

УДК 542.06.542.61.542.46.808.542.97.542.93

СУБКРИТИЧЕСКАЯ ВОДА КАК ИНСТРУМЕНТ ДЛЯ ПОЛУЧЕНИЯ ОЛЕАНОЛОВОЙ КИСЛОТЫ ИЗ ЛИСТЬЕВ ОЛИВЫ ЕВРОПЕЙСКОЙ (*OLEA EUROPAEA* L.)

©2020 г. **Е. В. Максименко, С. С. Хизриева, С. Н. Борисенко,
А. В. Лекарь, Н. И. Борисенко*, В. И. Минкин**

*Научно-исследовательский институт физической и органической химии
Южного федерального университета, Ростов-на-Дону, Россия*

*boni@ipoc.rsu.ru

Поступила в редакцию 27.06.2020 г. Прошла рецензирование 11.07.2020 г.
Принята к публикации 11.07.2020 г.

Проведена оценка потенциала субкритической воды (СБВ) как инструмента для получения фармацевтически и нутрицевтически значимых продуктов из листьев оливы европейской (*Olea europaea* L.) на примере олеаноловой кислоты (ОК). Показано, что среда СБВ дает возможность получать ОК из листьев оливы с выходом, сравнимым с результатами традиционных методов, что исключает использование дорогостоящих, а зачастую и токсичных, органических растворителей. При этом затраты времени уменьшаются в четыре раза.

К л ю ч е в ы е с л о в а: олеаноловая кислота, субкритическая вода, листья оливы, *Olea europaea* L.

ВВЕДЕНИЕ

Известно, что каждый год в сельскохозяйственной и пищевой промышленности вырабатывается огромное количество отходов, переработка которых необходима как экономически, так и с экологической точки зрения. Типичный пример — мировая индустрия оливкового масла, где в виде отходов ежегодно образуется около 750—1500 тыс. т листьев, обычно сжигаемых для производства энергии [1]. Между тем листья оливы европейской (*Olea europaea* L.) содержат значительные количества вторичных растительных метаболитов нескольких классов, таких как пентациклические тритерпены, полифенольные производные и полиолы с уникальными фармацевтическими и нутрицевтическими свойствами [2]. Пентациклические тритерпены в листьях оливы представлены олеаноловой кислотой (ОК). Эта кислота (3-гидроксиолеан-12-ен-28-овая кислота) (рис. 1), а также и ее природные и полусинтетические аналоги демонстрируют широкий спектр активностей: противовоспалительную [3], гепатопротекторную [4], гастропротекторную [5], анти-ВИЧ [6], цитотоксическую [7], противоопухолевую [8], антиоксидантную [9], антимикробную [10], противоаллергическую [11], гиполипидемическую [12].

Показано [13], что в листьях оливы содержатся до 3,0—3,5 мас. % ОК (от веса сухого вещества)), маслиновая кислота и незначительные количества урсоловой кислоты — изомера ОК. При этом отмечено, что в самих плодах оливы тритерпены обнаружены исключительно в кожуре и в концентрации,

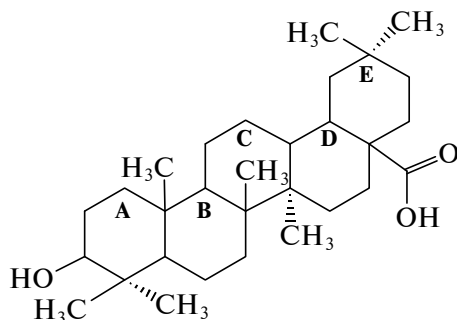


Рис. 1. Структура олеаноловой кислоты (ОК, $C_{30}H_{48}O_3$, мол. масса 456,71)

в 30 раз меньшей, чем в листе. Полифенольные производные в листьях оливы [14] представлены пятью основными группами фенольных соединений: олеурозиды (олеуропеин и вербаскозид); флавоны (лютеолин-7-глюкозид, апигенин-7-глюкозид, диосметин-7-глюкозид, лютеолин и диосметин); флавонолы (рутин); флаван-3-олы (катехин) и замещенные фенолы: тирозол [2-(4-гидроксифенил)этанол], гидрокситирозол [2-(3,4-дигидроксифенил)этанол] и кофейная кислота.

Приведенные данные демонстрируют чрезвычайную привлекательность использования листьев оливы — отходов производства оливкового масла, для промышленного производства на основе ОК фармацевтически и нутрицевтически значимых продуктов с высокой добавленной стоимостью. В этой связи разработка новых высокоэффективных и экологически чистых способов извлечения пентациклических тритерпенов, таких как ОК, является чрезвычайно актуальной и имеет значение, как с экономической, так и экологической точки зрения.

На сегодня описаны многочисленные примеры получения ОК из растительного сырья, в том числе и ряд работ по способам ее извлечения из листьев оливы [13, 14]. Традиционно ОК извлекают из листьев оливы с использованием органических растворителей. Для приготовления экстрактов собранные листья оливы промывают, сушат при $35\text{ }^\circ\text{C}$ и измельчают. Экстракцию проводят в 70 %-ном водном растворе этанола при вращении 180 об./мин или встряхивании при комнатной температуре в лабораторном шейкере в течение 2—5 ч. Водно-спиртовые экстракты фильтруют, упаривают на ротационном испарителе для удаления этанола в вакууме при $35\text{ }^\circ\text{C}$. Водную фазу экстракта центрифугируют, чтобы удалить твердые остатки. Жидкие водные экстракты лиофилизируют.

В [15] продемонстрировано получение ОК в среде СБВ из препарата «Сапарал», а также из корней аралии маньчжурской (*Aralia mandshurica* *rupr.*) [16]. СБВ находится в жидком состоянии при температуре от 100 до $374\text{ }^\circ\text{C}$ и давлении до 21,8 МПа [17]. При этом значительным образом изменяются такие важнейшие физико-химические характеристики воды, как константа диэлектрической проницаемости, поверхностное натяжение, вязкость и константа ионизации. С повышением температуры константа диэлектрической проницаемости, поверхностное натяжение и вязкость уменьшаются, тогда как константа ионизации воды увеличивается и достигает максимума (на три порядка выше) в области $230\text{—}270\text{ }^\circ\text{C}$. Вода при таких температурах ведет себя подобно по-

лярному органическому растворителю и при этом может выступать как кислотный или щелочной катализатор, с одной стороны, так и как растворитель — с другой. Уникальной особенностью СБВ как растворителя является способность восстанавливать значения физико-химических параметров (константу диэлектрической проницаемости, поверхностное натяжение, вязкость, константу ионизации) до обычных величин при охлаждении воды до комнатной температуры. Это означает, что, охладив СБВ до комнатной температуры, мы получаем среду, которая имеет такую же способность растворять целевые вещества, какую эта вода имела до нагревания. Все это открывает широчайшие перспективы для использования СБВ в экстракции и синтезе новых производных из вторичных растительных метаболитов, поскольку позволяет избежать использования дорогостоящих, а зачастую и токсичных и/или пожароопасных органических растворителей, а также исключить этапы очистки [17]. Сочетание свойств воды, как наиболее экономически доступного и экологически чистого растворителя и реагента, открывает перспективы получения ОК из листьев оливы в среде СБВ.

Цель работы — оценка потенциала СБВ как инструмента для получения ОК из листьев оливы, а также сравнение с традиционным способом экстракции. В этой связи из листьев оливы были получены наборы экстрактов как в среде СБВ, так и традиционным методом.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

В качестве объекта использованы листья оливы фирмы Oleaf (<https://www.oleaff.ru/>); приобретены у ООО «Оквэл» (Россия). Ацетонитрил (марка LC/МС) «Криохром», серная кислота (ос.ч.), хлороформ (ос.ч.) получены у ОАО «Вектон» (Россия). ОК ($C_{30}H_{48}O_3$, 98 %) приобретена у MP Biomedicals (США).

Для проведения традиционной экстракции измельченные до 0,5–3,0 мм 1,0 г листьев оливы экстрагировали в колбе с обратным холодильником на водяной бане (82 °С) этиловым спиртом (70 %, 15 мл) в течение 90 мин. Раствор декантировали в мерный цилиндр на 100 мл. Аналогичную процедуру повторяли еще два раза. Далее содержимое колбы количественно переносили на бумажный фильтр и промывали твердый остаток на фильтре 70 %-ным этанолом в тот же цилиндр. Объединенный фильтрат анализировали методом ВЭЖХ. Общие затраты времени на экстракцию составили 270 мин. Остатки листьев на фильтре в 70 %-ном этаноле не растворяются.

Получение ОК в среде СБВ проводили с использованием изготовленного в лаборатории реактора из нержавеющей стали (автоклав) объемом 10 мл [17]. Листья оливы (0,5 г, размер частиц 0,5–3,0 мм) помещали в реактор, добавляли 7 мл дистиллированной воды. Естественно, при нагреве реактора от 100 до 374 °С давление в нем соответствует давлению насыщающего пара для данной температуры, например, при 200 °С давление насыщающего пара равно около 1,6 МПа. Реактор герметично закрывали и помещали в сушильный шкаф, где выдерживали при заданной температуре в диапазоне от 100 до 220 °С с интервалом в 20 °С (± 1 °С) в течение 30–60 мин. После этого реактор охлаждали до комнатной температуры (30 мин), его содержимое количественно переносили на бумажный фильтр и промывали дистиллированной водой до отсутствия цвета.

ОК, содержащуюся в осадке на фильтре, растворяли минимальным количеством 70 %-ного этанола. Аликвоты водного и этанольного растворов разбавляли до концентрации, необходимой для анализа методом ВЭЖХ. Анализ проводили с использованием системы Agilent 1200 LC: DAD детектор; колонка ProSher C18 St 4×50 мм, 3 мкм; подвижная фаза: CH₃CN:0,01 н H₂SO₄, 10:90 (об./об., %); температура колонки 30 °С; скорость потока подвижной фазы 0,25 мл/мин; длина волны УФ-детектора 205 нм; объем образца 0,5 мкл. Количественное определение ОК в экстрактах, полученных из листьев оливы, проводили методом абсолютной калибровки по стандартному раствору ОК с концентрацией 0,285 мг/мл в метаноле. Относительная ошибка определения ОК методом ВЭЖХ составила 2,8 %. Минимально определяемая концентрация в пробе составила 0,046 мг/мл.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

ВЭЖХ-хроматограмма этанольных фракций продуктов извлечения из листьев оливы, полученных традиционным методом при кипячении в 70 %-ном этаноле, демонстрирует пик с RT=38,6 мин, который соответствует ОК в количестве 22,4 мг на грамм сухого сырья. Извлечение ОК максимально составляет 2,2 %, что совпадает с литературными данными [13]. Методом добавки было показано отсутствие в нашем сырье урсоловой кислоты, которая довольно часто встречается в растениях и растительной пище вместе с изомерной ОК, от которой отличается расположением метильной группы в кольце E.

Для оценки потенциала метода извлечения ОК в среде СБВ были получены экстракты из листьев оливы в интервале температур от 120 до 220 °С. На хроматограммах этанольной фракции, извлеченной из листьев оливы в среде СБВ, на 205 нм регистрируются пики с RT=38,6 мин, соответствующие ОК. При этом обнаружено, что пик ОК содержится только в этанольных фракциях, полученных в СБВ, тогда как в водных фракциях пик ОК не регистрируется.

Площади пиков, соответствующих ОК на хроматограммах экстрактов, увеличиваются по мере повышения температуры среды СБВ и достигают максимального значения при 180 °С. Пик с RT=38,51 мин соответствует ОК в количестве 21,06 мг на грамм сухого сырья. Таким образом, при 180 °С в среде СБВ достигается выход извлечения ОК, сопоставимый с величиной выхода ОК, полученного традиционным способом (22,4 мг/г сырья).

Как и ожидалось [16], дальнейшее повышение температуры СБВ демонстрирует уменьшение площадей соответствующих ОК пиков на хроматограмме этанольной фракции экстрактов из листьев оливы. Этот результат может быть обусловлен термической деструкцией ОК. При этом время, затрачиваемое на эксперимент в СБВ в 4 раза меньше, чем в случае традиционного метода.

Количество ОК (мг/г) в этанольных фракциях, полученных из листьев оливы с использованием различных способов и в разных условиях, представлено в виде гистограммы на рис. 2.

Как видно из рисунка, в случае экстракции листьев оливы при использовании СБВ-процесса наблюдается выход ОК приблизительно одного порядка во всем диапазоне температур 120–220 °С. Это позволяет полагать, что ОК в листьях оливы находится в свободном состоянии в виде кислоты. Последнее

**Субкритическая вода как инструмент
для получения олеаноловой кислоты из листьев оливы европейской (*Olea europaea* L.)**

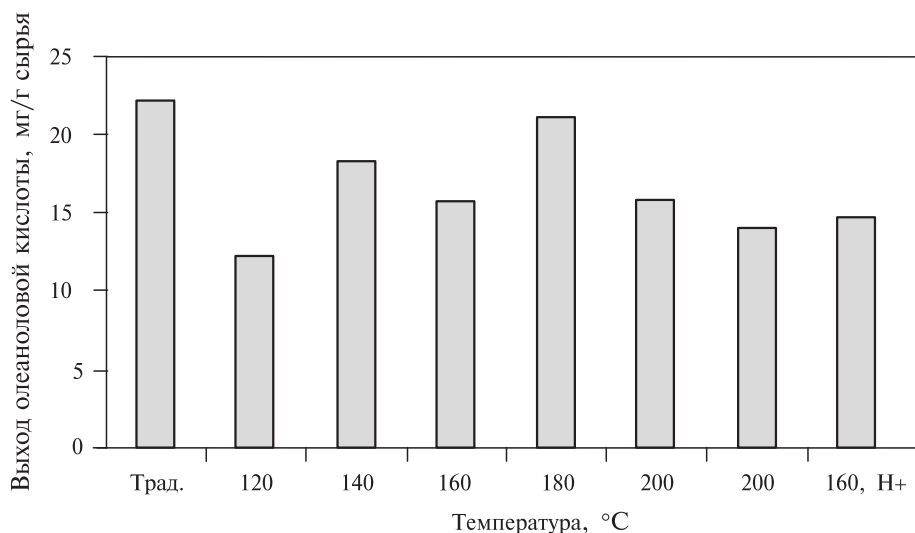


Рис. 2. Количество олеаноловой кислоты (мг/г) в этанольных фракциях экстрактов из листьев оливы, полученных различными методами и в разных условиях

подтверждается тем, что добавление следов кислоты в СБВ, например, при 160 °С (последний столбец на рис. 2), не увеличивает количество регистрируемой ОК. Статистическую обработку результатов извлечения ОК в среде СБВ при 180 °С проводили для шести проб при доверительной вероятности 95 %. Величина относительного стандартного отклонения S_g составляет 15 %, что указывает на приемлемую воспроизводимость данного метода экстракции СБВ и правомерность ее использования для количественного сравнения с другими методами извлечения.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, впервые среда СБВ использована в качестве растворителя для экстракции ОК из листьев оливы европейской (*Olea europaea* L.); при этом выход продукта сопоставим с результатами традиционных способов экстракции. Предложенный метод получения ОК позволяет избежать использования дорогостоящих и токсичных органических растворителей. Выход целевой ОК, сравнимый с традиционными способами, достигается за значительно меньшее количество времени (в 4 раза). Предлагаемая методика имеет потенциал и перспективу для развития недорогих и экологически чистых технологий производства ОК и ее производных для фармацевтической, пищевой и косметической промышленности из листьев *Olea europaea* L. — отходов, остающихся при производстве оливкового масла.

БЛАГОДАРНОСТИ

Работа выполнена при финансовой поддержке Министерства науки и высшего образования Российской Федерации (Государственное задание в области научной деятельности, Южный федеральный университет, 2020 г. № БАЗ0110/20-3-09ИХ) и гранта РФФИ № 19-33-90211-Аспиранты.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Şahin S., Elhoussein E.A.A. // *Phytochem.* 7 Rev. 2018. Vol. 17. No 4. P. 657.
 2. Guinda A., 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.
 3. Lee W., Yang E.J., Ku S.K., Song K.S., Bae J.S. // *Inflammation.* 2013. Vol. 36. No 1. P. 94.
 4. 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.
 5. Rodriguez J.A., Astudillo L., Schmeda-Hirschmann G. // *Pharmacol. Res.* 2003. Vol. 48. P. 291.
 6. Han B., Peng Z. // *J. of Chem. and Pharm. Res.* 2014. Vol. 6. No 4. P. 438.
 7. Tuncay S., Senol H., Guler E.M., Ocal N., Secen H., Kocyigit A., Topcu G. // *Med. Chem.* 2018. Vol. 14. No 6. P. 617.
 8. Meng Y.Q., Feng C.Q., Zhang L.F., Zhang M., Zhao N. // *Yao Xue Xue Bao.* 2015. Vol. 50. No 4. P. 469.
 9. Bai X., Lai T., Zhou T., Li Y., Li X., Zhang H. // *Molecules.* 2018. Vol. 23. P. 1395.
 10. Jéssica J.A., Lago J.H., Laurenti M.D., Eduardo S. // *Evidence-Based Complem. and Alter. Med.* 2015. Article ID 620472. P. 14.
 11. Córdova C., Gutiérrez B., Martínez-García C., Martín R., Gallego-Muñoz P., Hernández M., Nieto M.L. // *PLoS One.* 2014. Vol. 9. No 4. P. 91282.
 12. Chen S., Wen X., Zhang W., Wang C., Liu J., Liu C. // *FASEB J.* 2017. Vol. 31. No 3. P. 1085.
 13. Guinda A., Rada M., Delgado T., Gutiérrez-Adán P., Castellano J.M. // *J. of Agric. and Food Chem.* 2010. Vol. 58. No 17. P. 9685.
 14. 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.
 15. Флюнова О.В., Лекарь А.В., Борисенко С.Н., Ветрова Е.В., Максименко Е.В., Борисенко Н.И., Минкин В.И. // *Сверхкритические Флюиды: Теория и Практика.* 2015. Т. 10. № 2. С. 31.
 16. Лекарь А.В., Максименко Е.В., Борисенко С.Н., Ветрова Е.В., Хизриева С.С., Борисенко Н.И., Минкин В.И. // *Сверхкритические Флюиды: Теория и Практика.* 2019. Т. 14. № 2. С. 14.
 17. Галкин А.А., Лунин В.В. // *Успехи химии.* 2005. Т. 74. № 1. С. 24.
-
-

SUBCRITICAL WATER AS INSTRUMENT FOR PRODUCTION OF OLEANOLIC ACID FROM THE OLIVE LEAF (*OLEA EUROPAEA* L)

**E.V. Maksimenko, S.S. Khizrieva, S.N. Borisenko, A.V. Lekar,
N.I. Borisenko, V.I. Minkin**

*Institute of Physical and Organic Chemistry, Southern Federal University,
Rostov-on-Don, Russia*

The presented work is aimed at the development technique for production oleanolic acid (OA) from the oliveleaf (*Olea europaea* L) using the subcritical water (SBW). For the first time SBW that serves as a reactant and a solvent has been used to obtain OA in good yields starting from the olive leaf (*Olea europaea* L.). This method of preparation of OA allows one to avoid the use of toxic organic solvents. The good yields of the targeted OA can be obtained for the period which is 4 times shorter than needed by the traditional procedures.

Key words: subcritical water, oleanolic acid, olive leaf, *Olea europaea* L.
