

ВЛИЯНИЕ МЕТОДА И УСЛОВИЙ ЭКСТРАКЦИИ НА СОДЕРЖАНИЕ ПОЛИФЕНОЛОВ В ЭКСТРАКТАХ ЛУЗГИ ГРЕЧИХИ (*FAGOPYRUM ESCULENTUM*) И ИХ АКТИВНОСТЬ В ИНГИБИРОВАНИИ АЦЕТИЛХОЛИНЭСТЕРАЗЫ

С.С. Хизриева — Научно-исследовательский институт физической и органической химии ЮФУ, Ростов-на-Дону, Россия. ORCID: 0000-0001-7064-2402. Эл. почта: hizrieva@sfedu.ru

С.Н. Борисенко — Научно-исследовательский институт физической и органической химии ЮФУ, Ростов-на-Дону, Россия. ORCID: 0000-0001-9966-9529. Эл. почта: snborisenko@sfedu.ru

Е.В. Максименко — Научно-исследовательский институт физической и органической химии ЮФУ, Ростов-на-Дону, Россия. ORCID: 0000-0002-8715-4517. Эл. почта: maksimenko@sfedu.ru

А.В. Ипполитова — Научно-исследовательский институт физической и органической химии ЮФУ, Ростов-на-Дону, Россия. Эл. почта: alena.ipolitova01@yandex.ru

К.О. Щедрина — Научно-исследовательский институт физической и органической химии ЮФУ, Ростов-на-Дону, Россия. Эл. почта: kshchedrina@sfedu.ru

Н.И. Борисенко — Научно-исследовательский институт физической и органической химии ЮФУ, Ростов-на-Дону, Россия. ORCID 0000-0003-4733-1985. Эл. почта: niborisenko@sfedu.ru (для переписки).

В.И. Минкин — Научно-исследовательский институт физической и органической химии ЮФУ, Ростов-на-Дону, Россия. ORCID: 0000-0001-6096-503X. Эл. почта: viminkin@sfedu.ru

© 2024 г. Поступила в редакцию 14.08.2024 г. Прошла рецензирование: 30.08.2024 г.
Принята к публикации 30.08.2024 г.

Изучено влияние способа и условий экстракции на полифенольный состав экстрактов лужги гречихи посевной (*Fagopyrum esculentum*) и их активность в ингибировании ацетилхолинэстеразы (АХЭ). Экстракты получали как традиционным методом водно-этанольной экстракции, так и в среде субкритической воды (СБВ) при 120—220 °С. Обнаружена прямая корреляция анти-холинэстеразной активности с содержанием полифенолов в экстрактах. Наиболее высокую активность в ингибировании АХЭ показал экстракт, полученный в среде СБВ при 220 °С, который содержит максимальные количества суммы полифенолов и флавоноидов. Это указывает на определяющую роль указанных соединений в ингибировании АХЭ. Полученные данные позволяют рассматривать экстракты лужги гречихи посевной в качестве недорогих и возобновляемых источников полифенольных соединений и флавоноидов, обладающих Р-витаминной и нейропротекторной активностью.

Ключевые слова: субкритическая вода, отходы агропромышленного комплекса, лужга гречихи посевной, полифенолы, анти-ацетилхолинэстеразная активность.

ВВЕДЕНИЕ

Биологически активные полифенолы, являющиеся продуктами вторичного метаболизма в растениях, имеют широкий спектр физиологической активности и проявляют терапевтические свойства при лечении онкологических заболеваний,

диабета, сердечно-сосудистых и нейродегенеративных патологий [1]. Флавоноиды рассматриваются как перспективные природные соединения для лечения деменции и болезни Альцгеймера (БА) — прогрессирующего нейродегенеративного заболевания, от которого страдают (по данным ВОЗ) до 50 млн человек [2, 3]. Как было показано в ряде работ [4—6], полифенольные вторичные растительные метаболиты (ВРМ) проявляют ингибирующее действие по отношению к холинэстеразам — ферментам, играющим важную роль в патогенезе БА. Поэтому соединения, обладающие антихолинэстеразной активностью, являются препаратами первого выбора при лечении БА. Ингибиторы ацетилхолинэстеразы задерживают распад ацетилхолина, высвобождаемого в синаптические щели, и усиливают холинергическую передачу нервного импульса. Ингибиторы АХЭ не излечивают болезнь, но рекомендуются для ограничения нейродегенерации — их назначение приводит к тому, что симптомы болезни у пациента регрессируют до состояния, которое было как минимум 6—12 месяцами ранее [7].

В связи с этим стремительно растет спрос на дешевые, надежные и легкодоступные ингибиторы холинэстераз, получаемые из природных источников. Это привело к лавинообразному росту исследований ингибирования АХЭ и бутирилхолинэстеразы (БухЭ) растительными экстрактами в условиях *in vitro* и *in vivo* [8]. Одним из недорогих источников для производства препаратов, обогащенных полифенольными ВРМ, которые демонстрируют антиоксидантную активность и широкий спектр терапевтических свойств, могут стать гигантские возобновляемые отходы агропромышленного комплекса (АПК). Получаемые из них препараты могут стать недорогой и воспроизводимой основой для создания широкого спектра фармацевтических фитокомпозиций, новых лекарственных средств и нутрицевтиков (БАД)¹. С другой стороны, следует особо отметить, что продукты, обогащенные ВРМ, которые демонстрируют антиоксидантную активность, как правило, пригодны и для получения широкого спектра новых функциональных материалов с высокой добавленной стоимостью: в качестве восстановителей при производстве наночастиц металлов и их оксидов в так называемых реакциях «зеленого синтеза» [9, 10], дешевых биосорбентов [11, 12], ингредиентов для получения тонких пленок [13, 14] и других продуктов. Поэтому разработка «зеленых» технологий переработки растительных отходов АПК для производства новых продуктов с высокой добавленной стоимостью, является актуальной задачей.

В качестве модельного объекта в данной работе выбран отход переработки гречихи посевной (*Fagopyrum esculentum*) — лузга, годовой объем производства которой в мире превышает два млн т (в 2017 г. объем составил 3,5 млн т). При этом на Россию и Китай приходится 60 % мирового производства [15]. В 2023 г. в РФ было собрано 1,6 млн т гречихи [16]. Россия является одним из ведущих мировых экспортеров гречневой крупы (экспортируется до 200 тыс. т в год) и обладает огромными резервами по увеличению объема ее производства. Это сопровождается образованием огромного количества лигноцеллюлозных отходов переработки гречихи в виде шелухи (лузги), которой в России ежегодно образуется около 60 тыс. т [17]. Состав лузги гречихи посевной (ЛГП) довольно хорошо изучен и отражен в ряде работ [18—22]. В работе [22] показано,

¹ В англоязычных источниках все биологически активные добавки (БАД) называются нутрицевтиками. Также может употребляться и термин «натуральные продукты для здоровья» (NHP).

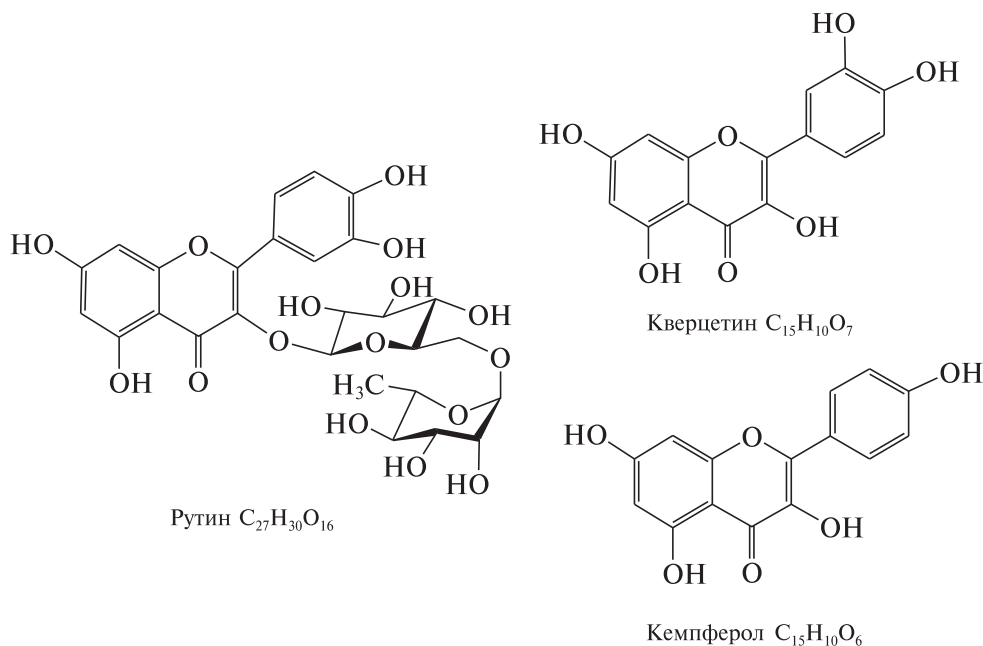


Рис. 1. Структурные формулы основных полифенолов лозги гречихи посевной

что лозга гречихи является богатым источником пищевых волокон (содержание целлюлозы 45,6—51,7 %, гемицеллюлозы — 14,4—16,5 %, лигнина — 28,7—31,6 %, суммарно — 90—95 % [23—25]) и биологически активных веществ, таких как флавоноиды, полисахариды, кумарины, производные коричневой кислоты, микроэлементы и др. Показано, что гречневая лозга отличается от оболочек других зерновых культур высоким содержанием полифенолов (до 0,3 %) [26]. В ней присутствуют рутин (от 0,1 % до 0,2 %) [27], кемпферол, кверцетин (рис. 1), фенолкарбоновые кислоты (галловая, ванилиновая, *n*-гидроксibenзойная, сиреневая, *n*-кумаровая, феруловая и кофейная) [22], а также все незаменимые аминокислоты. Растительным метаболитом, обнаруженным в лозге в максимальной концентрации, является, протокатеховая кислота (0,39 мг/г).

Более подробно флавоноидный состав околоплодников гречихи был изучен в работе [28], в которой авторы идентифицировали девять флавоноидов — кемпферол, 3,5,7,3',4'-пентоксифлавоны, апигенин, лютеолин, формонетин, гиперозид, рутин, ориентин, гомоориентин. Установлено [26], что по содержанию рутиновой фракции лозга совсем немного уступает зеленой массе гречихи. Несомненным преимуществом выделения рутина из лозги является то, что для получения рутина из зеленой массы приходится скашивать значительную часть посевов, лозга же образуется в качестве отходов. Протекторная активность рутина против диабета, БА и различных других заболеваний подтверждена в ряде исследовательских работ [29, 30]. Недавно показано, что этилацетатный экстракт семян гречихи посевной проявляет нейропротекторное действие за счет антиоксидантной и ингибирующей фермент БУХЭ активности [31].

В настоящее время известно несколько способов извлечения полифенолов из ЛПП. Так, в работе [32] приведено описание процедуры экстракции

полифенолов из шелухи лузги водой, содержащей следовые количества (200 ч./1 млн) SO_2 , при объемном соотношении растворителя к сырью 3 : 1, и дальнейшим элюированием фенолов 80 %-ным этанолом. В работе [33] было проведено сравнение извлечения полифенолов подкисленным метанолом или водой, подкисленной уксусной кислотой, с экстракцией при воздействии ультразвука (УЗ) и микроволнового излучения (СВЧ-экстракция). Показано, что микроволновая обработка более эффективна по сравнению с УЗ-воздействием и экстракцией растворителями.

В качестве альтернативы дорогостоящим, а зачастую токсичным и пожароопасным органическим растворителям, перспективным представляется использование субкритической воды (СБВ). Вблизи критической точки вода характеризуется гораздо более низкой диэлектрической проницаемостью и значительно большей константой ионизации. При 220—250 °С константа ионизации на три порядка выше, чем при комнатной температуре. В обсуждаемом интервале температур вода может выступать, с одной стороны, как слабополярный растворитель, а с другой — как кислотно-основной катализатор многих органических реакций благодаря высокой концентрации ионов H_3O^+ и OH^- [34—36].

Цель работы — получение экстрактов из отходов АПК — лузги гречихи в среде субкритической воды и сравнение общего содержания полифенолов и анти-ацетилхолинэстеразной активности (ААА) этих продуктов с показателями экстрактов, полученных традиционным методом водно-этанольной экстракции.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

В качестве исходного сырья использовали товарный продукт — «Наполнитель для подушек» (100 % ЛППГ, влажность 8,2±0,1 %; приобретен у фирмы ООО RamaYoga, Россия, Московская область, год сбора — 2022). Для проведения экстракции традиционным водно-спиртовым методом использовали этиловый спирт (х. ч.) и *n*-гексан (ч.) (ЗАО «Вектон» Россия). Сумму полифенолов в экстрактах определяли с использованием реактива Фолина—Чокальтеу (2 М, производство фирмы Sigma), галловой кислоты (безводной, содержание основного вещества не менее 98 %, производство фирмы ДИА-М, Россия), бикарбоната натрия (ч., безводный, ГОСТ 83-79, фирма «Вектон», Россия) и рутина ($\text{C}_{27}\text{H}_{30}\text{O}_{16}$, производство фирмы Sichuan Xieli Pharmaceutical Co., Ltd., Китай).

Для определения ААА использовали фермент ацетилхолинэстеразу электрического угря *Electrophorus electricus* (лиофилизированный порошок, содержащий трис-буферные соли, тип VI-S, 3.1.1.7, 200—1000 ед./мг белка), ацетилтихолиндиодид (АТХи, ≥98 %), реагент Элмана — 5,5'-дителиобис-2-нитробензойная кислота (ДТНБ, 99 %); поставщик всех препаратов — Sigma-Aldrich (США).

Экстракцию субкритической водой проводили в герметичных реакторах из нержавеющей стали емкостью 10 мл (длина 90 мм, внутренний диаметр 13 мм). В экспериментах использовали лабораторную мельницу ЛМ20, сушильный шкаф СНОЛ (точность поддержания температуры 2 °С) и весы аналитические лабораторные 2 класса (точность взвешивания до 2 мг).

Общее содержание фенолов и флавоноидов определяли с использованием спектрофотометра СПЕКС ССП 705 (с программным обеспечением

«UV-VIS analyst», диапазон 190—1100 нм, производитель ЗАО «Спектроскопические системы», РФ) с кварцевыми кюветами длиной 10 мм.

Получение экстрактов

Сырье предварительно измельчали на лабораторной мельнице и разделяли на фракции с помощью набора лабораторных сит.

Водно-этанольная (традиционная) экстракция

Водно-этанольную экстракцию (ВЭЭ) проводили по ранее описанной методике [18, 37], адаптированной к имеющимся условиям лаборатории. 1 г предварительно обезжиренного *n*-гексаном и высушенного сырья исходного фракционного состава загружали в круглодонную колбу, заливали 50 мл 70 %-ного этанола и нагревали на водяной бане с обратным холодильником в течение 60 мин. Процедуру экстракции проводили трижды. Экстракты фильтровали через бумажный складчатый фильтр, измеряли их объем и отбирали пробу для анализа содержания полифенольных соединений. Остальной объем переливали в фарфоровые чашки, высушивали при 60 °С в сушильном шкафу и взвешивали.

Субкритическая водная экстракция

Экстракцию полифенолов и других функциональных соединений из ЛГП субкритической водой проводили согласно ранее описанной методике [35]. 0,5 г сырья исходного фракционного состава помещали в реактор из нержавеющей стали, добавляли 7 мл дистиллированной воды, герметично закрывали и помещали на 60 мин в сушильный шкаф, разогретый до фиксированной температуры от 120 до 220 °С с шагом 20 °С. Реактор охлаждали в течение ~15 мин в емкости с холодной водой; содержимое реактора количественно переносили на воронку с бумажным складчатым фильтром и фильтровали в мерные цилиндры. Реактор и твердый остаток на фильтре промывали дистиллированной водой и 70 %-ным этиловым спиртом. Фиксировали полученный суммарный объем и отбирали пробу для анализа на содержание полифенольных соединений. Остальной объем высушивали в фарфоровых чашках в сушильном шкафу при до 60 °С. Для каждой температуры проводили две параллельные экстракции.

Определение общего содержания полифенолов в экстрактах

Для определения содержания фенольных соединений в растительном сырье чаще всего применяется спектрофотометрический метод [38] с использованием реактива Фолина—Чокольеу, в составе которого, как правило, присутствуют фосфорновольфрамовые и фосфорномолибденовые гетерополикислоты. Последние восстанавливаются фенольными соединениями в щелочной среде. Это приводит к образованию комплекса синего цвета (вольфрамовая или молибденовая синь), интенсивность окраски которого пропорциональна количеству фенольных соединений [39].

Для определения суммы полифенолов и флавоноидов в ЛГП сухие экстракты растворяли в 70 %-ном этаноле до концентрации 1 мг/мл. Общее содержание полифенолов в полученных экстрактах определяли, как описано ранее [37]. Для построения градуировочных кривых 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 и доводили дистиллированной водой до общего объема 8 мл. Аналогично, для определения суммы полифенолов вместо стандартов использовали растворы полученных экстрактов ЛГП. Расчеты суммарного содержания полифенолов проводили с использованием уравнения соответствующих градуировочных кривых.

Сумму флавоноидов в экстрактах ЛГП определяли, как описано в работах [36, 37], по рутину методом прямой спектрофотометрии на длине волны 362 нм, характерной для поглощения самих флавоноидов. Для построения градуировочной кривой готовили серию растворов, содержащих от 0,5 до 2,5 мл стандартного раствора рутин (0,12 мг/мл) и 0,05 мл 1 %-ной уксусной кислоты. Готовые растворы доводили 70 %-ным этанолом до общего объема 5 мл и измеряли оптическую плотность в кювете длиной 10 мм. Аналогично измеряли оптическую плотность растворов экстрактов ЛГП (1 мг/мл в 70 %-ном этаноле) и рассчитывали сумму полифенолов (ПФ) или флавоноидов (ФВ) в мг/г сырья по формуле (1):

$$\sum \text{ПФ или ФВ} = \left(x \cdot \frac{V}{V_a} \right) \cdot n \cdot \frac{m}{M}, \quad (1)$$

где x — содержание полифенолов в пробе, мг/мл; V — общий объем реакционной смеси, мл; V_a — объем пробы, мл; n — кратность разбавления жидкой пробы экстракта; m — масса экстракта, мг; M — величина (масса) загрузки сырья, г.

Определение анти-ацетилхолинэстеразной активности экстрактов

Определение анти-ацетилхолинэстеразной активности (ААА) проводили методом Элмана [40] по ранее описанной методике [37] с использованием АХЭ электрического угря (*Electrophorus electricus*). Для стабилизации растворов фермента и реактивов использовали фосфатные буферные растворы с рН 7,0 и 7,4. Рабочий раствор фермента (2 ед./мл) готовили смешением 30 мкл исходного раствора фермента (155 ед./мл) с 1970 мкл фосфатного буферного раствора (рН 7,0). Для оценки ААА экстрактов готовили растворы сухих экстрактов ЛГП с концентрациями 1, 5 и 10 мг/мл в 50 %-ном этаноле и разбавляли их в 10 раз фосфатным буферным раствором с рН 7,4.

Рабочие растворы реагента Элмана (0,25 мМ) и субстрата АТХи (1,88 мМ) готовили их растворением в фосфатном буфере с рН 7,4. Реакционную смесь готовили при комнатной температуре смешением рабочих растворов в соотношении 0,6 мл раствора ингибитора, 0,36 мл раствора АТХи и 1,44 мл реагента Элмана в кварцевой кювете как описано ранее [36, 37]. После пяти мин инкубации к приготовленной реакционной смеси добавляли 0,12 мл фермента АХЭ (2 ед./мл), иницируя тем самым реакцию гидролиза субстрата. Смесь перемешивали и измеряли поглощение реакционной смеси на длине волны 412 нм в течение шести мин на спектрофотометре СПЕКС ССП 705. Использовали среднее значение между показаниями трех параллельных измерений.

Активность ингибитора характеризовали величиной степени ингибирования (X , %), которую рассчитывали по формуле (2):

$$X = [1 - A_{412}/A_{412}^0] \cdot 100, \quad (2)$$

где A_{412} и A_{412}^0 — поглощение опытной пробы и контрольного раствора, соответственно, на длине волны 412 нм. Полученные данные использовали для определения концентрации экстрактов, которая приводит к 50 %-ному ингибированию активности АХЭ (IC_{50} , мг/мл), по кривым «доза—ответ», т. е. по зависимости величины X от концентрации раствора экстракта ЛГП.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Извлечение обогащенных полифенолами экстрактов из лузги гречихи посевной

Методом ВЭЭ, а также экстракцией в среде субкритической воды в интервале температур 120—220 °С получен набор экстрактов из ЛГП. Из представленных на рис. 2 данных о выходе экстракта при использовании различных методик и варьировании температуры экстракции видно, что уже при 140 °С при использовании СБВ выход выше достигаемого при ВЭЭ при комнатной температуре, а максимальный (при 200 °С) превышает его в четыре раза.

Представленные в таблице данные показывают, что повышение температуры экстракции в среде СБВ приводит к росту содержания в экстрактах полифенольных соединений и, в частности, флавоноидов в эквиваленте рутин. Уже при 140 °С оно выше, чем в экстракте, полученном методом ВЭЭ при комнатной температуре. С ростом температуры экстракции в среде СБВ общее содержание фенольных соединений в экстракте возрастает и достигает при максимальной температуре эксперимента (220 °С) значения ~112 мг/г, в т. ч. ~27 мг/г флавоноидов (по рутину), что согласуется с данными из литературных источников [26, 27]. При этом из литературы [22] известно, что содержание фенольных соединений в шелухе гречихи может достигать 33 мг/г сухого вещества, что намного выше, чем в других видах сырья; это сопоставимо с полученными в данной работе результатами по экстракции в среде СБВ.

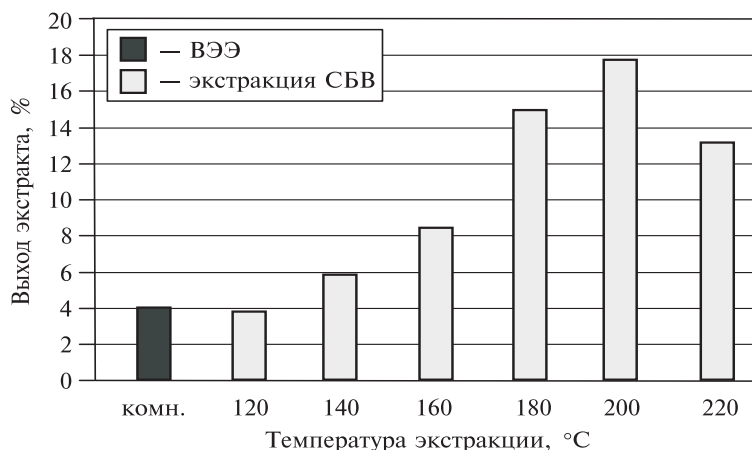


Рис. 2. Зависимость выхода сухого экстракта ЛГП от метода и условий экстракции

Таблица

Суммарное содержание полифенольных соединений и флавоноидов в экстрактах, полученных из ЛГП экстракцией в водно-этанольной смеси и в СБВ

Условия экстракции		Суммарное содержание полифенолов по галловой кислоте, мг/г ЭГК	Суммарное содержание полифенолов по рутину, мг/г ЭР	Суммарное содержание флавоноидов по рутину, мг/г ЭР
Водно-этанольная		10,8 ± 0,9	12,7 ± 1,8	5,0 ± 0,2
СБВ	120 °С	9,2 ± 0,9	15,2 ± 0,6	4,1 ± 0,4
	140 °С	13,6 ± 1,1	24,8 ± 3,2	6,4 ± 0,1
	160 °С	19,1 ± 1,4	39,3 ± 2,8	10,4 ± 0,2
	180 °С	23,0 ± 1,8	48,2 ± 3,0	11,4 ± 0,6
	200 °С	33,9 ± 1,0	75,6 ± 2,4	16,7 ± 1,2
	220 °С	48,4 ± 1,1	111,8 ± 3,2	26,9 ± 0,5

Анти-ацетилхолинэстеразная активность экстрактов лужги гречихи

Вне зависимости от метода и условий экстракции, все полученные экстракты продемонстрировали наличие ААА. В качестве примера на рис. 3 представлена зависимость «доза—ответ» для экстракта, полученного в СБВ при 160 °С. Этот рисунок также иллюстрирует методику определения величины IC_{50} .

Установлено, что ААА экстрактов, полученных в среде СБВ, увеличивается с ростом температуры экстракции (см. рис. 4). При этом экстракт, полученный в среде СБВ при 140 °С, соответствует по ААА экстракту, полученному методом ВЭЭ ($IC_{50} = 1,4$), а при 200 °С — вдвое превосходит его по этому показателю. Для экстракта, полученного в среде СБВ при 180 °С, определена величина $IC_{50} = 1,5$ мг/мл, выпадающая из общей монотонной зависимости; причина этого в настоящее время не установлена. Возможно, в области этой температуры имеет место термическая деструкция многочисленных полисахаридов, входящих в состав ЛГП [21]. Данные факты могут быть объяснены влиянием высоких температур и давлений на матрицу растительного сырья, повышая степень ее разрушения и степень высвобождения экстрагируемых соединений.

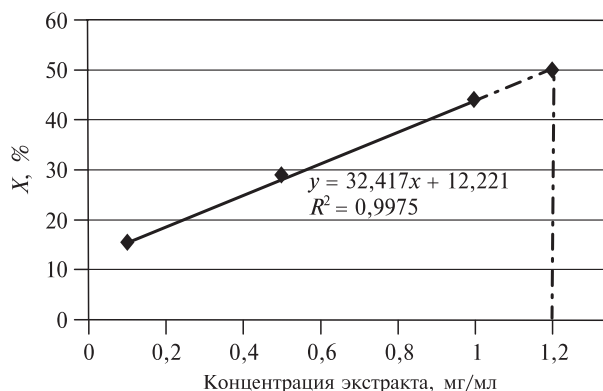


Рис. 3. Зависимость «доза—ответ» и определение величины IC_{50} для экстракта, полученного в СБВ при 160 °С

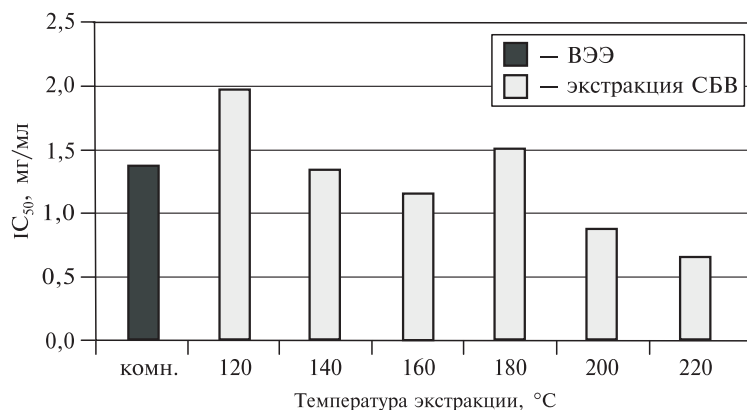


Рис. 4. Зависимость анти-ацетилхолинэстеразной активности экстрактов, полученных из лузги гречихи посевной, от метода и температуры экстракции

В целом, полученные при высоких температурах экстракции в среде СБВ экстракты содержат более высокие концентрации фенольных соединений (включая флавоноиды) и имеют более высокую анти-ацетилхолинэстеразную активность по сравнению с экстрактом, полученным традиционным водно-этанольным способом при комнатной температуре. Изменение свойств СБВ с ростом температуры, вносит значительный вклад в протекание процесса экстракции [41]. Так, изменение диэлектрической проницаемости обеспечивает более полное извлечение соединений различной полярности, а изменение константы ионизации способствует гидролизу высокомолекулярных компонентов до более низкомолекулярных соединений, родственных полифенолам.

Представленные данные позволяют в перспективе рассматривать экстракты, полученные в среде СБВ и обогащенные полифенолами фитокомпозиции, как основу для производства нутрицевтиков, обладающих Р-витаминной и нейропротекторной активностью.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Впервые получен набор экстрактов из лузги гречихи посевной в среде субкритической воды при 120–220 °С. Экстракт, полученный при максимальной температуре (220 °С), содержит наибольшие количества полифенолов и флавоноидов, как в сравнении с экстрактами, полученными тем же методом при более низких температурах, так и полученный традиционным методом водно-этанольной экстракции при комнатной температуре.

Этот же экстракт проявляет самую высокую активность по ингибированию ацетилхолинэстеразы среди изученных экстрактов, что указывает на определяющую роль суммы полифенолов в составе экстрактов ЛГП в их активности по ингибированию АХЭ.

Полученные данные открывают перспективы применения СБВ как экстрагента для получения недорогих обогащенных полифенолами композиций из лузги гречихи посевной для производства биологически активных добавок и фармацевтических субстанций для терапии нейродегенеративных заболеваний. Кроме того, появляется возможность решения проблемы переработки регулярно образующихся многотоннажных количеств растительных отходов.

БЛАГОДАРНОСТЬ

Работа выполнена при поддержке Министерства науки и высшего образования Российской Федерации (государственное задание в сфере научной деятельности, проект № FENW-2023-0017). Исследования проводили на оборудовании Центра коллективного пользования «Молекулярная спектроскопия» Южного федерального университета.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Paniwnyk L., Beaufoy E., Lorimer J.P., Mason T.J. // Ultrasonics sonochemistry. 2001. Vol. 8. No 3. P. 299. DOI: 10.1016/S1350-4177(00)00075-4
2. Zhou P., Hua F. // Neurochemical J. 2020. Vol. 14. No 3. P. 251. DOI: 10.1134/s1819712420030137
3. Irajli A., Khoshneviszadeh M., Firuzi O., Khoshneviszadeh M., Edraki N. // Bioorganic Chemistry. 2020. Vol. 97. P. 103649. DOI: 10.1016/j.bioorg.2020.103649
4. Zhao N., Liu D., Wang Y., Zhang X., Zhang L. // J. of Ethnopharmacology. 2022. Vol. 298, P. 115641. DOI: 10.1016/j.jep.2022.115641
5. Mansinhos I., Goncalves S., Rodriguez-Solana R., Ordóñez-Díaz J.L., Moreno-Rojas J.M., Romano A. // Antioxidants. 2021. Vol. 10. No 4. P. 582. DOI: 10.3390/antiox10040582
6. Jabir N.R., Khan F.R., Tabrez S. // CNS neuroscience & therapeutics. 2018. Vol. 24. No 9. P. 753. DOI: 10.1111/cns.12971
7. Ковальков А.В., Морозова В.Н. // Научно-практический электронный журнал «Аллея Науки». 2023. Т. 80. № 5. С. 1.
8. Kara B. Fagopyrum esculentum moenchin değişik kısımlarının uçucu bileşikleri, sabit yağ ve biyolojik aktivite açısından değerlendirilmesi. Dis. — Anadolu University (Turkey), 2017.
9. Green synthesis, characterization and applications of nanoparticles / Eds. A.K. Shukla, S. Irvani. Elsevier, 2018. DOI: 10.1016/B978-0-08-102579-6.00001-0
10. Ying S., Guan Z., Ofoegbu P.C., Clubb P., Rico C., He F., Hong J. // Environmental Technology & Innovation. 2022. Vol. 26. P. 102336. DOI: 10.1016/j.eti.2022.102336
11. Józwiak T., Filipkowska U., Kowalkowska A., Struk-Sokoowska J., Werbowy D. // J. Environmental Chem. Engineering. 2021. Vol. 9. No 2. P. 105092. DOI: 10.1016/j.jece.2021.105092
12. Beni A.A., Esmaeili A. // Environmental Technology & Innovation. 2020. Vol. 17. P. 100503. DOI: 10.1016/j.eti.2019.100503
13. Pedreiro S., Figueirinha A., Silva A.S., Ramos F. // Coatings. 2021. Vol. 11. No 11. P. 1393. DOI: 10.3390/coatings11111393
14. Tongdeesoontorn W., Mauer L.J., Wongruong S., Sriburi P., Reungsang A., Rachtanapun P. // Polymers. 2021. Vol. 13. No 7. P. 1117. DOI: 10.3390/polym13071117
15. Бучилина А.С., Гунькова П.И., Ишевский А.Л., Баракова Н.В., Москвичева Е.В., Фомичева Т.И. // Вестник Международной академии холода. 2021. № 2. С. 64.
16. Жукова Н.В., Фетисова А.К. // Пищевая промышленность. 2018. № 11. С. 37.
17. Клинецвич В.Н., Флюрик Е.А. // Труды БГТУ. Серия 2: Химические технологии, биотехнология, геоэкология. 2020. № 1 (229). С. 68.
18. Каримова Э.Р., Ямансарова Э.Т., Куковинец О.С., Абдуллин М.И. // Вестник Башкирского университета. 2011. Т. 16. № 4. С. 1167.
19. Уразова Я.В. Технологии и оборудование химической, биотехнологической и пищевой промышленности. 2020. С. 56.
20. Ванг И., Чен Д., Фенг И. // Вестник Орел-ГАУ. 2010. Т. 25. № 4. С. 9.
21. Шекуров В.Н., Таренко Б.И., Шекуров К.В. // Вестник Казанского технологического университета. 2014. Т. 17. № 7. С. 205.
22. Zhang Z., Fan S., Duncan G.J., Morris A., Henderson D., Morrice P., Russell W.R., Duncan S.H., Neacsu M. // Intern. J. Molecular Sciences. 2023. Vol. 24. No 22. P. 16310. DOI: 10.3390/ijms242216310

23. Song C., Ma C., Xiang D. // Intern. J. Molecular Sciences. 2019. Vol. 20. No 3. P. 524. DOI: 10.3390/ijms20030524
24. Dziejdz K., Górecka D., Kucharska M., Przybylska B. // Food Research Intern. 2012. Vol. 47. No 2. P. 279. DOI: 10.1016/j.foodres.2011.07.020
25. Huang Y., Li F., Meng J., Chen W. // BioResources. 2018. Vol. 13. No 3. P. 5153. DOI: 10.15376/biores.13.3.5153-5163
26. Кадрицкая Е.А. Дисс. ... канд. техн. наук. Уральский гос. эконом. ун-т. Екатеринбург, 2023. 153 с.
27. Мягчилов А.В., Соколова Л.И. // Химия растительного сырья. 2011. № 2. С. 123.
28. Ковалев В.Н., Конкина И.А. // Фармацевтический журнал. 1991. № 3. С. 72.
29. Semwal R., Joshi S.K., Semwal R.B., Semwal D.K. // Phytochemistry Letters. 2021. Vol. 46. P. 119. DOI: 10.1016/j.phytol.2021.10.006
30. Sun X., Li L., Dong Q.X., Zhu J., Huang Y., Hou S., Yu X., Liu R. // J. neuroinflammation. 2021. Vol. 18. No 1. P. 131. DOI: 10.1186/s12974-021-02182-3
31. Gulpinar A.R., Orhan I.E., Kan A., Senol F.S., Celik S.A., Kartal M. // Food research international. 2012. Vol. 46. No 2. P. 536. DOI: 10.1016/j.foodres.2011.08.011
32. Włoch A., Strugała P., Pruchnik H., Żyłka R., Oszmiański J., Kleszczyńska H. // J. of Membrane Biology. 2016. Vol. 249. No 1—2. P. 155. DOI: 10.1007/s00232-015-9857-y
33. Speranza A.R., Heinzl G., Scarafoni A., Barbiroli A.G., Iametti S. Interventopresentato al 62. Convegno Congresso Societa Italiana Biochimica. Tenutosi a Firenze. 2023. <https://hdl.handle.net/2434/999390>.
34. Галкин А.А., Лукин В.В. // Успехи химии. 2005. Т. 74. № 1. С. 24. DOI: 10.1070/RC2005v074n01ABEH001167.
35. 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.
36. Хизриева С.С., Борисенко С.Н., Максименко Е.В., Жаркова Г.В., Борисенко Н.И., Минкин В.И. // Сверхкритические Флюиды: Теория и Практика. 2021. Т. 16. № 4. С. 70. DOI: 10.34984/SCFTP.2021.16.4.007
37. Хизриева С.С., Борисенко С.Н., Максименко Е.В., Жаркова Г.В., Борисенко Н.И., Минкин В.И. // Сверхкритические Флюиды: Теория и Практика. 2023. Т. 18. № 1. С. 52. DOI: 10.34984/SCFTP.2023.18.1.004
38. Тутельян В.А., Эллер К.И., Алешко-Ожневский Ю.П. Федеральный центр госсанэпиднадзора Минздрава России. М., 2004. С. 124.
39. Николаева Т.Н., Лапшин П.В., Загоскина Н.В. // Химия растительного сырья. 2021. № 2. С. 291.
40. Ellman G.L., Courtney K.D., Andres Jr. V., Featherstone R.M. // Biochemical pharmacology. 1961. Vol. 7. No 2. P. 88.
41. Zhang J., Wen C., Zhang H., Duan Y., Ma H. // Trends in Food Science & Technology, 2020. Vol. 95. P. 183. DOI: 10.1016/j.tifs.2019.11.018

**EFFECT OF EXTRACTION METHOD AND CONDITIONS
ON THE POLYPHENOL CONTENT IN BUCKWHEAT HUSK
(*FAGOPYRUM ESCULENTUM*) EXTRACTS AND THEIR ACTIVITY
IN ACETYLCHOLINESTERASE INHIBITION**

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

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

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

A.V. Ippolitova — Research Institute of Physical and Organic Chemistry, Southern Federal University, Rostov-on-Don, Russia. E-mail: alena.ippolitova01@yandex.ru

K.O. Shchedrina — Research Institute of Physical and Organic Chemistry, Southern Federal University, Rostov-on-Don, Russia. E-mail: kshchedrina@sfedu.ru

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

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

The effect of the extraction method and conditions on polyphenol composition of buckwheat (*Fagopyrum esculentum*) husk extracts and their acetylcholinesterase (AChE) inhibition activity was studied. The extracts were obtained both by the traditional method of water-ethanol extraction and in a subcritical water (SBW) medium at 120–220 °C. A direct correlation was found between anticholinesterase activity and the content of polyphenols in the extracts. The highest activity in inhibiting AChE was demonstrated by the extract obtained in the SBW medium at 220 °C, which contains the maximum amounts of the sum of polyphenols and flavonoids. This indicates the decisive role of these compounds in AChE inhibition. The obtained data allow us to consider such extracts as inexpensive and renewable sources of polyphenolic compounds and flavonoids with P-vitamin and neuroprotective activity.

Key words: subcritical water, agro-industrial complex wastes, buckwheat husk, polyphenols, anti-acetylcholinesterase activity.

ACKNOWLEDGMENTS

This research was financially supported by the Ministry of Science and Higher Education of the Russian Federation (State assignment in the field of scientific activity, project No FENW-2023-0017). The studies were carried out on the equipment of the Center for Collective Usage «Molecular Spectroscopy» of the Southern Federal University.

REFERENCES

1. Paniwnyk L., Beaufoy E., Lorimer J.P., Mason T.J. // Ultrasonics sonochemistry. 2001. Vol. 8. No 3. P. 299. DOI: 10.1016/S1350-4177(00)00075-4
2. Zhou P., Hua F. // Neurochemical Journal. 2020. Vol. 14. No 3. P. 251. DOI: 10.1134/s1819712420030137
3. Irajli A., Khoshneviszadeh M., Firuzi O., Khoshneviszadeh M., Edraki N. // Bioorganic Chemistry. 2020. Vol. 97. P. 103649. DOI: 10.1016/j.bioorg.2020.103649
4. Zhao N., Liu D., Wang Y., Zhang X., Zhang L. // J. Ethnopharmacology. 2022. Vol. 298. P. 115641. DOI: 10.1016/j.jep.2022.115641
5. Mansinhos I., Goncalves S., Rodríguez-Solana R., Ordóñez-Díaz J.L., Moreno-Rojas J.M., Romano A. // Antioxidants. 2021. Vol. 10. No 4. P. 582. DOI: 10.3390/antiox10040582
6. Jabir N.R., Khan F.R., Tabrez S. // CNS neuroscience & therapeutics. 2018. Vol. 24. No 9. P. 753. DOI: 10.1111/cns.12971
7. Koval'kov A.V., Morozova V.N. // Nauchno-prakticheskij elektronnyj zhurnal «Alleya Nauki». 2023. Vol. 80. № 5. P. 1 (*in Russ.*).

8. Kara B. *Fagopyrum esculentum* moenchin değişik kısımlarının uçucu bileşikleri, sabit yağ ve biyolojik aktivite açısından değerlendirilmesi. Dis. — Anadolu University (Turkey), 2017.
9. Green synthesis, characterization and applications of nanoparticles / Eds. A.K. Shukla, S. Iravani. Elsevier, 2018. DOI: 10.1016/B978-0-08-102579-6.00001-0
10. Ying S., Guan Z., Ofoegbu P.C., Clubb P., Rico C., He F., Hong J. // *Environmental Technology & Innovation*. 2022. Vol. 26. P. 102336. DOI: 10.1016/j.eti.2022.102336
11. Józwiak T., Filipkowska U., Kowalkowska A., Struk-Sokoowska J., Werbowy D. // *J. Environmental Chem. Engineering*. 2021. Vol. 9. No 2. P. 105092. DOI: 10.1016/j.jece.2021.105092
12. Beni A. A., Esmaili A. // *Environmental Technology & Innovation*. 2020. Vol. 17. P. 100503. DOI: 10.1016/j.eti.2019.100503
13. Pedreiro S., Figueirinha A., Silva A.S., Ramos F. // *Coatings*. 2021. Vol. 11. No 11. P. 1393. DOI: 10.3390/coatings11111393
14. Tongdeesoontorn W., Mauer L.J., Wongruong S., Sriburi P., Reungsang A., Rachtanapun P. // *Polymers*. 2021. Vol. 13. No 7. P. 1117. DOI: 10.3390/polym13071117
15. Buchilina A.S., Gun'kova P.I., Ishevskij A.L., Barakova N.V., Moskvicheva E.V., Fomicheva T.I. // *Vestnik Mezhdunarodnoj akademii kholoda*. 2021. No 2. P. 64 (in Russ.).
16. Zhukova N.V., Fetisova A.K. // *Pishhevaya promyshlennost'*. 2018. No 11. P. 37.
17. Klincevič V.N., Flyurik E.A. // *Trudy BGTU. Seriya 2: Khimicheskie tekhnologii, biotekhnologiya, geoekologiya*. 2020. No 1 (229). P. 68 (in Russ.).
18. Karimova E.R., Yamansarova E.T., Kukovinecz O.S., Abdullin M.I. // *Vestnik Bashkirskogo universiteta*. 2011. Vol. 16. No 4. P. 1167 (in Russ.).
19. Urazova Ya. V. // *Texnologii i oborudovanie khimicheskoy, biotekhnologicheskoy i pishchevoj promyshlennosti*. 2020. P. 56 (in Russ.).
20. Vang I., Chen D., Feng I. // *Vestnik Orel-GAU*. 2010. Vol. 25. No 4. P. 9 (in Russ.).
20. Shekurov V.N., Tarenko B.I., Shekurov K.V. // *Vestnik Kazanskogo tekhnologicheskogo universiteta*. 2014. Vol. 17. No 7. P. 205 (in Russ.).
22. Zhang Z., Fan S., Duncan G.J., Morris A., Henderson D., Morrice P., Russell W.R., Duncan S.H., Neacsu M. // *Intern. J. Molecular Sciences*. 2023. Vol. 24. No 22. P. 16310. DOI: 10.3390/ijms242216310
23. Song C., Ma C., Xiang D. // *Intern. J. Molecular Sciences*. 2019. Vol. 20. No 3. P. 524. DOI: 10.3390/ijms20030524
24. Dziejczak K., Górecka D., Kucharska M., Przybylska B. // *Food Research Intern.* 2012. Vol. 47. No 2. P. 279. DOI: 10.1016/j.foodres.2011.07.020
25. Huang Y., Li F., Meng J., Chen W. // *BioResources*. 2018. Vol. 13. No 3. P. 5153. DOI: 10.15376/biores.13.3.5153-5163
26. Kadriczkaya E.A. Diss. kand. tekhn. nauk. Ural'skij gosudarstvennyi ekonomicheskij universitet. Ekaterinburg, 2023. 153 p. (in Russ.).
27. Myagchilov A.V., Sokolova L.I. // *Khimiya rastitel'nogo syr'ya*. 2011. No 2. P. 123 (in Russ.).
28. Kovalev V.N., Konkina I.A. // *Farmaceuticheskij zhurnal*. 1991. No 3. P. 72 (in Russ.).
29. Semwal R., Joshi S.K., Semwal R.B., Semwal D.K. // *Phytochemistry Letters*. 2021. Vol. 46. P. 119. DOI: 10.1016/j.phytol.2021.10.006
30. Sun X., Li L., Dong Q.X., Zhu J., Huang Y., Hou S., Yu X., Liu R. // *J. of neuroinflammation*. 2021. Vol. 18. No 1. P. 131. DOI: 10.1186/s12974-021-02182-3
31. Gulpinar A.R., Orhan I.E., Kan A., Senol F.S., Celik S.A., Kartal M. // *Food research intern.* 2012. Vol. 46. No 2. P. 536. DOI: 10.1016/j.foodres.2011.08.011
32. Wloch A., Strugała P., Pruchnik H., Żyłka R., Oszmiański J., Kleszczyńska H. // *J. of Membrane Biology*. 2016. Vol. 249. No 1—2. P. 155. DOI: 10.1007/s00232-015-9857-y
33. Speranza A.R., Heinzl G., Scarafoni A., Barbiroli A.G., Iametti S. *Interventopresentato al 62. Convegno Congresso Societa Italiana Biochimica. Tenutosi a Firenze*. 2023. DOI: <https://hdl.handle.net/2434/999390>.
34. Galkin A.A., Lunin V.V. // *Russ. Chem. Reviews*. 2005. Vol. 74. No 1. P. 24 (in Russ.). DOI: 10.1070/RC2005v074n01ABEH001167
35. Lekar A.V., Filonova O.V., Borisenko S.N., Maksimenko E.V., Vetrova E.V., Borisenko N.I., Minkin V.I. // *Russ. J. Physical Chemistry B*. 2013. Vol. 7. No 7. P. 829. DOI: 10.1134/S1990793113070117

36. *Khizrieva S.S., Borisenko S.N., Maksimenko E.V., Zharkova G.V., Borisenko N.I., Minkin V.I.* // Russ. J. Phys. Chem. B. 2022. Vol. 16. No 7. P. 1294. DOI: 10.1134/S1990793122070090
 37. *Khizrieva S.S., Borisenko S.N., Maksimenko E.V., Zharkova G.V., Borisenko N.I., Minkin V.I.* // Russ. J. Phys. Chem. B. 2023. Vol. 17. No 7. P. 1534. DOI: 10.1134/S1990793123070151.
 38. *Tutelyan V.A., Eller K.I., Aleshko-Ozhevskij Yu.P.* / Federal'nyi tsentr gossanepidnadzora Minzdrava Rossii. M., 2004. P. 124 (in Russ.).
 39. *Nikolaeva T.N., Lapshin P.V., Zagoskina N.V.* // Khimiya rastitel'nogo syr'ya. 2021. No 2. P. 291 (in Russ.).
 40. *Ellman G.L., Courtney K.D., Andres Jr. V., Featherstone R.M.* // Biochemical pharmacology. 1961. Vol. 7. No 2. P. 88.
 41. *Zhang J., Wen C., Zhang H., Duan Y., Ma H.* // Trends in Food Science & Technology, 2020. Vol. 95. P. 183. DOI: 10.1016/j.tifs.2019.11.018
-
-