А.В., Борисенко Н.И., Минкин В.И. // Сверхкритические Флюиды: Теория и Практика. 2020. Т. 15. № 4. С. 67. DOI: 10.34984/SCFTP.2020.15.4.006
8. Lee W., Yang E.J., Ku S.K., Song K.S., Bae J.S. // Inflammation. 2013. Vol. 36. No 1. P.94.
9. Gabriel A., Gutierrez-Rebolledo A., Siordia-Reyes G., Meckes-Fischer M., Jimenez-Arellanes A. // Asian Pacific J. of Trop. Med. 2016. Vol. 9. No 7. P. 644.
10. Галкин А.А., Лукин В.В. // Успехи химии. 2005. Т. 74. № 1. С. 24.
11. Jaegers N.R., Wang Y., Hu J.Z. // Scientific reports. 2020. Vol. 10. No 1. P. 1.
12. Bai X., Lai T., Zhou T., Li Y., Li X., Zhang H. // Molecules. 2018. Vol. 23. P. 1395.
13. Vogel P., Machado I.K., Garavaglia J., Zani V.T., de Souza D., Dal Bosco S.M. // Nutr. Hosp. 2015. Vol. 31. No 3. P. 1427.
14. Giacometti J., Grubić-Kezele T. // Oxidative Med. and Cell. Longevity. 2020. Vol. 2020. Article ID 6125638. P. 1.
15. Sarbishegi M., Gorgich E.A.C., Khajavi O., Komeili G., Salimi S. // Metabolic Brain Disease. 2018. Vol. 33. No 1. P. 79.
16. Omar S.H., Scott C.J., Hamlin A.S., Obied H.K. // Fitoterapia. 2018. Vol. 128. P. 118.
17. Ветрова Е.В., Максименко Е.В., Борисенко С.Н., Лекарь А.В., Борисенко Н.И., Минкин В.И. // Сверхкритические Флюиды: Теория и Практика. 2016. Т. 11. № 4. С. 73.
18. Лекарь А.В., Филонова О.В., Борисенко С.Н., Максименко Е.В., Ветрова Е.В., Борисенко Н.И., Минкин В.И. // Сверхкритические Флюиды: Теория и Практика. 2012. Т. 7. № 4. С. 4.
19. Максименко Е.В., Лекарь А.В., Борисенко С.Н., Хизриева С.С., Ветрова Е.В., Борисенко Н.И., Минкин В.И. // Сверхкритические Флюиды: Теория и Практика. 2018. Т. 13. № 2. С. 15.

20. Lekar A.V., Borisenko S.N., Vetrova E.V., Sushkova S.N., Borisenko N.I. // American J. of Agricul. and Biol. Sciences. 2014. Vol. 9. No 1. P. 1.
  21. Лекарь А.В., Филонова О.В., Борисенко С.Н., Максименко Е.В., Ветрова Е.В., Борисенко Н.И., Минкин В. И. // Сверхкритические Флюиды: Теория и Практика. 2014. Т. 9. № 3. С. 21.
  22. Filonova O.V., Borisenko S.N., Maksimenko E.V., Borisenko N.I., Minkin V.I. // Rus. J. of Bioorg. Chem. 2015. Vol. 41. No 7. P. 762.
  23. Ellman G.L., Courtney K.D., Andres Jr. V., Featherstone R.M. // Biochemical pharmacology. 1961. Vol. 7. No 2. P. 88.
  24. Тутельян В.А., Эллер К.И., Алешко-Ожневский Ю.П. Руководство по методам контроля качества и безопасности биологически активных добавок к пище. М.: Федеральный центр госсанэпиднадзора Минздрава России. 2004. С. 124.
  25. Марченко М.А., Зилфикаров И.Н., Ибрагимов Т.А., Малеев А.Г. // Фармация и фармакология. 2017. Т. 5. № 3. С. 222.
  26. Макарова Н.В., Зюзина А.В. // Известия высших учебных заведений. Пищевая технология. 2011. № 5—6. С. 24.
  27. Денисенко Т.А., Вишник А.Б., Цыганок Л.П. // Аналитика и контроль. 2015. Т. 19. №. 4. С. 373.
  28. Сорокина О.Н., Сумина Е.Г., Петракова А.В., Барышева С.В. // Известия Саратовского университета. Новая серия. Серия Химия. Биология. Экология. 2013. Т. 13. № 3. С. 8.
  29. Синёв М.Ю., Шаповалова О.В. // Сверхкритические Флюиды: Теория и Практика. 2020. Т. 15. № 3. С. 87.
  30. Ademosun A.O., Oboh G., Bello F., Ayeni P.O. // J. of Evidence-based Compl. & Alt. Med. 2016. Vol. 21. No 4. P. 11. DOI: 10.1177/215658721561003
- 

**STUDY OF THE COMPOSITION AND ANTI-  
ACETYLCHOLINESTERASE ACTIVITY OF OLIVE LEAF (*OLEA  
EUROPAEA* L.) EXTRACTS OBTAINED IN SUBCRITICAL WATER**

**S.S. Khizrieva** — Institute of Physical and Organic Chemistry of Southern Federal University, Rostov-on-Don, Russia. ORCID: 0000-0001-7064-2402. E-mail: hizrieva@sfnu.ru

**S.N. Borisenko** — Institute of Physical and Organic Chemistry of Southern Federal University, Rostov-on-Don, Russia. ORCID: 0000-0001-9966-9529. E-mail: nbor.borisenko@yandex.ru

**E.V. Maksimenko** — Institute of Physical and Organic Chemistry of Southern Federal University, Rostov-on-Don, Russia. ORCID: 0000-0002-8715-4517. E-mail: maksimenko@sfnu.ru

**N.I. Borisenko** — Institute of Physical and Organic Chemistry of Southern Federal University, Rostov-on-Don, Russia. ORCID: 0000-0003-4733-1985. E-mail: niborisenko@sfnu.ru (*for correspondence*).

**V.I. Minkin** — Institute of Physical and Organic Chemistry of Southern Federal University, Rostov-on-Don, Russia. ORCID: 0000-0001-6096-503X. E-mail: viminkin@sfnu.ru

---

The content of secondary plant metabolites (the sum of polyphenolic compounds and flavonoids) obtained by subcritical water (SubCW) and traditional extraction by water-alcoholic mixture from olive (*Olea europaea*) leaves was studied, and their acetylcholinesterase (anti-AChE) activity was determined and characterized by the IC<sub>50</sub> value — the concentration of olive leaf extracts, which leads to 50 % inhibition of the activity of the acetylcholinesterase (AChE) enzyme. It was shown that the content of polyphenolic compounds and anti-AChE activity of extracts depend on the used extraction method. The SubCW extract obtained at 220 °C contains the maximum

amount of polyphenolic compounds and demonstrates the highest anti-AChE activity ( $IC_{50} = 0.4$  mg/ml). The least active in relation to the inhibition of the AChE enzyme was found to be the extract obtained by traditional aqueous-alcoholic extraction ( $IC_{50} = 3.6$  mg/ml). The results obtained show the promise of using subcritical water to obtain extracts with a high content of polyphenols for the development of pharmaceutical products and food additives for the prevention and treatment of various neurodegenerative diseases, such as Alzheimer's disease, from the waste of olive oil production (olive leaves).

**Key words:** subcritical water, extraction, olive leaves (*Olea europaea* L.), polyphenols, anti-acetylcholinesterase activity, Ellman's method, Alzheimer's disease.

### ACKNOWLEDGEMENTS

This work was supported by the Ministry of Science and Higher Education of the Russian Federation (State assignment in the field of scientific activity, project No 0852-2020-0031).

### REFERENCES

1. Akram M., Shamma M. // Nawaz. Neural Regen. Res. 2017. Vol. 12. No 4. P. 660.
2. Roy A. // Int. J. Complement Alt. Med. 2018. Vol. 11. No 4. P. 205.
3. Milian L., Estelles R., Abarca B., Ballesteros R., Sanz M.J., Blázquez M.A. // Chem. Pharm. Bull. 2004. Vol. 52. No 6. P. 696.
4. O'Brien P., Carrasco-Pozo C., Speisky H. // Chem. Biol. Interact. 2006. Vol. 159. No 1. P. 1.
5. Sahin S., Elhussein E.A.A. // Phytochem. Rev. 2018. Vol. 17. No 4. P. 657.
6. Guinda Á., Castellano J.M., Santos-Lozano J.M., Delgado-Hervás T., Gutiérrez-Adán P., Rada M. // LWT-Food Science and Tech. 2015. Vol. 64. No 1. P. 431.
7. Maksimenko E.V., Khizrieva S.S., Borisenko S.N., Lekar A.V., Borisenko N.I., Minkin V.I. // Russian J. of Physical Chemistry B. 2021. Vol. 15. No 8 (in press)
8. Lee W., Yang E.J., Ku S.K., Song K.S., Bae J.S. // Inflammation. 2013. Vol. 36. No 1. P. 94.
9. Gabriel A., Gutierrez-Rebolledo A., Siordia-Reyes G., Meckes-Fischer M., Jimenez-Arellanes A. // Asian Pacific J. of Trop. Med. 2016. Vol. 9. No 7. P. 644.
10. Galkin A.A., Lunin V.V. // Russian Chemical Reviews. 2005. Vol. 74. No 1. P. 21.
11. Jaegers N.R., Wang Y., Hu J.Z. // Scientific reports. 2020. Vol. 10. No 1. P. 1.
12. Bai X., Lai T., Zhou T., Li Y., Li X., Zhang H. // Molecules. 2018. Vol. 23. P. 1395.
13. Vogel P., Machado I.K., Garavaglia J., Zani V.T., de Souza D., Dal Bosco S.M. // Nutr. Hosp. 2015. Vol. 31. No 3. P. 1427.
14. Giacometti J., Grubić-Kezele T. // Oxidative Med. and Cell. Longevity. 2020. Vol. 2020. Article ID 6125638. P. 1.
15. Sarbishegi M., Gorgich E.A.C., Khajavi O., Komeili G., Salimi S. // Metabolic Brain Disease. 2018. Vol. 33. No 1. P. 79.
16. Omar S.H., Scott C.J., Hamlin A.S., Obied H.K. // Fitoterapia. 2018. Vol. 128. P. 118.
17. Vetrova E.V., Maksimenko E.V., Borisenko S.N., Lekar A.V., Borisenko N.I., Minkin V.I. // Russian J. of Physical Chemistry B. 2017. Vol. 11. No 7. P. 1202.
18. Lekar A.V., Filonova O.V., Borisenko S.N., Maksimenko E.V., Vetrova E.V., Borisenko N.I., Minkin V.I. // Russian J. of Physical Chemistry B. 2013. Vol. 7. No 7. P. 829.
19. Maksimenko E.V., Lekar A.V., Borisenko S.N., Khizrieva S.S., Vetrova E.V., Borisenko N.I., Minkin V.I. // Russian J. of Physical Chemistry B. 2018. Vol. 12. No 8. P. 1269.
20. Lekar A.V., Borisenko S.N., Vetrova E.V., Sushkova S.N., Borisenko N.I. // American J. of Agricul. and Biol. Sciences. 2014. Vol. 9. No 1. P. 1.
21. Lekar A.V., Filonova O.V., Borisenko S.N., Maksimenko E.V., Vetrova E.V., Borisenko N.I., Minkin V.I. // Russian J. of Physical Chemistry B. 2015. Vol. 9. No 7. P. 1043.

***Изучение состава и анти-ацетилхолинэстеразной активности экстрактов, полученных в субкритической воде из листьев оливы (Olea europaea L.)***

---

22. Filonova O.V., Borisenko S.N., Maksimenko E.V., Borisenko N.I., Minkin V.I. // Russian J. of Bioorg. Chem. 2015. Vol. 41. No 7. P. 762.
  23. Ellman G.L., Courtney K.D., Andres Jr.V., Featherstone R.M. // Biochemical pharmacology. 1961. Vol. 7. No 2. P. 88.
  24. Tutelian V.A., Eller K.I., Aleshko-Ozhevsky Y.P. // Moscow: Federal Center for State Sanitary and Epidemiological Supervision of the Ministry of Health of Russia. 2004. P. 124. (*In Russ.*).
  25. Marchenko M.A., Zilfikarov I.N., Ibragimov T.A., Maleev A.G. // Pharmacy & Pharmacology. 2017. Vol. 5. No 3. P. 222. (*In Russ.*). DOI: 10.19163/2307-9266-2017-5-3-222-241
  26. Makarova N.V., Zyuzina A.V. // Izvestiya vysshih uchebnyh zavedenij. Pishchevaya tekhnologiya. 2011. No 5—6. P. 24. (*In Russ.*).
  27. Denisenko T.A., Vishnikin A.B., Cyganok L.P. // Analitika i kontrol'. 2015. Vol. 19. No 4. P. 373. (*In Russ.*).
  28. Sorokina O.N., Sumina E.G., Petrakova A.V., Barysheva S.V. // Izvestiya Saratovskogo universiteta. Novaya seriya. Seriya Himiya. Biologiya. Ekologiya. 2013. Vol. 13. No 3. P. 8. (*In Russ.*).
  29. Sinev M.Yu., Shapovalova O.V. // Sverkhkriticheskie Flyuidy: Teoriya i Praktika. 2020. Vol. 15. No 3. P. 87 (*In Russ.*). DOI: 10.34984/SCFTP.2020.15.3.010
  30. Ademosun A.O., Oboh G., Bello F., Ayeni P.O. // J. of Evidence-based Compl. & Alt. Med. 2016. Vol. 21. No 4. P. 11. DOI: 10.1177/2156587215610032
- 
-